

ANWENDUNG VON DRUCK ZUR UNTERSUCHUNG
DER WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN
PROTEINEN UND POLYELEKTROLYT-
GRENZFLÄCHEN SOWIE MODELL-
BIOMEMBRANEN

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt an der

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
der Technischen Universität Dortmund

Eingereicht von

ARTEM LEVIN

Geb. Rostow am Don, Russland

Dortmund, 2019

Die vorliegende Arbeit, sowie die zugrunde liegenden Messungen wurden im Zeitraum von Februar 2016 bis Mai 2019 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I (Biophysikalische Chemie) der Technischen Universität Dortmund unter Betreuung und Leitung von Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik angefertigt bzw. durchgeführt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Claus Czeslik, CCB, TU Dortmund

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter, CCB, TU Dortmund

Vorsitzender: Prof. Dr. Andreas Steffen, CCB, TU Dortmund

Datum der Disputation: 24.07.2019

Für meine Familie

*„Es gibt zwei Arten, sein Leben zu leben: entweder so, als wäre
nichts ein Wunder, oder so, als wäre alles ein Wunder.“*

Albert Einstein©

Danksagung

Mein spezieller Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik** für die Ermöglichung der Arbeit und das interessante und vielfältige Thema. Die kontinuierliche Unterstützung, Motivation sowie die zahlreichen und fruchtbaren Gespräche haben mich als Wissenschaftler geprägt, wofür ich mich sehr herzlich bedanken möchte. Ebenso bedanke ich mich für die Freiheiten in meiner Arbeit, die mir gegeben wurden, die Forderung der hohen Qualität an die wissenschaftliche Praxis, sowie die Möglichkeit zur Teilnahme an zahlreichen und interessanten Konferenzen.

Herrn Prof. Dr. Roland Winter möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken, sowie die zur Verfügung Stellung der Labore und Instrumente.

Ich bedanke mich bei **Andrea Jeworrek** für die freundliche Unterstützung bei allen administrativen Problemen, sowie für die Bestellung meiner Chemikalien. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei **Simone Möbitz** bedanken, die ebenfalls eine große Hilfe bei der Bestellung der Chemikalien, sowie bei der Proteinexpression und Aufreinigung gewesen ist und stets für einen reibungslosen Ablauf der Arbeit im Labor gesorgt hat.

Bei meinen ehemaligen und aktuellen Bürokollegen **Dr. Vitor Schuabb**, **Dr. Caroline Schuabb** und **Hasan Cinar** bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Auch möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Physikalische Chemie I für eine gute Zusammenarbeit bedanken. Dabei gilt ein besonderer Dank meinen Freunden **Dr. Samy Al-Ayoubi** und **Dr. Süleyman Cinar** für unsere gemeinsame Zeit.

Bei meinem Freund **Lukas Eberlein** möchte ich mich für die freundliche Übernahme der Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Partnerin **Michelle Heib** für die liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken.

Die finanzielle Unterstützung durch die **Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Forschergruppe 1979)** wird ebenfalls dankbar anerkannt.

Nicht zuletzt möchte ich **meiner Familie** und **meinen Freunden** dafür danken, dass sie immer für mich da sind und mich während meines Studiums und meiner Promotion spirituell unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| | DRUCK | 1 |
| | GRENZFLÄCHEN | 2 |
| | ÜBERBLICK | 3 |
| 2 | THEORETISCHER HINTERGRUND | 5 |
| 2.1 | BIOPHYSIKALISCHE METHODEN | 7 |
| | RÖNTGEN-REFLEKTOMETRIE (XRR) | 9 |
| | GRUNDLAGEN | 9 |
| | EXPERIMENTELLER AUFBAU | 11 |
| | RÖNTGEN-REFLEKTOMETRIE AN DÜNNEN SCHICHTEN | 12 |
| | EXPERIMENTELLES | 14 |
| | UV-VIS-SPEKTROSKOPIE | 17 |
| | GRUNDLAGEN | 17 |
| | EXPERIMENTELLER AUFBAU | 19 |
| | EXPERIMENTELLES | 22 |
| | FOURIER-TRANSFORM-INFRAROTSPEKTROSKOPIE (FTIR) | 27 |
| | GRUNDLAGEN | 27 |
| | EXPERIMENTELLER AUFBAU | 30 |
| | SPEKTROSKOPIE AN PROTEINEN | 31 |
| | EXPERIMENTELLES | 33 |
| 2.2 | CHEMIKALIEN, SOFTWARE, INSTRUMENTE | 37 |
| 3 | PROJEKT „POLYELEKTROLYT-BÜRSTEN“ | 41 |
| 3.1 | EINFÜHRUNG | 43 |
| | POLYELEKTROLYT-BÜRSTEN ALS GRENZFLÄCHEN | 43 |
| | ADSORPTION AN POLYELEKTROLYT-BÜRSTEN | 45 |
| | DAS MODELL | 46 |

| | |
|--|-----------------|
| 3.2 PRÄPARATION | 49 |
| LANGMUIR-SCHAEFER TECHNIK | 49 |
| EXPERIMENTELLE PARAMETER | 50 |
| 3.3 ERGEBNISSE | 51 |
| CHARAKTERISIERUNG DES SYSTEMS | 51 |
| ADSORPTIONSVERHALTEN MIT PROTEIN-LÖSUNG | 55 |
| ADSORPTIONSVERHALTEN MIT PUFFER-LÖSUNG | 57 |
| ADSORPTIONSVERHALTEN MIT TFP | 59 |
| 3.4 DISKUSSION | 61 |
| 3.5 ZUSAMMENFASSUNG | 67 |
| <hr/> 4 PROJEKT „MAGNETISCHE NANOPARTIKEL“ | <hr/> 69 |
| 4.1 EINFÜHRUNG | 71 |
| PROTEIN-KINETIK | 71 |
| 4.2 PRÄPARATION | 75 |
| 4.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 77 |
| CHARAKTERISIERUNG DER MAGNETISCHEN NANOPARTIKEL | 77 |
| CHARAKTERISIERUNG VON ADH | 81 |
| MICHAELIS-MENTEN KINETIK DER FREIEN UND ADSORBIERTEN ADH | 83 |
| BESTIMMUNG DES ADSORPTIONSGRADES VON ADH | 86 |
| DRUCKABHÄNGIGKEIT DER FREIEN UND ADSORBIERTEN ADH | 87 |
| 4.5 ZUSAMMENFASSUNG | 93 |
| <hr/> 5 PROJEKT „POLYELEKTROLYT-MULTISCHICHTEN“ | <hr/> 95 |
| 5.1 EINFÜHRUNG | 97 |
| POLYELEKTROLYT-MULTISCHICHTEN ALS GRENZFLÄCHE | 97 |
| 5.2 PRÄPARATION | 99 |
| 5.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 101 |
| POLYELEKTROLYTMULTISCHICHTEN OHNE CAM | 101 |
| POLYELEKTROLYTMULTISCHICHTEN MIT CAM | 105 |
| DRUCKEFFEKT AUF POLYELEKTROLYTMULTISCHICHTEN | 107 |
| 5.5 ZUSAMMENFASSUNG | 111 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 6 | PROJEKT „VIRALE FUSIONSPEPTIDE“ | 113 |
| 6.1 | EINFÜHRUNG | 115 |
| | VIRALE MEMBRANFUSION | 115 |
| | MONOOLEIN | 116 |
| | FUSIONSPROTEINE | 117 |
| | DAS MODELL | 119 |
| 6.2 | PRÄPARATION | 123 |
| 6.3 | ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 125 |
| | CHARAKTERISIERUNG VON MONOOLEIN | 125 |
| | PROZESSIERUNG DER SPEKTREN | 129 |
| | MONOOLEIN ALS REFERENZ | 129 |
| | CHARAKTERISIERUNG DER FUSIONSPEPTIDE | 132 |
| | FUSIONSPEPTIDE IN MONOOLEIN EINGEBAUT | 135 |
| 6.4 | ZUSAMMENFASSUNG | 139 |
| 7 | ZUSAMMENFASSUNG | 141 |
| 8 | SUMMARY | 145 |
| 9 | ANHANG | 149 |
| | LITERATURVERZEICHNIS | 153 |
| | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 161 |
| | PUBLIKATIONSVERZEICHNIS | 165 |
| | KONFERENZBEITRÄGE | 167 |

1 Einleitung

Die meisten Studien, die sich mit der Adsorption von Biomolekülen auf Materialoberflächen beschäftigen, konzentrieren sich auf molekulare Strukturänderungen und Wechselwirkungsenergien. Diese Aspekte sind ohne Zweifel von grundlegender Bedeutung. Entsprechende Volumenänderungen, die durch die Anwendung von hohen Drücken zugänglich werden, sind jedoch weitgehend unbekannt, obwohl sie grundlegende Erkenntnisse über die Systeme liefern können. Hier wird dieser Ansatz ausgenutzt, um neue Einblicke in die Biokompatibilität von Grenzflächen und den Adsorptionsmechanismus an sich zu liefern.

Druck

Zwei fundamentale Faktoren finden heutzutage im Bereich der Biowissenschaften, der Biotechnologie und in unserem täglichen Leben breite Anwendung: der Druck und die Temperatur. Insbesondere der Druck ist für die jüngsten Entwicklungen nicht nur in der Grundlagenforschung, der Lebensmittelwissenschaft und der Medizin, sondern auch in der Biochemie, der physikalischen Chemie und der Technik unabdingbar geworden [1]. Ein wesentlicher Grund für die steigende Popularität der Anwendung von Druck ist, dass sich Druckeffekte auf biologische Makromoleküle signifikant von Temperatureffekten und chemischen Effekten unterscheiden. Aus thermodynamischer Sicht zeigt Druck eine Spezifität, die durch andere Faktoren so nicht erreicht werden kann. Wo mit Erhöhung der Temperatur sowohl energetische als auch volumetrische Effekte, aufgrund der thermischen Ausdehnung, eine Rolle spielen, stehen bei Druckerhöhung, aufgrund der Kompressibilität, hauptsächlich volumetrische Aspekte im Vordergrund. Zudem können über die Beziehung zwischen Kompressibilität und Volumenfluktuation auch Informationen über die Dynamik des Systems erhalten werden [2]. Gerade beim Einfluss auf Proteine und deren Eigenschaften ist der Druckeffekt besonders groß. Durch Umgestaltung oder Bruch von nicht kovalenten Bindungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen, wird die Stabilität der charakteristischen Tertiärstruktur von Proteinen verändert, welche für die biologische Funktion unbedingt notwendig ist [3]. Hinzu kommen Wechselwirkungen von Proteinen mit der Hydrathülle, zwischen den Proteinen, sowie zwischen Protein und anderen Bestandteilen des Systems oder Grenzflächen, die ebenfalls durch Druck beeinflusst werden können. In der Literatur gibt es deswegen eine Reihe von Studien, die sich mit Druck als solchem beschäftigen. Die Schwerpunkte liegen dabei meist darauf,

diesen als Werkzeug zu verwenden, wie bei der Ultrahochdruck-Inaktivierung der Prionen-Infektiosität in verarbeitetem Fleisch [4]. Auch als experimentelle Variable zur Erweiterung der Energielandschaft $E(T)$ um eine weitere Dimension, sei es zur Strukturuntersuchung oder Reaktionsoptimierung, wird Druck häufig verwendet [5]. In dieser Arbeit hingegen wurde die Einzigartigkeit dieses Parameters verwendet, um Adsorptionsvorgänge anhand der eingegangenen Wechselwirkungen mit diversen Grenzflächen besser verstehen zu können.

Grenzflächen

Wechselwirkungen mit Grenzflächen stellen eine wichtige Eigenschaft von Proteinen dar, die dazu führt, dass sich bereits nach kurzer Zeit ein Proteinadsorbat aus mindestens einer Moleküllage bildet. Obwohl die Bildung von Proteinadsorbaten oft nur am Rande betrachtet wird, spielen sie eine wichtige Rolle – sowohl in vorteilhafter als auch in nachteiliger Weise [6]. Vorteilhaft ist zum Beispiel die Immobilisierung von Proteinen oder Antikörpern bei der Verwendung als Festphasen-Immuntests in der medizinischen Diagnostik oder beim Einsatz in Protein-Biochips [7]. Nachteilig dagegen ist die unerwünschte Bildung von Proteinadsorbaten, wie die Bildung eines Lysozymfilms auf der Oberfläche von Kontaktlinsen oder Protein- und Bakterienablagerungen auf Implantaten. Ein Lysozymfilm auf der Kontaktlinse kann nicht nur ihre Qualität bereits nach kurzer Zeit verringern, sondern auch zu schweren Entzündungsreaktionen am Auge führen. Eine Verunreinigung von künstlichen Implantaten kann von Blutgerinnungskaskaden bis hin zur Abstoßung des Produkts mit schweren Folgen führen [6]. Es erscheint also sinnvoll, sich mit den Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Grenzflächen zu beschäftigen. Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, die Proteinadsorption zu kontrollieren, indem die Oberfläche entsprechend modifiziert wird. Zum einen ist es möglich, die nachteiligen Effekte zu reduzieren oder zu eliminieren, indem die Grenzfläche proteinresistent gemacht wird. Zum anderen ist es denkbar, die Aktivität oder Funktion der adsorbierten Proteine und Enzyme beizubehalten oder zu verbessern, indem eine native oder optimierte Umgebung durch die Oberflächenmodifikation geschaffen wird. Viele unterschiedliche Anwendungen sind möglich, und es gibt zahlreiche Studien, die sich mit der Proteinadsorption und diversen Grenzflächen beschäftigen. Es gibt verschiedene Theorien zu den herrschenden Wechselwirkungen, doch der Adsorptionsprozess an sich ist noch nicht vollständig verstanden.

Da ein genaues Verständnis über den Adsorptionsprozess, sowie die dafür verantwortlichen Wechselwirkungen unabdingbar für das Design und die Anwendung solcher modifizierten Grenzflächen ist, ist dies auch Zweck dieser Arbeit. In dieser Arbeit wird Druck als Parameter

verwendet, um neue Erkenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Proteinen und diversen Grenzflächen zu gewinnen. Die neu erhaltenen Einblicke in das System „Protein-Grenzfläche“ werden ausführlich hinsichtlich des Adsorptionsprozesses diskutiert und mit der aktuellen Literatur verglichen.

Überblick

Die vorliegende Arbeit besteht aus sieben Kapiteln. Im Anschluss werden in Kapitel 2 die Grundlagen der verwendeten biophysikalischen Methoden erläutert. In Kapitel 3 bis Kapitel 6 werden dann die neu erhaltenen Ergebnisse der bearbeiteten Projekte vorgestellt und diskutiert, wobei zuvor eine ausführliche Einleitung in das jeweilige Thema gegeben wird. Im letzten Kapitel werden abschließend alle gesammelten Erkenntnisse zusammengetragen und ein kurzer Ausblick gegeben.

Das im dritten Kapitel beschriebene erste Projekt stellt eine Weiterführung der Masterarbeit dar [8], dessen Ergebnisse während der Promotion aufgearbeitet und publiziert werden konnten [9]. Hier wurde der einfache Fall der Proteinadsorption von α -Chymotrypsin, welches eine positive Nettoladung trägt, an einer negativ geladenen Polyelektrolytbürste untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse und die übrig gebliebenen Fragen führten zum ersten Projekt dieser Arbeit. Hier wurde der komplexere Fall der Proteinadsorption von Calmodulin, welches eine negative Nettoladung trägt, an der gleichen negativen Polyelektrolytbürste studiert. Um den Effekt der Ladungsvariation noch besser beschreiben zu können, wurde der pH-Wert des Systems variiert und die Eigenschaft von Calmodulin, das Substrat Trifluoperazin unter einer Konformationsänderung zu binden, ausgenutzt.

Darauf aufbauend entstand das zweite Projekt, welches in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oliver Reiser (Regensburg) durchgeführt wurde. Hier wurde nun ein positiv geladenes Dendrimer als Grenzfläche verwendet. Dabei wurden zwei unterschiedliche Modifikationen des Dendrimers untersucht. Die erste Modifikation besteht aus Polyethylenimin, was eine pH-abhängige positive Ladung aufweist. Bei der zweiten Modifikation wurde das Imin methyliert, um eine permanente positive Ladung der Grenzfläche zu gewährleisten. Die Besonderheit dieser Grenzflächen liegt darin, dass hiermit magnetische Nanopartikel beschichtet wurden, was diese sowohl für die Industrie als auch für die Medizin interessant macht. Eine ausführliche Charakterisierung beider Systeme wurde durchgeführt, und es wurde die Adsorption eines negativ

geladenen Enzyms (Alkoholdehydrogenase), sowie dessen Aktivität studiert. Abschließend wurden die Volumenprofile des freien Enzyms, sowie des an beiden Grenzflächen adsorbierten, miteinander verglichen.

Da neben den Polyelektrolytbürsten auch diverse andere für die Proteinimmobilisierung relevante Grenzflächen gibt, wurde im dritten Projekt das Protein Calmodulin in zwei unterschiedliche Polyelektrolytmultischichten eingebettet und untersucht. Der Aufbau einer solchen Polyelektrolytmultischicht wurde bereits von Süleyman Cinar während seiner Doktorarbeit ausführlich beschrieben [10]. In diesem Projekt sollte der Aufbau zweier unterschiedlicher Multischichten genauer charakterisiert werden. Dabei wurde das System hinsichtlich seiner Stabilität gegenüber Lagerung, Pufferwechsel und insbesondere Druck bis zu 2000 bar untersucht. Mit dem Einbau von Calmodulin, unter Ausnutzung dessen großer Konformationsänderung durch Ligandenbindung, sollte ein biologisch schaltbares System erstellt und charakterisiert werden.

Das vierte und letzte Projekt beleuchtet die Interaktion von Peptiden mit einer biologischen Grenzfläche. Hier wurden die Wechselwirkungen viraler Fusionspeptide mit einer Modellmembran untersucht, da dies den ersten Schritt einer viralen Fusion darstellt. Als Modellmembran wurde Monoolein verwendet, da das Molekül sowohl flüssig-kristalline als auch kubische Phasen ausbildet, was den Vorgang während der Membranfusion näherungsweise nachahmt. Es wurden zwei Fusionspeptide unterschiedlicher Virusklassen, sowie ein Kontrollpeptid verwendet. Der Schwerpunkt des Projektes liegt dabei auf der ausführlichen Charakterisierung der Systeme und der strukturgebenden Komponenten. Zu diesem Projekt wurden während der Promotion eine Bachelorarbeit [11] und eine Masterarbeit [12] betreuet, deren Ergebnisse ebenfalls mit in die Diskussion einfließen und an entsprechender Stelle vermerkt sind.

2 Theoretischer Hintergrund

Im folgenden Kapitel werden die wichtigsten der verwendeten Methoden erläutert, wobei im Wesentlichen auf die Grundlagen, die Funktion und experimentellen Gegebenheiten eingegangen wird. Bedingungen und verwendete Parameter der einzelnen Messungen sind den jeweiligen Projekt-Kapiteln zu entnehmen. Außerdem werden die verwendeten Chemikalien, Software und Instrumente aufgelistet. Auch hierbei sind genauere Informationen zur Präparation und den Konzentrationen in den einzelnen Projekt-Kapiteln zu finden. Da sich die vier bearbeiteten Projekte mit unterschiedlichen Systemen befassen, ist der wissenschaftliche Hintergrund der einzelnen Studien ebenfalls in den Einleitungen der Projekt-Kapitel beschrieben.

Der Inhalt dieses Kapitels wurde im Wesentlichen auf der Grundlage von [13, 14, 15] erstellt. Die Abbildungen wurden mithilfe von *CorelDRAW X7* nach den Informationen oder Vorbildern der genannten Literatur angefertigt.



2.1 Biophysikalische Methoden

Nachstehend sind die Grundkonzepte der für die Hauptergebnisse der durchgeführten Studien verwendeten Methoden beschrieben. Die meisten verwendeten biophysikalischen Methoden haben eines gemeinsam und zwar, dass eine Wechselwirkung des beobachteten Systems mit elektromagnetischer Strahlung Informationen zur Struktur des Systems liefert.

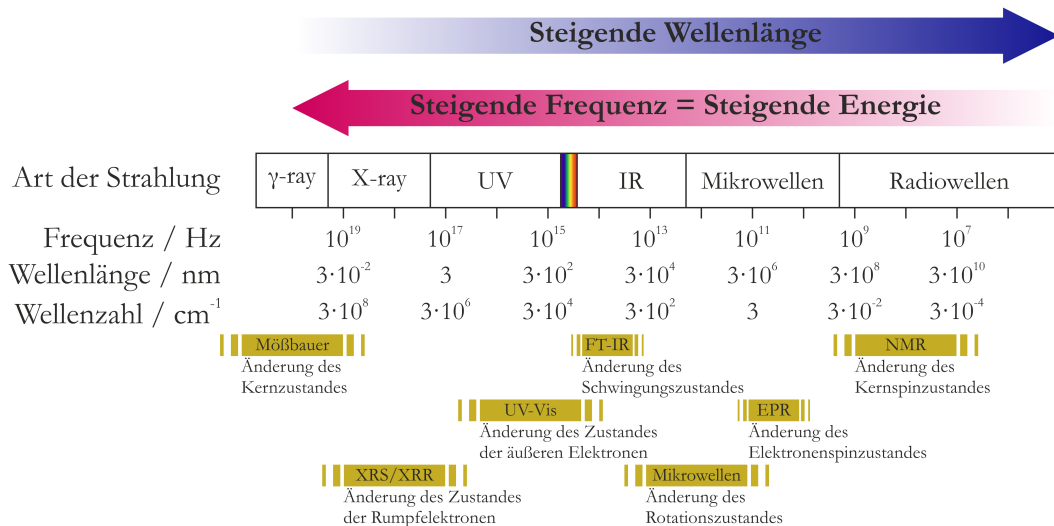


Abb. 2-1 Schematische Darstellung eines Spektrums elektromagnetischer Strahlung. Charakterisiert durch Frequenz, Wellenlänge und Wellenzahl. Die Grenzen der Strahlungsarten, sowie der spektroskopischen Methoden wurden grob gezogen, da die Übergänge fließend sind.

Die Wechselwirkung kann dabei in Form von Absorption, Extinktion, Streuung oder Reflexion stattfinden. Die Art der erhaltenen Informationen hängt hauptsächlich von der verwendeten Strahlungsquelle ab (Abb. 2-1). Strahlung unterschiedlicher Energie wechselwirkt mit unterschiedlichen Komponenten der beobachteten Systeme, bzw. regt unterschiedliche Übergänge und Zustände an. Zusätzlich gibt es noch weitere spezifische Bedingungen, die ein System erfüllen muss, um angeregt zu werden und die entsprechenden Aktivitäten zu zeigen.

Standard-Methoden, sowie einmalig oder lediglich für die Charakterisierung oder Präparation verwendete Methoden werden im Folgenden nicht genauer erläutert.

Röntgen-Reflektometrie (XRR)

Zusätzlich zur oben genannten Literatur wurden für dieses Kapitel insbesondere [16, 17, 18] herangezogen.

Die Röntgen-Reflektometrie (XRR) gehört zu der Familie der Röntgendünnschicht-Messtechniken. Auch wenn diese Methode ebenfalls auf der Voraussetzung eines dünnen Films basiert, ist es keine Technik zur Untersuchung des Beugungsphänomens. Hier werden die Reflexionsintensitätskurven des streifenden einfallenden Röntgenstrahls analysiert, um Informationen über den Film zu erhalten. Somit ist mit der Röntgen-Reflektometrie eine Vermessung des Elektronendichteprofiles mit Å-Auflösung senkrecht zur Grenzfläche möglich, was mit sonst keiner anderen Methode realisierbar ist. Zusammenfassend lassen sich folgende Eigenschaften der Methode nennen:

- Untersuchung von einkristallinen, polykristallinen oder auch amorphen Materialien
- Zerstörungsfreie Abschätzung der Oberflächenrauheit (3 – 5 nm)
- Bestimmung der Schichtstruktur (Elektronendichteprofil) eines Mehr- oder Einschichtsystems
- Messung der Filmdicke (1 – 1000 nm)

Grundlagen

Trifft eine elektromagnetische Welle auf eine planare Grenzfläche, so wird sie zum Teil reflektiert und zum Teil gebrochen. Entscheidend ist dabei der Einfallswinkel. Ist dieser kleiner als der kritische Winkel, so wird die einfallende Welle komplett reflektiert. Entspricht dieser genau dem kritischen Winkel, so wird die einfallende Welle genau in die Oberflächenebene hinein gebrochen, und der gebrochene Strahl propagiert entlang der Grenzfläche. Ist der Winkel hingegen größer als der kritische Winkel, so wird ein Teil der Strahlung in das Untergrundmaterial hinein gebrochen (Abb. 2-2). Der kritische Winkel hängt ausschließlich von der Elektronendichte des obersten (Luft) und des untersten (Silizium) Materials ab. Nach dem Brechungsgesetz gilt:

$$n_1 \cdot \cos(\theta_1) = n_2 \cdot \cos(\theta_2). \quad (2-1)$$

Im Fall des kritischen Winkels beträgt $\theta_2 = 0$ und, bei einer Messung gegen Luft, $n_1 = 1$, was den Ausdruck liefert:

$$n_2 = \cos(\theta_c). \quad (2-2)$$

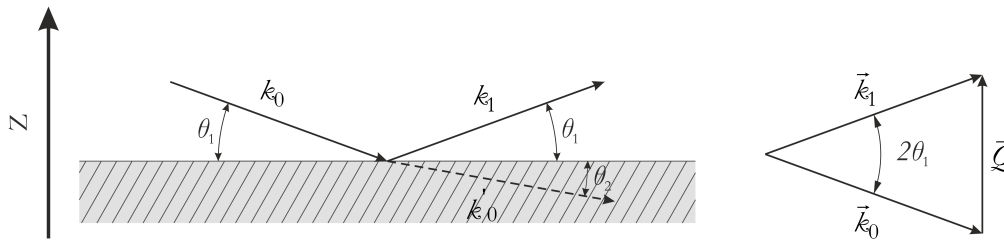


Abb. 2-2 Streugeometrie: Reflexion und Refraktion an einer planaren Grenzfläche, sowie die Streuung an einem Teilchen zur besseren Verdeutlichung des Wellenvektorübertrags.

Da für nicht schwere Atome der Brechungsindex n im Wesentlichen von der Elektronendichte ρ abhängt, kann bei bekannter Grenzfläche der kritische Winkel θ_c (und umgekehrt) genau bestimmt werden aus:

$$n_2 = 1 - \frac{\lambda^2}{2\pi} \cdot \rho_2 \cdot r_e, \quad (2-3)$$

mit r_e als den klassischen Elektronenradius. Bei der Röntgen-Reflektometrie wird also die Intensität des reflektierten Strahls als Funktion des Einfallswinkels gemessen. Aufgetragen wird die Reflektivität R gegen den Wellenvektorübertrag Q :

$$R = \frac{I}{I_0} \quad Q = \frac{4 \cdot \pi}{\lambda} \sin(\theta), \quad (2-4)$$

wobei aufgrund der elastischen Streuung an der Grenzfläche nur die z -Komponente betrachtet wird.

Eine typische Reflektivitätskurve an einer kontinuierlichen Grenzfläche kann also grob in drei Bereiche unterteilt werden:

- Unterhalb des kritischen Winkels – ausschließlich Totalreflexion, $I = I_0$ bzw. $R = 1$
- Oberhalb des kritischen Winkels – Kiessig-Oszillationen, Periodizität dieser liefert die Dicke D der gesamten Schicht:

$$\Delta Q = \frac{2 \cdot \pi}{D} \quad (2-5)$$

- Oberhalb des kritischen Winkels – Bragg-Reflexe, Position dieser liefert die Dicke d der periodischen Struktur:

$$Q_n = n \cdot \frac{2 \cdot \pi}{d} \quad (2-6)$$

Um weitere Informationen aus der Reflexionskurve zu erhalten, muss deren komplexer Verlauf rekursiv angepasst werden (s. Abschnitt „Röntgen-Reflektometrie an dünnen Schichten“).

Experimenteller Aufbau

Die Apparatur besteht aus einer Röntgenquelle, diese kann beweglich oder fest sein, einem Detektor, der immer beweglich ist, und einem Probenstisch, der in der Höhe und bei fester Quelle auch im Neigungswinkel verstellbar ist. In der Röntgenröhre wird durch Abbremsen von beschleunigten Elektronen an der Anode ein Röntgenspektrum erzeugt. Durch den Monochromator wird die charakteristische K_{α} -Strahlung selektiert und durch den Absorber die Intensität dieser gesteuert, um den Detektor nicht zu überlasten. Bei richtiger Justage trifft die Röntgenstrahlung auf die Probe, wird an den Elektronen gestreut und vom Detektor aufgezeichnet (Abb. 2-3).

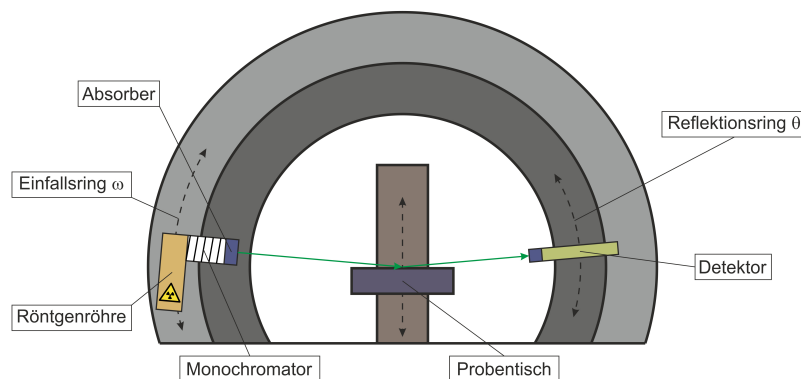


Abb. 2-3 Schematischer Aufbau des Seifert XRD 3000 TT. Der Probenstisch ist stets waagrecht (aber höhenverstellbar), Röntgenquelle- und Detektorwinkel können variiert werden. Auf dem Probenstisch kann die Probe selbst bzw. die Probenzelle platziert werden.

Da bei der Reflektometrie mit sehr kleinen Winkeln gearbeitet wird ($0.05^\circ < \theta < 1.5^\circ$), ist eine genaue Justage wichtig. An jedem Messtag wird zunächst die Position des Detektors bezüglich der Strahlenquelle kalibriert. Hierfür wird, bei heruntergefahrenem Probenstisch, der Einfallswinkel ω gleich null gesetzt und der Reflexionswinkel θ gescannt. Am Intensitätsmaximum wird anschließend $\theta = 0$ festgelegt. Somit ist gewährleistet, dass der Röntgenstrahl bei einem Winkel von null genau in den Detektor trifft. Anschließend wird der Tisch hochgefahren, bis der Röntgenstrahl verdeckt wird. Die Position des Tisches wird anschließend auf den Wendepunkt des Intensitätsverlaufs eingestellt. Als nächstes wird „1:1 relative“ gleich 0.2° gesetzt und ein „Rocking-Scan“ durchgeführt. Dabei wird ω und θ variiert, wobei deren Summe bei 0.2° fest gehalten wird. Somit wird durch Einstellen des Einfallswinkels ω auf das Maximum die relative

Neigung des Tisches ausgeglichen. Sind die Parameter für die z -Achse und den Einfallswinkel perfekt eingestellt kann anschließend die Messung durchgeführt werden indem ein „1:1 relative-Scan“ gestartet wird.

Die Justage der Hochdruckmessungen am DELTA-Synchrotron wird nach einem ähnlichen Prinzip durchgeführt. Der Unterschied hierbei ist, dass die Strahlenquelle eine feste Position hat und der Probenstisch in seiner Neigung variabel ist.

Röntgen-Reflektometrie an dünnen Schichten

Bei der praktischen Anwendung und Auswertung der Röntgenreflektometrie treten einige Schwierigkeiten auf. Zum einen muss eine Korrektur bezüglich der Intensitätsabschwächung im Bereich kleiner Winkel, auch *Footprint* genannt, vorgenommen werden. Zu diesem Phänomen kommt es, weil der eingesetzte Röntgenstrahl eine gewisse Breite besitzt. Somit ist also die bestrahlte Fläche abhängig von Einfallswinkel und bei kleinen Winkeln sogar größer als die Probenfläche (Abb. 2-4).

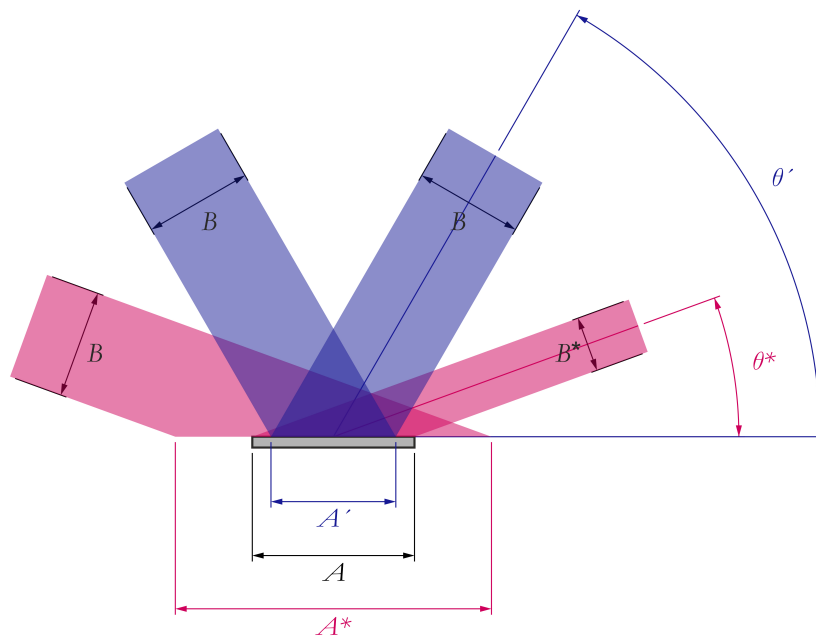


Abb. 2-4 Schematische Darstellung des Querschnitts der Strahlgeometrie. A gibt die Fläche der Probe an. B gibt die Breite des Röntgenstrahls an. A' gibt die von Röntgenstrahl beleuchtete Fläche beim Einfallswinkel θ' an. A^* gibt die von Röntgenstrahl beleuchtete Fläche beim Einfallswinkel θ^* an. B^* stellt die Breite des reflektierten Röntgenstrahls dar, der aufgrund der Intensitätsabschwächung durch den *Footprint* schmaler ist.

Dies führt dann dazu, dass die Probe eine vom Einfallswinkel abhängige Intensität I_0 zeigt und somit bei der herkömmlichen Berechnung der Reflektivität (2-4) ein Fehler auftritt. Dieser kann

korrigiert werden, indem der Bereich vor dem kritischen Winkel linear angenähert und bis I_0 extrapoliert wird. Es wird eine zusammengesetzte I_0' Funktion aus der linearen Regression und I_0 erhalten.

Zum anderen kommt es bei der vollständigen Beschreibung der Reflektivitätskurve zu einigen Herausforderungen, die bisher vernachlässigt worden sind. Oberhalb des kritischen Winkels muss die Reflektivität R über den Reflektivitätskoeffizienten r_{01} beschreiben werden:

$$R = |r_{01}|^2 = \left| \frac{k_{0,z} - k_{1,z}}{k_{0,z} + k_{1,z}} \right|^2 = \left| \frac{Q_0 - Q_1}{Q_0 + Q_1} \right|^2 = \left| \frac{n_0 \sin(\theta_0) - n_1 \sin(\theta_1)}{n_0 \sin(\theta_0) + n_1 \sin(\theta_1)} \right|^2. \quad (2-7)$$

Diese Beschreibung ist notwendig, da sich sowohl I_0 , als auch I aus Reflexion und Brechung zusammensetzen, die unterschieden werden müssen. Diese als Fresnel-Gleichung bekannte Beschreibung gilt allerdings ausschließlich für glatte Grenzflächen, womit die Reflektivität ausschließlich von den Elektronendichten abhängt. In der Realität sind allerdings alle Grenzflächen rau. Wird diese Eigenschaft der Grenzfläche ebenfalls betrachtet, so muss der Reflektivitätskoeffizient mit einem exponentiellen Term ergänzt werden, der die Rauheit σ berücksichtigt:

$$r_{01} = \frac{Q_0 - Q_1}{Q_0 + Q_1} \cdot e^{-0.5 \cdot Q_0 \cdot Q_1 \cdot \sigma_{01}^2}. \quad (2-8)$$

Somit ist die Reflexion an einer unbeschichteten realen Grenzfläche genau beschrieben. Ist die Grenzfläche aber beschichtet, so kommt neben der weiteren Reflexion- und Brechungsebene auch noch eine weitere Variable hinzu – die Schichtdicke (Abb. 2-5).

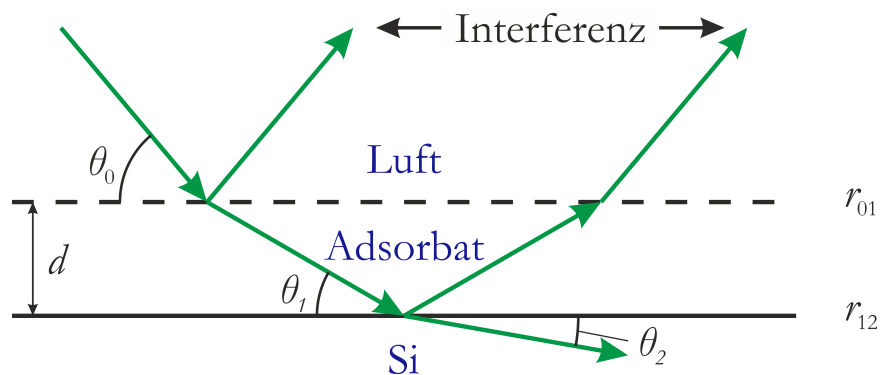


Abb. 2-5 Streugeometrie an einer einfach beschichteten Grenzfläche zur Verdeutlichung des Parratt-Algorithmus.

Dies führt dazu, dass der totale Reflektivitätskoeffizient r nicht nur eine Zusammensetzung der Reflektivitätskoeffizienten r_{01} und r_{12} an den einzelnen Ebenen darstellt, sondern auch mit einem weiteren exponentiellen Term, der die Schichtdicke d enthält, gewichtet werden muss:

$$r = \frac{r_{01} + r_{12} \cdot e^{i \cdot Q_1 \cdot d_1}}{1 + r_{01} \cdot r_{12} \cdot e^{i \cdot Q_1 \cdot d_1}} \quad (2-9)$$

Doch für gewöhnlich ist die Realität noch komplexer. Neben der Tatsache, dass häufig periodischen Multischichten ausgebildet werden, gibt es auch unterschiedliche Elektronendichten innerhalb einer Schicht. Da Röntgenstrahlung an Elektronen gestreut wird, führen sämtliche Gradienten in der Elektronendichte zu „neuen Schichten“. Um also den endgültigen Reflektivitätskoeffizienten und somit die Reflektivität zu erhalten, müssen rekursiv von unten nach oben alle k Schichten zusammengefasst werden:

$$r'_{k-2,k-1} = \frac{r_{k-2,k-1} + (r'_{k-1,k}) \cdot e^{i \cdot Q_{k-1} \cdot d_{k-1}}}{1 + r_{k-2,k-1} \cdot (r'_{k-1,k}) \cdot e^{i \cdot Q_{k-1} \cdot d_{k-1}}} \quad (2-10)$$
$$(r'_{k-1,k}) = \frac{r_{k-1,k} + r_{k,k+1} \cdot e^{i \cdot Q_k \cdot d_k}}{1 + r_{k-1,k} \cdot r_{k,k+1} \cdot e^{i \cdot Q_k \cdot d_k}}$$

Die Analyse erfolgt also so, dass alle Modellparameter (Elektronendichten, Schichtdicken, Rauheiten) solange variiert werden, bis die berechnete Reflektivität der gemessenen gleicht, bzw. die kleinstmögliche Abweichung zeigt. Die Rekursion wird dabei von der Software Parratt32 durchgeführt, wobei das Modell zuvor durch den Anwender gewählt werden muss.

Experimentelles

Die meisten der Reflektivitätskurven sind am arbeitskreiseigenen Reflektometer aufgenommen worden. Nachstehend sind einige wichtige technische Daten zum Gerät selbst, sowie zu den verwendeten Zellen aufgeführt:

- Kennzeichnung: Seifert XRD 3000 TT
- Hersteller: GE Inspection Technologies, Ahrensburg, Deutschland
- Röntgenquelle: Molybdän (K_α), $\lambda = 0.71 \text{ \AA}$, $E = 17.5 \text{ keV}$
- Temperaturregelung: Externes Wasserbad – Julabo F 32
- Druckindikator: TecSis P3298B093001 (elektrisch)

Die Standard-Methode der Reflektometrie an der Luft ist für biologische Systeme nicht besonders sinnvoll, weil die dünnen Schichten sehr schnell austrocknen und somit andere Eigenschaften aufweisen könnten als in wässriger Umgebung. Die Messung in wässriger Lösung ist zwar grundsätzlich möglich, bringt allerdings große Schwierigkeiten mit sich. Zum einen können viele Systeme (wie z. B. Modellmembranen) nicht untersucht werden, weil diese sich bei Kontakt

mit Wasser oft ablösen. Zum anderen ist der Kontrast zwischen den Elektronendichten von Wasser und der Probe verhältnismäßig gering, was entweder zu einer nicht brauchbaren Auflösung führt oder signifikant höhere Intensitäten erfordert, als es mit der Mo-Röntgenröhre möglich ist. Um diese Probleme zu umgehen, wurde von Claus Czeslik eine Hydratationszelle gebaut, welche dafür sorgt, dass die Luftfeuchtigkeit bei 100 % gehalten wird. Dies stellt einen Kompromiss dar, weil die beschichtete Probe stets hydratisiert und der Kontrast dennoch gut bleibt, um vernünftige Intensitäten und Auflösungen zu erhalten.

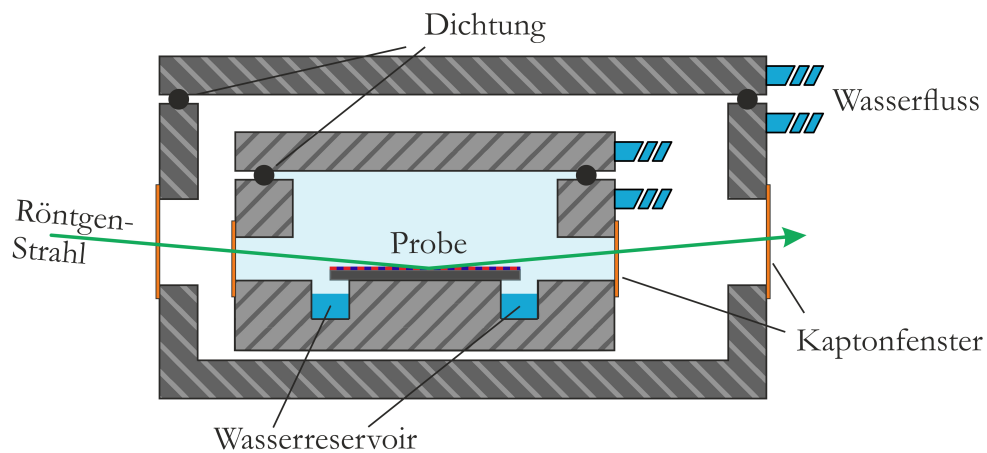


Abb. 2-6 Schematische Darstellung des Querschnitts der verwendeten Hydratationszelle für die Röntgenreflektometrie-Messungen am Seifert XRD 3000 TT.

- Hydratationszelle: Eigenbau (Prof. Dr. Claus Czeslik, TU Dortmund)(Abb. 2-6)
Maße – 105 mm x 70 mm x 85 mm
Probe – Plättchen bis 20 mm x 15 mm
Fenster – Kapton

Für die Hochdruckmessungen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Julia Nase (TU Dortmund) eine Messzeit am DELTA (TU Dortmund) durchgeführt. Es wurde deren Zelle verwendet, die sich im Aufbau, allerdings nicht in der Funktion, unterscheidet. Hier ist das umgebende Medium nicht mehr Luft mit hoher Feuchtigkeit, sondern Puffer-Lösung. Da die Intensität der Synchrotron-Strahlung signifikant höher ist als die einer Röntgenröhre, ist es hierbei möglich Messungen in wässriger Lösung durchzuführen. Der Druck wird mithilfe einer hydraulischen Handpresse aufgebaut.

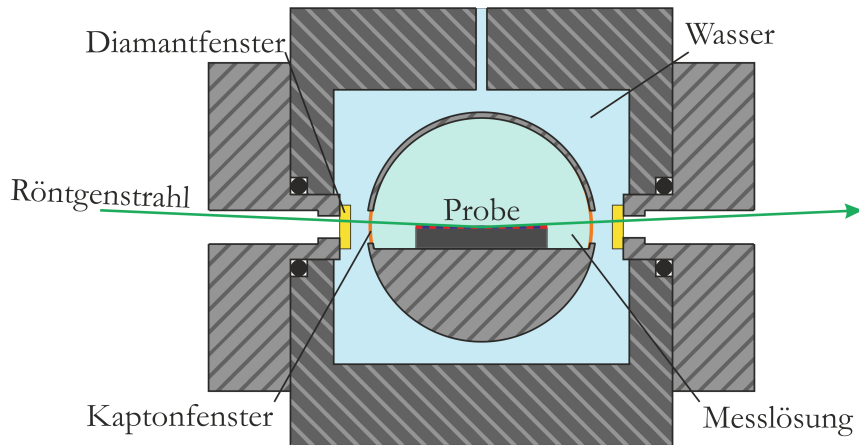


Abb. 2-7 Schematische Darstellung des Querschnitts der verwendeten Druck-Zelle für die Röntgenreflektometrie-Messungen am DELTA. Abbildung erstellt nach dem Vorbild in [19].

- Hochdruck-Zelle: Eigenbau (Prof. Dr. Metin Tolan, TU Dortmund) (Abb. 2-7)
 - Maße – 98 mm x 90 mm x 80 mm
 - Probe – Plättchen bis 7.6 mm x 7.6 mm
 - Folie – Kapton
 - Fenster – Diamant
 - Druckregelung – Nova Swiss (Hydraulikpresse)

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, erfolgt die Analyse der erhaltenen Reflektivitätsdaten zwar mittels einer Software, doch das Modell wird vom Anwender gewählt. Auch hier ist unbedingt darauf zu achten, dass das Modell möglichst einfach gewählt wird, da aufgrund der vielen Variablen eine Überparametrisierung droht. Zwar ist die Auflösung der Methode im Å-Bereich, doch aufgrund des flächenförmigen Strahls kann die laterale Struktur nicht aufgelöst werden. Es sollte also stets eher ein einfacheres Modell verwendet werden, welches dafür ein vernünftiges Ergebnis liefert, als ein hochaufgelöstes, welches aufgrund der Überparametrisierung willkürliche Daten erzeugt.

UV-Vis-Spektroskopie

Grundsätzlich handelt es sich immer um eine spektroskopische Methode, wenn auf der x-Achse, in welcher Form auch immer, eine Energie aufgetragen ist. Wenn es sich um eine spektroskopische Methode handelt, gibt es drei Arten, das Signal darzustellen:

- Intensität: Signal – I
- Extinktion: Auslöschung – $E = -\lg(I/I_0) = \lg(I_0/I)$
- Transmission: Durchlässigkeit – $T = I/I_0$

Mit dem gesamten elektromagnetischen Spektrum lässt sich eine Vielzahl an Methoden abdecken (Abb. 2-1) und viele Informationen (chemische Zusammensetzung, strukturelle Charakterisierung, elektronische Eigenschaften) über die vorliegende Probe erhalten. Der bei der UV-Vis-Spektroskopie verwendete spektrale Bereich liegt für gewöhnlich zwischen 200 und 800 nm.

Grundlagen

Die Absorption von sichtbarer und ultravioletter (UV) Strahlung hängt mit der Anregung von Elektronen auf höhere Energieniveaus zusammen. Da die Energieniveaus der Materie quantisiert sind, kann nur Licht mit einem genauen Energiegehalt Übergänge hervorrufen und Elektronen von einer Ebene zur anderen durch Absorption anheben. Die möglichen elektronischen Übergänge, die das Licht verursachen kann sind in Abb. 2-8 dargestellt.

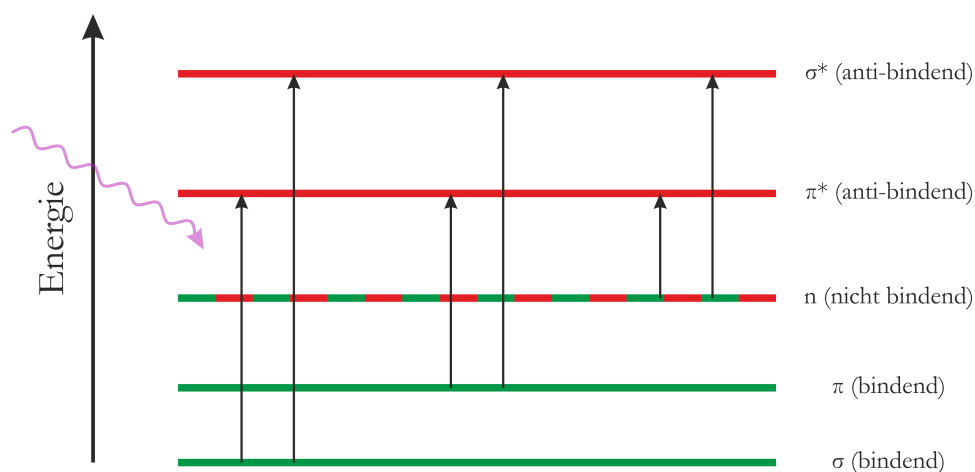


Abb. 2-8 Schematische Darstellung der möglichen elektronischen Übergänge in einem Molekül bei der Anregung mit UV-Vis-Strahlung.

Für jedes System ist die energetische Lage der Molekülorbitale genau festgelegt und somit auch die für eine Anregung benötigte Energie. Je größer der Abstand zwischen zwei Energiezuständen

ist, desto höher ist die benötigte Energie und desto kleiner ist die Wellenlänge der für einen Übergang benötigten Strahlung. Trifft also weißes Licht (gesamtes UV-Vis-Spektrum) auf eine Probe, werden alle Übergänge der passenden Energien angeregt und diese Wellenlängen aus dem eingestrahlten Spektrum absorbiert. Diese fehlen dann im detektierten Spektrum, und die Probe erscheint in der komplementären Farbe.

Sind die Elektronen einmal angeregt, so verweilen diese in den energetisch höheren und somit ungünstigeren Zuständen nicht ewig. Für die Desaktivierung eines solchen angeregten Zustandes gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten, die im JABLONSKI-Diagramm zusammengefasst werden (Abb. 2-9). Der erste Schritt der stattfindet ist die strahlungslose Desaktivierung durch interne Konversion (IC). Hierbei findet innerhalb des ersten angeregten Singulett-Zustandes (S_1) durch Schwingungsrelaxation ein Energieverlust statt, der dazu führt, dass das Elektron sich in dem niedrigsten Schwingungsniveau ($v=0$) befindet. Von diesem Punkt aus gibt es einige Möglichkeiten der weiteren Desaktivierung. Zu den strahlungsfreien gehört bei gleich bleibender Spinnultiplizität z.B. die weitere interne Konversion (IC), ein Energieverlust durch Löschung (Q) oder durch eine Übertragung der Energie auf ein anderes System (FRET) oder unter Änderung der Spinnultiplizität (T_1) durch Interkombination (ISC).

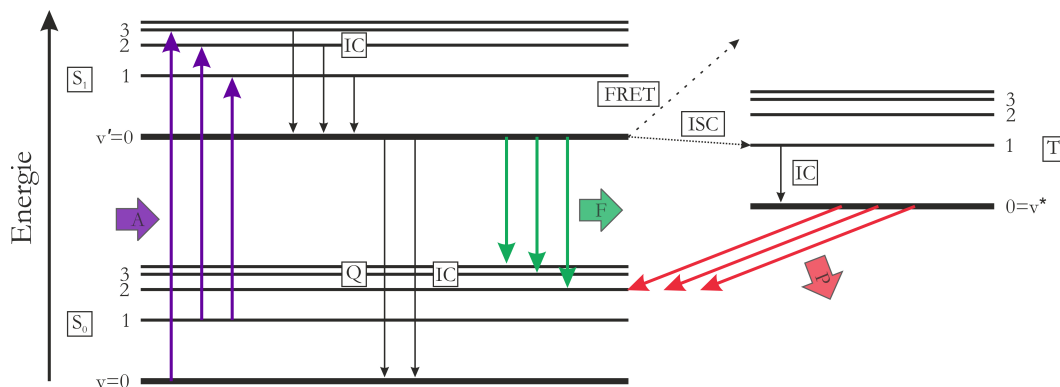


Abb. 2-9 Schematische Darstellung des JABLONSKI-Diagramms. Gezeigt sind: Absorption (A), Singulett – Grundzustand (S_0), Singulett – angeregter Zustand (S_1), Schwingungszustände (v), Interne Umwandlung (IC), Löschung (Q), Fluoreszenz (F), Interkombination (ISC), Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), Triplett – angeregter Zustand (T_1), Phosphoreszenz (P).

Unter Strahlungsabgabe kann es ebenfalls zu einer Desaktivierung kommen. Dabei kehrt das Elektron in den elektronischen Grundzustand zurück und gibt die Energie in Form eines Photons ab. Geschieht dies aus dem Singulett – Zustand, so handelt es sich um Fluoreszenz (F), falls die Desaktivierung aus dem Triplett – Zustand stattfindet, so handelt es sich um Phosphoreszenz (P).

Experimenteller Aufbau

Herkömmliche UV-Vis-Spektrometer werden verwendet, um die Extinktion von ultraviolettem oder sichtbarem Licht (190 – 800 nm) durch eine Probe zu detektieren. Dabei wird bei einer einzelnen Wellenlänge oder mit einem Scan über einen Bereich im Spektrum gemessen. Die Methode wird sowohl qualitativ als auch quantitativ verwendet. Ein schematischer Aufbau eines allgemeinen Spektrometers ist in Abb. 2-10 dargestellt. Die Lichtquelle (eine Kombination aus einer Wolfram/Halogen- und Deuteriumlampe) liefert das Anregungsspektrum. Das Licht wird mittels einer Blende auf den Monochromator (Prisma oder Beugungsgitter) fokussiert, welches das einfallende Licht in die unterschiedlichen Wellenlängen aufteilt. Somit kann jede Wellenlänge einzeln gewählt und zur Probe weiter geleitet werden. Bei flüssigen Proben besteht das Probengefäß aus einer transparenten Küvette. Diese besteht meistens aus Quarzglas, um die maximale Durchlässigkeit für alle verwendeten Wellenlängen zu gewährleisten.

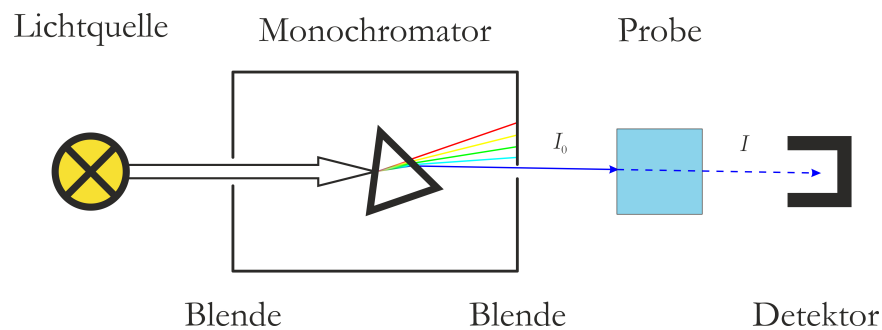


Abb. 2-10 Schematischer Aufbau eines Absorptions-Spektrometers. Es handelt sich um eine Aufsicht-Darstellung.

Nach Probendurchgang trifft der Lichtstrahl auf den Detektor, welcher dessen Intensität aufzeichnet. Dabei wandelt dieser das einfallende Licht in Strom um, wobei der Strom proportional zur Lichtintensität ist. Ausgegeben wird dann meist die Extinktion in Abhängigkeit der Wellenlänge oder der Zeit – je nach Art der Messung.

Vor der Probenmessung wird stets eine Referenz vermessen, um eine Veränderung durch die Probe bestimmen zu können. Diese kann als eine Messung des leeren Spektrometers, der leeren Küvette, des Puffers oder eines Referenzsystems erfolgen und liefert dann die Anfangsintensität I_0 des Lichtstrahls. Anschließend erfolgt die Messung mit der Probenküvette: Ist die Intensität I nun geringer, so wurde ein Teil des Lichtes durch die Probe absorbiert. Nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz ist die detektierte Extinktion E dann direkt proportional zur Konzentration c und lediglich von Extinktionskoeffizienten ε und der Schichtdicke d abhängig:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d. \quad (2-11)$$

Ist der Extinktionskoeffizient bekannt, so wird die Konzentration der Probe direkt aus der Extinktion erhalten und kann zeitabhängig verfolgt werden. Ist er unbekannt, so kann er aus der Steigung der Messung einer Verdünnungsreihe einer bekannten Konzentration bestimmt werden.

Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenz gehört zu den wichtigsten Methoden in der Biologie. Die Besonderheit der Fluoreszenzspektroskopie (auch -mikroskopie) liegt darin, dass nicht die Absorption des einstrahlten Lichts beobachtet wird, sondern die Emission eines Fluoro- oder Chromophors. Der Aufbau der Apparatur wird dahingehend geändert, dass sich der Detektor in einem 90 °-Winkel zur Lichtquelle und ein weiterer Monochromator zwischen Probe und Detektor befindet (Abb. 2-11).

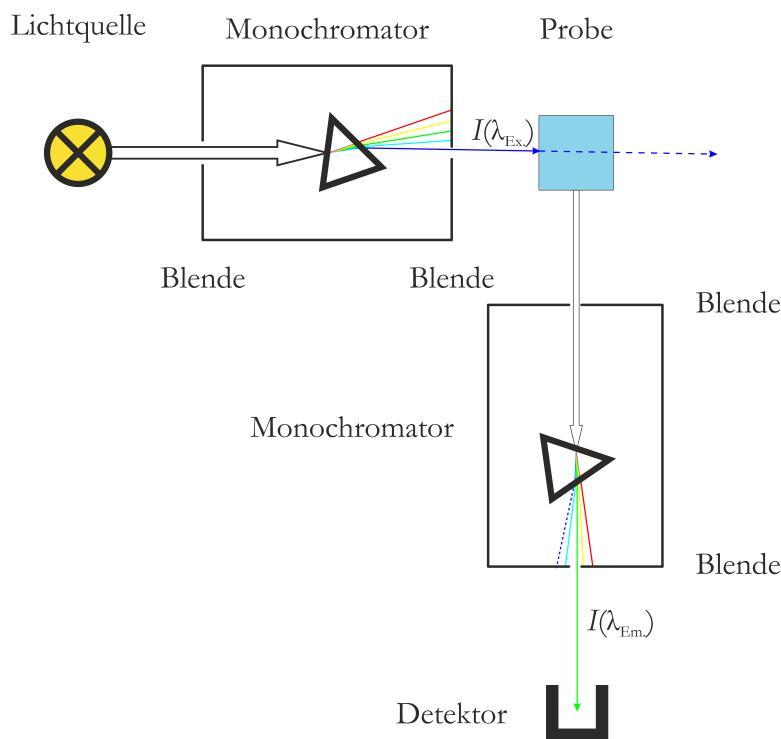


Abb. 2-11 Schematischer Aufbau eines Fluoreszenz-Spektrometers. Es handelt sich um eine Aufsicht-Darstellung.

Dadurch kann nicht nur das Emissionsspektrum genau aufgelöst werden, sondern das Signal zu Rausch-Verhältnis wird signifikant verbessert, sodass selbst sehr geringe Probenkonzentrationen verwendet werden können.

Außerdem sind die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzlebensdauer sehr sensitiv und von vielen Faktoren abhängig, sodass mit der Methode neben der Untersuchung der Struktur und Dynamik von Proteinen, Lipiden und DNA auch weitere Parameter bestimmt werden können:

- Interne Dynamik, Konformationsänderung
- Rotations- und Translationsdiffusion
- Umgebungsbestimmung des Fluorophors
- Globale Konzentrationsverteilung in Zellen
- Protein-Ligand-Wechselwirkung
- Kinetik

Die große Vielfalt der Fluoreszenzspektroskopie kommt zum einen daher, dass nicht der Aktivierungsprozess des elektronischen Zustandes, sondern die Deaktivierungen (Abb. 2-9) betrachtet werden. Diese sind an sich schon vielfältig und finden auf unterschiedlichen Zeitskalen statt wodurch sie sehr gut unterschieden werden können. Zum anderen sind die stattfindenden Prozesse sensitiv der Umgebung gegenüber, wodurch dem Anwender eine Vielzahl an Interpretations- und Kontrollmöglichkeiten eröffnet werden. So können zum Beispiel einige Prozesse bei Umgebungsänderung hinzukommen oder verschwinden. Zu den wichtigsten Effekten gehört die Rotverschiebung (*Stokes-Shift*) der Fluoreszenz. Dadurch, dass die Anregung eines elektronischen Übergangs innerhalb eines Moleküls in der Regel sehr schnell geschieht ($\approx 10^{-15}$ s, A in Abb. 2-9 und Abb. 2-12), kommt es neben der Vibrationsrelaxation ($\approx 10^{-12}$ s, IC in Abb. 2-9) auch noch zur Lösungsmittelrelaxation ($\approx 10^{-10}$ s, Abb. 2-12).

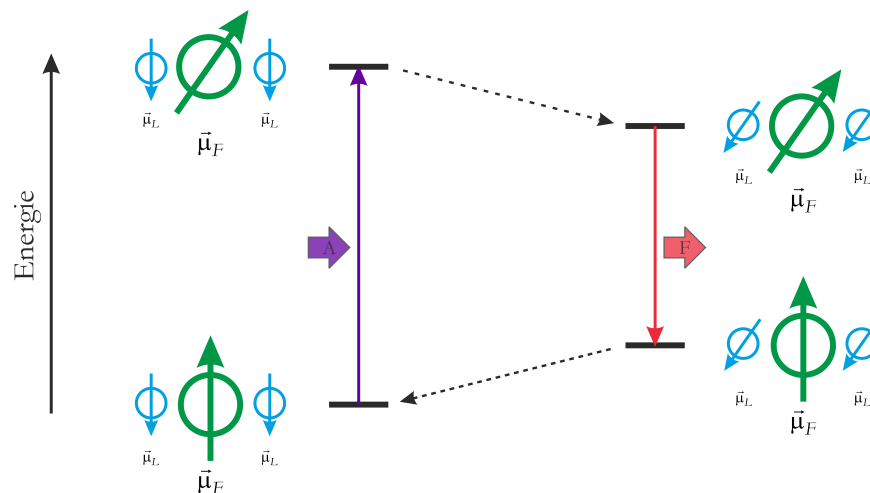


Abb. 2-12 Schematische Darstellung des Prinzips der Lösungsmittelrelaxation und der damit einhergehenden Rotverschiebung der Fluoreszenz.

Beim ersten Vorgang findet eine strahlungslose Deaktivierung durch Stöße mit der Umgebung statt, sodass die Molekülschwingungen aus dem jeweiligen Vibrationsniveau (v') in das niedrigste Vibrationsniveau des elektronisch angeregten Zustandes ($v'=0$) übergehen.

Bevor die Fluoreszenz ($\approx 10^{-8}$ s, F in Abb. 2-9 und Abb. 2-12) stattfindet, kommt es zum zweiten Vorgang. Hierbei spielt die Trägheit des Dipols des Lösungsmittels eine entscheidende Rolle. Dessen Ausrichtung geschieht nicht instantan mit der Anregung, sondern innerhalb der Fluoreszenzlebenszeit und verringert ebenfalls strahlungsfrei die Energie des Systems. Der Effekt tritt dabei zweimal auf, vor und nach der Fluoreszenz (Abb. 2-12), und sorgt zusammen mit der inneren Umwandlung für eine Rot-Verschiebung des Fluoreszenzspektrums.

Experimentelles

Die UV-Vis-Messungen wurden an zwei unterschiedlichen Geräten durchgeführt. Zum einen wurden die temperaturabhängigen Messungen beim Atmosphärendruck am UV-Vis-Spektralphotometer der Firma Shimadzu durchgeführt:

- Kennzeichnung: UV-1800
- Hersteller: Shimadzu Deutschland GmbH
- Lichtquelle: Kombination aus WI-Halogen und D2-Deuterium Lampen
- Temperaturregelung: Externes Wasserbad – Julabo F 32

Hierbei wurde der standardisierte Aufbau verwendet und als Probenzelle eine kommerziell erhältliche Quarz-Küvette mit einem Volumen von 1 mL und einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Zum anderen wurden die druckabhängigen Messungen am UV-Vis-Spektrometer der Firma PerkinElmer durchgeführt.

- Kennzeichnung: Lambda 25
- Hersteller: PerkinElmer
- Lichtquelle: Kombination aus WI-Halogen und D2-Deuterium Lampen
- Temperaturregelung: Externes Wasserbad – Julabo F 32
- Druckindikator: TecSis P3298B093001 (elektrisch)

Hierbei wurde eine im Eigenbau (Prof. Dr. r. Winter) gefertigte Hochdruckzelle (Abb. 2-13) verwendet. Es werden zwei Quarz-Fenster in einen zylindrischen Mantel geschraubt. Ein O-Ring zwischen dem Edelstahl und dem Fenster dichten die Zelle ab. Das Probenvolumen wird durch den Abstand der Quarz-Fenster bestimmt. Über eine weitere senkrechte Bohrung kann

der Raum zwischen den Fenstern mithilfe einer Spritze befüllt werden. Anschließend wird dieselbe Bohrung über eine Kapillare an eine hydraulische Pumpe angeschlossen, um Druck in der Probenlösung aufbauen zu können.

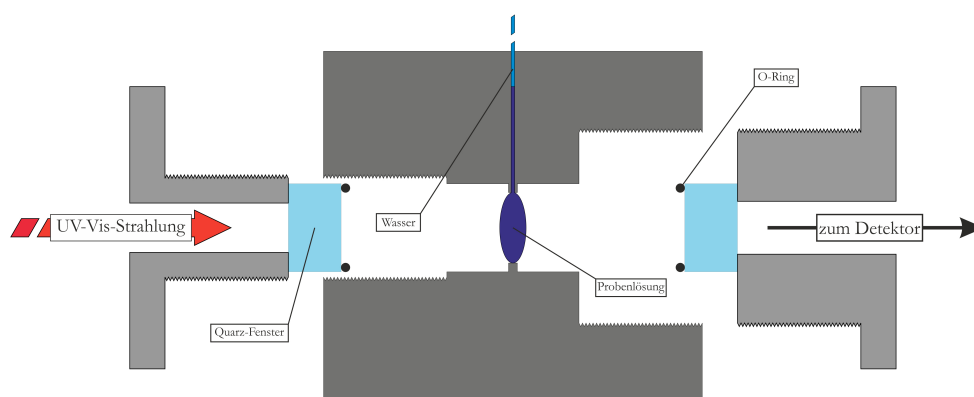


Abb. 2-13 Schematische Darstellung des Querschnitts der verwendeten Hochdruckzelle für die UV-Vis-Spektroskopie.

- UV-HP-Zelle: Eigenbau (Prof. Dr. Roland Winter) (Abb. 2-13)
 Probenvolumen $\approx 300 \mu\text{L}$
 Fenster – Quarz
 Schichtdicke – 4,3 mm (Fenster zu Fenster)
 Druckregelung – Nova Swiss (Hydraulikpresse)

Die Fluoreszenzmessungen wurden alle an einem K2-Fluoreszenz-Spektrometer der Firma ISS durchgeführt:

- Kennzeichnung: K2
- Hersteller: ISS (Champaign, Illinois, USA)
- Lichtquelle: Xe-Lichtbogenlampe
- Temperaturregelung: Externes Wasserbad – Julabo F 32
- Druckindikator: TecSis P3298B093001 (elektrisch)

Es wurden zwei unterschiedliche Zellen verwendet. Zum einen der Aufsatz für die Standard-Küvette aus Quarzglas für die temperaturabhängigen Messungen beim Atmosphärendruck. Zum anderen eine kommerziell erhältliche Hochdruckzelle (ISS) für druckabhängige Messungen. Die Probe wird in ein Quarzglasfläschchen gefüllt, mit Dura-Seal-Folie und einem O-Ring luftblasenfrei verschlossen und in eine mit Wasser gefüllte Edelstahlzelle gesetzt. Die Zelle wird verschlossen und an eine Kapillare angeschlossen, die mit einer hydraulischen Pumpe verbunden

ist, um Druck im dem Druckmedium (Wasser) aufbauen zu können. Die Probe wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und im 90° -Winkel dazu die Fluoreszenz bei einer gewünschten Wellenlänge gemessen (Abb. 2-11).

- Hochdruckzelle: ISS (Champaign, Illinois, USA)
Probenvolumen – 1 mL
Fenster – Saphir; Probenfläschchen – Quarzglas
Druckregelung – Nova Swiss (Hydraulikpresse)

Als eine besondere Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie wurde in dieser Arbeit die Hochdruck-TIRF-Spektroskopie (*Total Internal Reflection Fluorescence*) verwendet (Abb. 2-14).

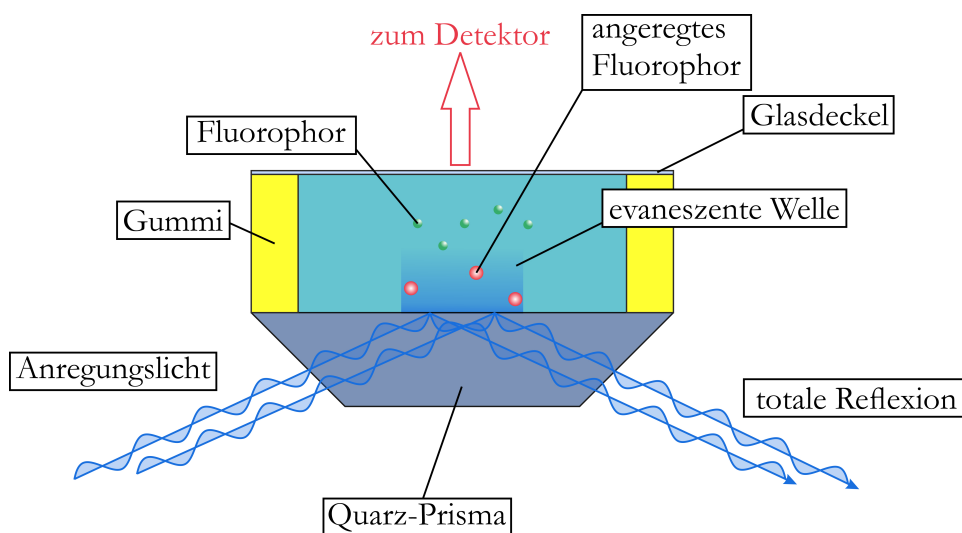


Abb. 2-14 Schematische Darstellung des Prinzips der TIRF-Spektroskopie mit dem Aufbau der inneren Messzelle.

Die Hochdruck-Probenzelle für die TIRF-Spektroskopie wurde in der eigenen Gruppe entworfen und gebaut [20]. Sie enthält eine innenversiegelte Probenzelle, bestehend aus dem Quarzprisma, die mit der wässrigen Probenlösung in Kontakt steht. Es können Drücke bis zu 4200 bar angelegt werden. Bei der TIRF-Spektroskopie handelt es sich um eine oberflächensensitive Technik, bei der nur fluoreszierende Moleküle angeregt werden, die sich in der Nähe der Oberfläche befinden oder an dieser adsorbiert werden. Hierbei wird die totale Reflexion des Lichtstrahls in einem Quarz-Prisma (Dove-Typ, 6 mm Dicke, 70° Neigung der gegenüberliegenden Seiten) ausgenutzt. Am Punkt der totalen Reflexion im hochbrechenden Medium (Quarz) entsteht eine evaneszente Welle in das niedrigbrechende Medium (Probe) hinein. Die Intensität dieser Welle fällt exponentiell ab, sodass nur Fluorophore in unmittelbarer Nähe der Grenzfläche (ca. $1/5$ bis $1/4$ der Wellenlänge) untersucht werden können [21]. Das quadratische Prisma

wird mit einem „Gummizaun“ versehen, mit der Probenlösung gefüllt und mit einem Glasdeckel luftblasenfrei verschlossen (Abb. 2-14). Diese innere Zelle wird nun in einem Metallgerüst eingespannt und in eine mit Wasser gefüllte Edelstahlzelle gesetzt. Nachdem der Winkel der inneren Zelle justiert wurde, wird die äußere Zelle (Nimonic 90 Legierung) verschlossen und an eine Kapillare angeschlossen, die mit einer hydraulischen Pumpe verbunden ist, um Druck in dem Druckmedium (Wasser) aufbauen zu können.



Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR)

Zusätzlich zur oben genannten Literatur wurden für dieses Kapitel insbesondere [22, 23] herangezogen.

Bei der FTIR-Spektroskopie handelt es sich um eine Anwendung der Infrarotspektroskopie. Das Infrarotspektrum (IR) einer Substanz wird häufig als molekularer Fingerabdruck bezeichnet. Neben der Identifikation eines Materials kann es auch verwendet werden, um die Anzahl absorbierender Moleküle zu quantifizieren. Die Besonderheit bei der FTIR-Spektroskopie liegt darin, dass die Probe für eine kurze Zeitspanne gleichzeitig von allen relevanten Wellenlängen bestrahlt wird. Ein spezifischer Teil dieser wird durch die Probe absorbiert. Das Absorptionsspektrum wird anschließend durch Anwenden einer mathematischen Analyse auf das resultierende Interferogramm erhalten.

Grundlagen

Wenn elektromagnetische Strahlung durch eine Probe hindurchtritt, wechselwirken die Photonen mit der Probe. Im Fall der IR-Spektroskopie handelt es sich bei der Wechselwirkung um Absorption der Energie E unter Änderung des Schwingungszustandes der chemischen Bindung. Dabei ist es wichtig, dass die Energie E der Strahlung die Frequenz ν_0 der Schwingung trifft:

$$E = h \cdot \tilde{\nu} \cdot c \quad \text{mit} \quad \tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu_0}{c}, \quad (2-12)$$

wobei c die Lichtgeschwindigkeit und h das PLANCK'sche Wirkungsquantum sind. Die Energie der Strahlung E , ist entweder durch die charakteristische Wellenlänge λ oder die entsprechende Wellenzahl $\tilde{\nu}$ gegeben. Die chemische Bindung kann während der Schwingung als ein Körper bestehend aus zwei elastisch miteinander verbundenen Massen beschrieben werden. Die einfachste Beschreibung der potentiellen Energie E_{pot} eines solchen Systems kann durch die klassische harmonische Schwingung gemacht werden:

$$E_{\text{pot}}(r) = \frac{1}{2} \cdot k \cdot \Delta r^2. \quad (2-13)$$

Somit hängt die notwendige Kraft \vec{F} für die Auslenkung $\Delta \vec{r}$ aus der Ruhelage nach dem HOOKE'schen Gesetz ausschließlich von der Kraftkonstanten k der Bindung ab:

$$\vec{F}(\vec{r}) = -k \Delta \vec{r}. \quad (2-14)$$

Die Kraftkonstante k ist ein Maß für die Stärke der Bindung und bestimmt zusammen mit der reduzierten Masse μ die Schwingungsfrequenz ν_0 . Es gilt:

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{mit} \quad \mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}. \quad (2-15)$$

Das Lösen der SCHRÖDINGER-Gleichung für ein solches System liefert die Energieeigenwerte E :

$$E(v) = h \cdot \nu_0 \left(v + \frac{1}{2} \right). \quad (2-16)$$

Eine Bindung, welche mit dem harmonischen Oszillator beschrieben wird, kann also nur äquidistante, diskrete Energien annehmen. Diese hängen ausschließlich von der Eigenfrequenz ν_0 der Schwingung sowie dem Schwingungszustand, beschrieben durch die ganzzahlige Schwingungsquantenzahl v , ab.

Die Beschreibung einer realen Bindung als harmonisch stellt eine Näherung dar. Dabei wird weder das PAULI-Prinzip, noch die Möglichkeit der Dissoziation der Bindung berücksichtigt. Eine alternative und genauere Beschreibung der potentiellen Energie E_{pot} der Schwingung kann durch das MORSE-Potential gemacht werden:

$$E_{\text{pot}}(r) = D_e \cdot \left(1 - e^{-a \cdot \Delta r} \right)^2. \quad (2-17)$$

Dieses ist durch eine charakteristische spektroskopische Dissoziationsenergie der Bindung D_e und die Krümmung des beschreibenden Potentials a gegeben. Die möglichen Energien eines solchen anharmonischen Oszillators werden ebenfalls durch das Lösen der SCHRÖDINGER-Gleichung erhalten und betragen:

$$E(v) = h \cdot \nu_0 \left(v + \frac{1}{2} \right) - h \cdot \nu_0 \cdot x \cdot \left(v + \frac{1}{2} \right)^2. \quad (2-18)$$

Die Energieniveaus sind nun nicht mehr äquidistant und konvergieren gegen die Dissoziationsenergie D_e . Der Term des harmonischen Oszillators wird durch einen Anharmonizitätsterm mit $x = b \cdot \nu_0 / 4 \cdot D_e$ ergänzt. Die Abweichungen sind für kleine Schwingungsquantenzahlen verhältnismäßig klein.

Neben der Energie der eingestrahnten Strahlung muss die absorbierende Gruppe eine weitere Eigenschaft besitzen. Das elektrische Dipolmoment μ_{el} der schwingenden Gruppe muss sich im Verlauf der Schwingung ändern:

$$\frac{\partial \mu_{\text{el}}}{\partial \zeta} \neq 0. \quad (2-19)$$

Diese Eigenschaft hat zwar keinen Einfluss auf die Frequenz der Schwingung, ist aber notwendig damit diese IR-sichtbar ist. Mit einem kurzen Überblick über die Gleichungen lassen sich zwei Eigenschaften festhalten, die den „typischen Wert“ der Frequenz der Schwingung jeder Bindung bestimmen:

- Bindungen schwingen umso langsamer je größer die Masse ihrer Gruppen ist.
- Bindungen schwingen umso schneller, je größer die Kraftkonstante ist.

Diese beiden Parameter sind relevant für die Bandenlage einer isolierten Schwingung. Doch im realen Fall ist es so, dass die Bindungen nicht vollständig unabhängig voneinander schwingen. Somit gibt es zwei weitere Effekte, die die Lage der Schwingungsfrequenz beeinflussen:

- Kopplung von Schwingungen: Durch Kopplung an benachbarte Bindungen oder Gruppen wird die Massenträgheit der schwingenden Bindung verändert.
- Kopplung mit der Umgebung: Durch Ausbildung von z.B. Wasserstoffbrückenbindungen wird die Elektronendichte und somit die Stärke der schwingenden Bindung verändert.

Diese und weitere Effekte führen dazu, dass es anstatt des „typischen Wertes“ für bestimmte Bindungen häufig verbreiterte typische Bereiche beobachtet werden. Zwar mag diese Tatsache auf den ersten Blick als eine Verkomplizierung wirken, doch tatsächlich ist es so, dass dies einen enormen Erkenntnisgewinn für die Strukturanalyse und den wissenschaftlichen Wert der IR-Spektroskopie bedeutet.

Ergänzend zu den bereits genannten Aspekten kommt hinzu, dass jede Bindung, bzw. ein Molekül, nicht nur eine Schwingung durchführen kann. Grundsätzlich wird zwischen den Streck-schwingungen und den Beugeschwingungen unterschieden, wobei es von beiden unterschiedliche Arten gibt. In wässrigen Lösungen gilt die Faustregel, dass die Streck-schwingungen stets bei größeren Wellenzahlen zu finden sind als die Beugeschwingungen einer Bindung. Die Gesamtzahl aller möglichen Schwingungen resultiert aus den Bewegungsfreiheitsgraden eines Moleküls, welche als $F = 3 \cdot N$ berechnet werden. Dabei ist F die Anzahl der Bewegungsfreiheitsgrade und N die Anzahl der Atome im Molekül. Von diesen müssen zunächst 3 Freiheitsgrade für die Translation in die drei Raumrichtungen subtrahiert werden, zusätzlich werden für nicht lineare Moleküle drei Freiheitsgrade (für lineare sind es auf Grund der Symmetrie zwei) für die

Rotation um die drei Rumebenen subtrahiert. Die übrig gebliebenen Bewegungsfreiheitsgrade sind den Schwingungen zugeordnet:

- Lineares Molekül: $n = 3 \cdot N - 3 - 2$
- Nicht lineares Molekül: $n = 3 \cdot N - 3 - 3$

Alle genannten Aspekte bringen eine gewisse Komplexität in die aufgenommenen Spektren und erfahrungsgemäß sind die detektierten Banden nicht immer eindeutig, was viele Ursachen haben kann und die Analyse erschwert. Andererseits bringt die Komplexität auch eine Eindeutigkeit mit sich, denn eine vermutete Struktur kann nur dann als sicher gefunden bezeichnet werden, wenn auch alle diagnostisch relevanten Banden auftreten. Fehlt auch nur eine Bande für die vermutete Struktur, so liegt diese mit Sicherheit auch nicht vor.

Experimenteller Aufbau

Bei der herkömmlichen IR-Spektroskopie wird ein dispersives Element verwendet um monochromatisches Licht unterschiedlicher Wellenlänge zu erzeugen. Anschließend wird jede Wellenlänge einzeln angefahren und die Absorption durch die Probe untersucht. Dies ist langwierig und bietet nur ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Genau hierin liegt der große Unterschied zur FTIR-Spektroskopie. Das Herzstück bildet dabei das so genannte MICHELSON-Interferometer (Abb. 2-15). Dieses besteht im Wesentlichen aus einem halbdurchlässigen Strahlenteiler, einem festen und einem beweglichen Spiegel. Der Strahlenteiler spaltet das von der IR-Quelle kommende Licht in einem rechten Winkel in zwei äquivalente Teile auf. Ein Teil wird zu dem festen Spiegel geleitet, an dem die Strahlung reflektiert wird und durch den Strahlenteiler in Richtung Probe gelangt. Dieser Teil der Strahlung hat somit immer die gleiche Weglänge. Der zweite Teil wird zu dem beweglichen Spiegel geleitet, an dem die Strahlung zunächst in Richtung des Strahlenteilers und anschließend in Richtung der Probe reflektiert wird. Dieser Teil der Strahlung kann je nach Position des Spiegels eine Weglängendifferenz von $0 \leq x \leq \lambda$ zum ersten Teil aufweisen. Sind die beiden Strahlenteile in Phase, so weisen sie eine optische Weglängendifferenz von $x = 0$ auf und interferieren konstruktiv zu einer maximalen Intensität. Besitzt der zweite Strahl eine optische Weglängendifferenz von $x \neq 0$ bezüglich des ersten Strahls, so interferieren sie teilweise destruktiv, und die resultierende Strahlung besitzt eine verringerte Intensität. Der Detektor zeichnet somit die Intensität der Strahlung I in Abhängigkeit der optischen Weglängendifferenz x auf, was in einem Interferogramm $F(x)$ resultiert:

$$F(x) = I(x) - I(\infty) = \int_0^{\infty} B(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) d\tilde{\nu}. \quad (2-20)$$

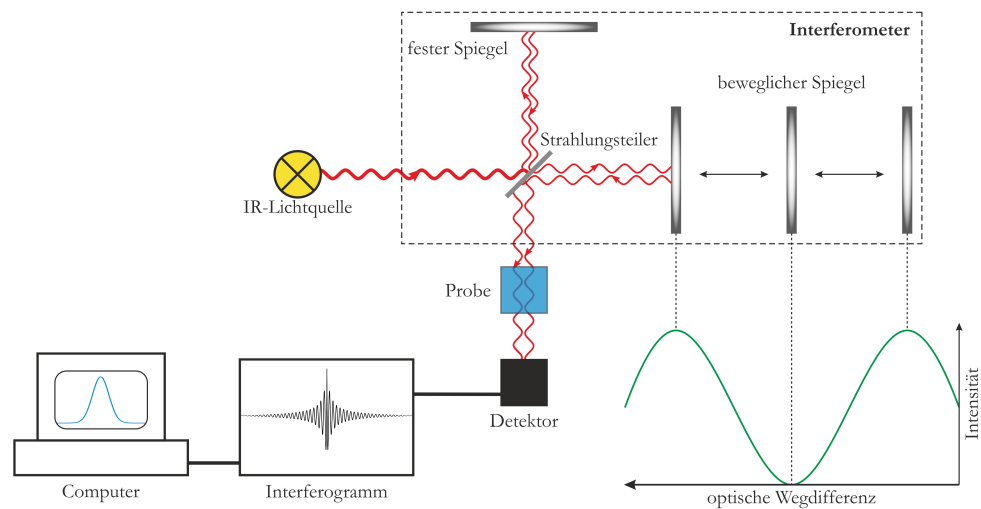


Abb. 2-15 Schematischer Aufbau eines FTIR-Spektrometers inklusive des MICHELSON-Interferometers.

Die Anwendung der FOURIER-Transformation macht den Übergang aus der Ortsdomäne in die Frequenzdomäne möglich und liefert aus dem Interferogramm ein Spektrum:

$$B(\tilde{\nu}) = 4 \int_0^{\infty} F(x) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx. \quad (2-21)$$

Um anschließend das typische Absorptionsspektrum $A(\tilde{\nu})$ zu erhalten, muss das einzelne Signalspektrum $B(\tilde{\nu})$ mit dem Untergrundspektrum (Referenz) $B_0(\tilde{\nu})$ korrigiert werden:

$$A(\tilde{\nu}) = -\log\left(\frac{B(\tilde{\nu})}{B_0(\tilde{\nu})}\right). \quad (2-22)$$

Spektroskopie an Proteinen

Die (FT)IR-Spektroskopie ist eine der wichtigsten Methoden zur Strukturuntersuchung an Proteinen. Im Wesentlichen gibt es vier Strukturebenen bei der Beschreibung der Proteinstruktur:

- Primärstruktur – Aminosäuresequenz (Abfolge der Aminosäuren)
- Sekundärstruktur – Lokale räumliche Struktur (α -Helix, β -Faltblatt)
- Tertiärstruktur – Globale räumliche Struktur (eine Untereinheit)
- Quartärstruktur – Räumliche Struktur des Proteinkomplexes (alle Untereinheiten)

Bei der (FT)IR-Spektroskopie wird die Sekundärstruktur untersucht. Diese wird im Wesentlichen durch die Kombination der Diederwinkel (φ und ψ) der Peptidbindung beschrieben. Dabei

gibt es zwei typische Kombinationen, die zu den wichtigsten dreidimensionalen Strukturen führen:

- α -Helix mit $\varphi \approx -60^\circ$ und $\psi \approx -45^\circ$
- β -Faltblatt mit $\varphi \approx -130^\circ$ und $\psi \approx 120^\circ$

Dabei ist anzumerken, dass beide Strukturen bezüglich beider Winkel eine konformelle Freiheit von etwa $\pm 30^\circ$ besitzen. Eine weitere wichtige Sekundärstruktur, die allerdings nicht direkt durch die Diederwinkel beschrieben wird, sind die Schleifen. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich meist zwischen zwei β -Faltblättern befinden und deren Aminosäurereste nach außen gerichtet und gut hydratisiert sind. Die restlichen Aminosäureabschnitte werden üblicherweise als „ungeordnet“ bezeichnet.

Unabhängig von der ausgebildeten Struktur sind für die (FT)IR-Spektroskopie vor allem die durchgeführten Schwingungen entscheidend. Für eine Peptidbindung sind insgesamt neun Normalschwingungen erlaubt, die A, B und I – VII heißen und nach absteigender Wellenzahl sortiert sind. Bei der Sekundärstrukturanalyse mittels (FT)IR-Spektroskopie werden im Wesentlichen nur die drei Hauptschwingungen I – III untersucht:

- Amid I: 80 % C=O Steckschwingung (1650 cm^{-1})
- Amid II: 60 % N–H Biegeschwingung, 40% C–N Steckschwingung (1550 cm^{-1})
- Amid III: 40 % C–N Steckschwingung, 30% N–H Biegeschwingung (1300 cm^{-1})

Die wichtigste und auch in dieser Arbeit verwendete Bande ist die Amid I, welche aber auch die größte Herausforderung der (FT)IR-Spektroskopie mit sich bringt. Die Schwierigkeit besteht darin, dass die Deformationsschwingung von Wasser (1650 cm^{-1}), welches meist das Lösungsmittel ist, im zu untersuchenden Bereich (1700 – 1600 cm^{-1}) liegt.

Tabelle 2-1 Die wichtigsten Frequenzen der Amid I- und Amid I'-Subbanden (H_2O und D_2O) mit entsprechenden charakteristischen Sekundärstrukturelementen des Proteins [24, 25].

| Konformation | Frequenz in H_2O / cm^{-1} | Frequenz in D_2O / cm^{-1} |
|-----------------------------------|---|---|
| Schleife | 1696 – 1680 | 1694 – 1683 |
| | 1675 – 1655 | 1675 – 1663 |
| α -Helix | 1657 – 1650 | 1654 – 1647 |
| Ungeordnet | 1651 – 1640 | 1643 |
| β -Faltblatt (parallel) | 1640 – 1626 | 1631 – 1624 |
| β -Faltblatt (antiparallel) | 1640 – 1612 | 1628 – 1635 |

Es ist möglich, D_2O als Lösungsmittel zu verwenden um dieses Problem zu umgehen. Ein H/D-Austausch der gesamten Probe muss dann vor jeder Messung durchgeführt werden. Sollte dieser allerdings nicht vollständig abgelaufen sein oder aufgrund der Präparationsdauer oder

Ähnlichem ein Rückaustausch mit der Luftfeuchtigkeit stattfinden, besteht die Gefahr, dass die Banden dupliziert werden (Tabelle 2-1). Deswegen ist größte Vorsicht und Sorgfalt bei der Subtraktion des Untergrundes bzw. Puffers, sowie Erfahrung bei der Sekundärstrukturanalyse selbst notwendig, um aussagekräftige Ergebnisse aus den aufgenommenen Spektren zu erhalten.

Experimentelles

Alle in dieser Arbeit hinsichtlich FTIR-Spektroskopie erwähnten Messungen sind mit dem arbeitskreiseigenen Spektrometer durchgeführt worden. Dabei haben sich die Messzellen für die temperatur- und druckabhängigen Messungen unterschieden. Nachfolgend sind einige wichtige technische Details zum Gerät selbst und zu den Zellen aufgelistet:

- Kennzeichnung: Nicolet 6700-FTIR
- Hersteller: Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
- Detektor: MCT (Quecksilber-Cadmium-Tellur)
- Temperaturregelung: Externes Wasserbad – Julabo F 32
- Druckindikator: BaSO_4 [26] oder α -Quarz [27] (chemisch)

Für die temperaturabhängigen Messungen wurde eine kreisförmige Zelle verwendet, die nach dem Sandwich-Prinzip funktioniert. Zwischen zwei Fenstern wird Mylar-Folie platziert. Die Dicke dieser, sowie der Radius der mittig platzierten Bohrung definieren das Probenvolumen. Die Temperierung erfolgt über eine an das Wasserband angeschlossene externe Halterung.

- Temperatur-Zelle: Eigenbau nach Vorbild von Thermo Fisher (Abb. 2-16)
 Probenvolumen $\approx 20 \mu\text{L}$
 Fenster – CaF_2 ($\varnothing \approx 25 \text{ mm}$, $d \approx 4 \text{ mm}$, Sigma-Aldrich)
 Abstandsfolie – $d \approx 50 \mu\text{m}$, Mylar

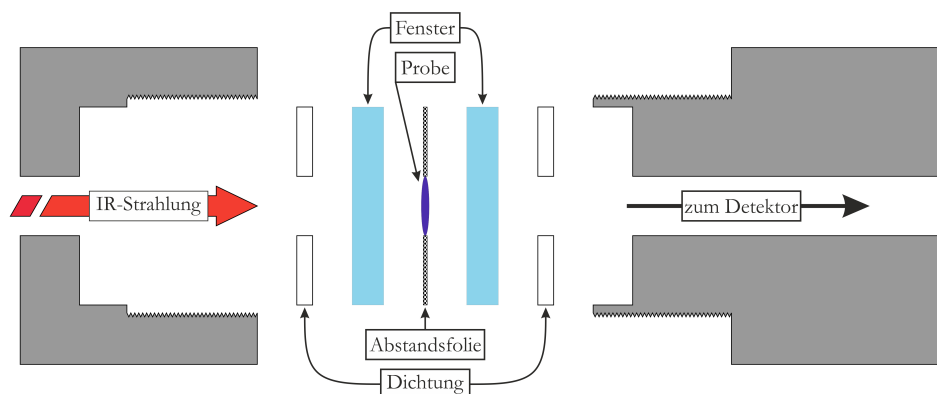


Abb. 2-16 Schematische Darstellung des Querschnitts der verwendeten Temperatur-Zelle für die FTIR-Spektroskopie.

Für die druckabhängigen Messungen wurde eine Diamantstempelzelle verwendet. Zwei Diamanten sind in einer Stahlhalterung eingeklebt. Dazwischen wird eine Stahlfolie platziert. Die Dicke dieser, sowie der Durchmesser der Bohrung definieren das Probenvolumen. Zur Probe wird BaSO_4 oder α -Quarz zur Druckbestimmung hinzugegeben. Der Druck wird aufgebaut indem die beiden Hälften mithilfe einer äußeren Zelle immer fester zusammengedrückt werden. Die Genauigkeit der Druckeinstellung liegt bei ca. ± 200 bar.

- Druck-Zelle: P-Series, High Pressure Diamond Optics (Abb. 2-17)
Probenvolumen ≈ 1 nL (abhängig von der Abstandsfolie)
Diamant – Typ IIa, $\varnothing \approx 0.6$ mm
Abstandsfolie – d ≈ 20 μm , Stahl 1.4310, Bohrung ≈ 200 μm
Druckregelung – Die Zelle selbst (mechanisch)

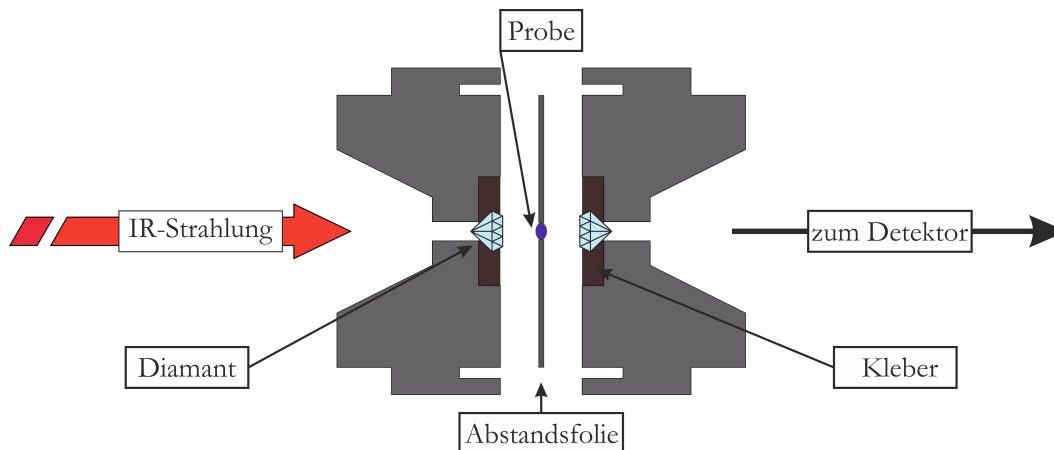


Abb. 2-17 Schematische Darstellung des Querschnitts der verwendeten Druck-Zelle für die FTIR-Spektroskopie. Gebaut von High Pressure Diamond Optics.

Vor jeder Messung findet zunächst eine interne Kalibrierung statt, indem die Position der Zelle, bzw. Parameter wie die Öffnung der Blende angepasst werden, sodass die Intensität zwar maximal ist, allerdings den maximal zulässigen Wert nicht übersteigt. Anschließend wird als Untergrundspektrum das leere Gerät (keine Zelle, keine Probe) vermessen, welches dann anschließend von alle Messungen abgezogen wird. Dabei wird der Probenraum durchgehend mit trockener Luft gespült, um die Luftfeuchtigkeit möglichst gering zu halten. Zu jeder Messung wird ein Referenzspektrum aufgenommen, welches sich je nach vermessenem System unterscheidet. Dieses wird schließlich ebenfalls von dem Probenspektrum abgezogen, um das reine Spektrum des beobachteten Systems zu erhalten.

Die Auswertung der gemessenen Spektren erfolgt mit Hilfe der Software GRAMS/AI 9. Für Proteine wird nach Puffersubtraktion (Referenz) der Bereich der Amid I'-Bande

(1700 – 1600 cm^{-1}) freigestellt und nach einer Basislinienkorrektur die Fläche der Bande normiert. Anschließend erfolgt die Sekundärstrukturanalyse. Ziel dieser ist es, die Zusammensetzung der Amid-I' Bande aus den Subbanden zu ermitteln. Hierfür werden zwei Methoden verwendet und die Ergebnisse auf Übereinstimmung verglichen. Zum einen wird die zweite Ableitung des Spektrums gebildet, zum anderen wird eine FOURIER-Selbstentfaltung (FSD) mit dem Spektrum durchgeführt. Stimmt ein Minimum der zweiten Ableitung mit einem Maximum der FSD überein, so liegt bei dieser Wellenzahl auch sehr wahrscheinlich eine der Subbanden (Tabelle 2-1) der breiten Amid I'-Bande. Die Subbanden werden nun als Voigtfunktionen modelliert und deren Parameter solange generisch variiert, bis die Summe dieser eine möglichst geringe Abweichung zu dem anzupassenden Amid I'-Spektrum aufweist. Dabei werden folgende Grenzen manuell gesetzt, um vernünftige Ergebnisse zu erhalten:

- Position der Subbanden – Startpunkt aus zweiter Ableitung und FSD $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$
- Höhe der Subbanden – Darf nicht negativ werden
- Breite der Subbanden – Darf 25 cm^{-1} nicht übersteigen

Bei dem Fitvorgang ist unbedingt darauf zu achten, dass so wenige wie möglich der gefundenen Subbanden verwendet werden (dennoch so viele wie nötig). Ansonsten besteht die Gefahr einer Überparametrisierung, was dazu führt, dass die erhaltenen Ergebnisse willkürlich und nicht aussagekräftig werden können. Bei sachgemäßem Umgang liefert jedoch die Auswertung aus den Flächen der für den Fit verwendeten Subbanden direkt die Sekundärstrukturanteile (Tabelle 2-1) des vermessenen Proteins.



2.2 Chemikalien, Software, Instrumente

In der folgenden Tabelle 2-2 sind die für die Projekte verwendeten Puffersalze aufgelistet. Tris wurde verwendet, um eine Vergleichbarkeit zur vorangegangenen Studie von Christoph Jeworrek [28] herzustellen. MOPS und MES sind gewählt worden, um bei unterschiedlichen pH-Werten eine hohe Stabilität gegenüber der Temperatur und dem Druck zu erhalten [29, 30].

Tabelle 2-2 Puffersalze.

| Bezeichnung | Spezifikation | Bezugsquelle |
|-----------------------------------|-----------------------------|---------------|
| 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure | Zweites und Drittes Projekt | Amresco |
| 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure | Erstes Projekt | VWR |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan | Viertes Projekt | Sigma-Aldrich |

Nachfolgend (Tabelle 2-3) sind Standard-Chemikalien und Lösungsmittel aufgelistet. Als Spezifikation ist der Verwendungszweck angegeben. Spezielle und projektspezifische Reagenzien sowie deren Verwendungszweck sind in Tabelle 2-4 dargestellt. Der genaue Einsatz, sowie Konzentrationen und Spezifikationen sind in den entsprechenden Projektkapiteln zu finden.

Tabelle 2-3 Standard-Chemikalien.

| Bezeichnung | Spezifikation | Bezugsquelle |
|----------------------|-------------------------------|---------------|
| 1,4-Dioxan | Lösen von PS-PAA | Alfa Aesar |
| Ammoniumhydroxid | Säubern von Si-Wafern | Sigma-Aldrich |
| Calciumchlorid | Stabilisation von Calmodulin | VWR |
| Chloroform | Präparation Membran | Merck |
| Deuteriumchlorid | Einstellung des pD | Sigma-Aldrich |
| Deuteriumoxid | Lösungsmittel für FTIR | Sigma-Aldrich |
| Dimethylsulfoxid | Präparation Membran | Sigma-Aldrich |
| Kaliumiodid | Erhöhung der Elektronendichte | VWR |
| Natriumchlorid | Einstellen der Ionenstärke | Sigma-Aldrich |
| Natriumdeuteriumoxid | Einstellen des pD | Sigma-Aldrich |
| Natriumhydroxid | Einstellen des pH | Sigma-Aldrich |
| Toluol | Lösen von PS | Sigma-Aldrich |
| Wasserstoffperoxid | Säubern von Si-Wafern | Sigma-Aldrich |

Tabelle 2-4 Spezielle Reagenzien.

| Bezeichnung | Spezifikation | Bezugsquelle |
|------------------------------|----------------------|---------------------------|
| 1-Oleoyl-rac-glycerol | Modell-Membran | Sigma-Aldrich |
| Alexa-488 | Fluorophor für TIRF | Thermo Fischer Scientific |
| Ethanol | Substrat für ADH | Merck |
| Glutathion | Reduktionsmittel | VWR |
| Nicotinamidadenindinukleotid | Co-Substrat für ADH | Merck |
| Poly(allylaminhydrochlorid) | Aufbau von PEM | Sigma-Aldrich |
| Poly(ethylenimin) | Aufbau von PEM | Sigma-Aldrich |
| Poly(styrol-b-acrylsäure) | Aufbau der Bürste | Polymer Source. Inc. |
| PolyDADMAC | Aufbau von PEM | Sigma-Aldrich |
| Polystyrol | Aufbau der Bürste | Sigma-Aldrich |
| Polystyrolsulfonat | Aufbau von PEM | Sigma-Aldrich |
| Semicarbazid | Co-Reagenz für ADH | Sigma-Aldrich |
| Trifluoperazin | Substrat von CaM | Sigma-Aldrich |

Des Weiteren wurden Proteine und Peptide verwendet, welche gesondert aufgeführt sind (Tabelle 2-5). Der Zweck und Projektzuteilung ist ebenfalls der Tabelle zu entnehmen. Konzentrationen und Präparationsanweisungen sind in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

Tabelle 2-5 Peptide und Proteine.

| Bezeichnung | Spezifikation | Bezugsquelle |
|------------------------|----------------------------------|---------------------|
| Alkoholdehydrogenase | Modell-Enzym (Projekt 2) | Sigma-Aldrich |
| Calmodulin(T34C,T110C) | Modell-Protein (Projekt 1 und 3) | ---- |
| HA2 | Virales Peptid (Projekt 4) | Centic Biotec |
| L-16 | Kontroll-Peptid (Projekt 4) | Centic Biotec |
| Lysozym | Test-Protein (Projekt 4) | Roche |
| TBEV | Virales Peptid (Projekt 4) | Centic Biotec |

Für die Anfertigung der Arbeit sowie Auswertung der Daten ist Software benötigt worden. Diese sowie der Verwendungszweck sind in Tabelle 2-6 gezeigt.

Tabelle 2-6 Software.

| Bezeichnung | Spezifikation | Bezugsquelle |
|--------------------|---|---------------------|
| ChemDraw 16 | Erstellung von Reaktionsgleichungen | Perkin Elmer |
| Chimera 1.10.2 | Graphische Darstellung von PDB-Strukturen | UCSF |
| CorelDRAW | Erstellung von Abbildungen | Coral Corp. |
| GRAMS/AI | FTIR-Auswertung | Thermo Scientific |
| Mathematica 9 | Allgemeine Auswertung | WOLFRAM |
| MS Office 2013 | Anfertigung der Arbeit | Microsoft |
| Origin 2018 | Auswertung und Erstellung von Graphen | OriginLab |
| Parratt32 | Auswertung der Reflektivitätskurven | HMI Berlin |
| PEP FOLD 3.5 | De novo Peptidstrukturvorhersage | RPBS Web Portal |

Für die zahlreichen Messungen wurden Instrumente benötigt. Die verwendeten Geräte, sowie die Modellbezeichnung sind Tabelle 2-7 zu entnehmen. Standard-Labora-ausrüstung wie Eppendorf-Pipetten, pH-Meter usw. sind nicht aufgelistet.

Tabelle 2-7 Instrumente.

| Bezeichnung | Spezifikation | Bezugsquelle |
|--------------------------------|----------------------|---------------------|
| CD-Spektrometer | J-715 | Jasco |
| Delta | 1,5-GeV-Speicherring | TU Dortmund |
| DLS | Nano ZS | Malvern Panalytical |
| FTIR-Spektrometer | Nicolet 6700 | Thermo Electron |
| Langmuir-Trog | 611D | Nima |
| Multifrequenzphasenfluorometer | K2 | ISS |
| Reflektometer | XRD 3000 Theta/Theta | GE |
| Spin-Coater | KW-4A | Chemat Technology |
| UV-Vis-Spektrometer | UV-1800 | SHIMADZU |
| UV-Vis-Spektrometer | Lambda 25 | PerkinElmer |

Die exakte Anwendung und Präparation ist dem Theorieteil und den entsprechenden Kapiteln zu entnehmen.

3 Projekt „Polyelektrolyt-Bürsten“

Dieses Kapitel baut auf den Ergebnissen der zuvor im selben Arbeitskreis durchgeführten Masterarbeit [8] auf. Ein Teil dieser wird hier einleitend und vergleichend ebenfalls vorgestellt und an den entsprechenden Stellen vermerkt. Die in diesem Kapitel gezeigten Daten, Abbildungen und Diskussionsansätze sind teilweise bereits publiziert worden [9, 31]. Die Abbildungen wurden mit der Erlaubnis von Elsevier und den PCCP Miteigentümern übernommen oder abgewandelt.

Polyacrylsäure-Bürsten (PAA-Bürsten) sind dafür bekannt, mit Proteinen in Abhängigkeit von der Ionenstärke der Lösung zu interagieren. Darüber hinaus bieten sie eine natürliche Umgebung, in der die Sekundärstruktur und biologische Aktivität der adsorbierten Proteine weitgehend erhalten bleibt. Während der Masterarbeit wurde gezeigt, dass die Anwendung von Hochdruck im Fall eines positiv geladenen Proteins, α -Chymotrypsin (α -CT), zu einer verringerten Proteinadsorption an einer PAA-Bürste führen kann [8]. In dem folgenden Kapitel wird die Auswirkung des Drucks auf die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und einer PAA-Bürste genauer untersucht. Es wird Calmodulin als Modellprotein verwendet, dieses weist bei neutralem pH-Wert eine negative Nettoladung auf. Der Adsorptionsgrad wird an einer planaren PAA-Bürste unter Verwendung der TIRF-Spektroskopie bestimmt.

Bemerkenswerterweise steigt der Calmodulin-Adsorptionsgrad an einer PAA-Bürste mit zunehmendem Druck an, wenn das Protein negativ geladen ist. Bei niedrigem pH-Wert, bei dem Calmodulin positiv geladen ist, führt Hochdruck jedoch zu einer teilweisen Desorption des Proteins, wie bereits bei α -Chymotrypsin beobachtet. Darüber hinaus wird in Gegenwart von Trifluoperazin (TFP), das an Calmodulin als Ligand binden kann, der Druckeffekt vermindert. Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen, dass die Proteinadsorption an einer PAA-Bürste auf der "falschen" Seite des isoelektrischen Punkts, d.h. unter elektrostatischer Nettoabstoßung, eine Volumenverringering beinhalten kann, die unter hohem Druck begünstigt wird. Es wird diskutiert, ob diese Volumenverringering mit einer Hydratation von Gegenionen zusammenhängt [32], die von den PAA-Ketten und der Proteinoberfläche freigesetzt werden. Im Gegensatz dazu stimmen die erhaltenen Daten bei pH-Werten nahe des isoelektrischen Punkts mit einem Ladungsregulierungsmechanismus [33] überein, der eine Volumenzunahme beinhaltet. Die Anwendung von Hochdruck in Kombination mit einer pH-Variation, wie in dieser Studie durchgeführt, liefert also die Volumenänderungen bei der Adsorption, die mit einem vorgeschlagenen Mechanismus der Proteinwechselwirkung an einer PAA-Bürste übereinstimmen muss.



3.1 Einführung

In der Biotechnologie und der Biomedizin spielt die Adsorption von Proteinen an Grenzflächen eine entscheidende Rolle. Die Immobilisierung von Proteinen an wässrig-festen Grenzflächen wird in einer Vielzahl von Anwendungen genutzt wobei auf den Erhalt der Struktur, der Dynamik und der biologischen Aktivität der Proteine geachtet werden muss [34, 35]. Darüber hinaus sollte der Proteinadsorptionsgrad durch physikalisch-chemische Parameter wie pH-Wert, Ionenstärke oder Temperatur steuerbar sein, um die Desorption und Wiederverwendung der Proteine und der Grenzfläche zu ermöglichen [36, 37, 38].

Polyelektrolyt-Bürsten als Grenzflächen

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass wässrig-feste Grenzflächen, die mit einer Polyacrylsäure-Bürste (PAA) modifiziert wurden, die meisten dieser Anforderungen erfüllen [9]. Eine PAA-Bürste besteht aus langen PAA-Ketten, die dicht auf den festen Träger verankert sind [39]. Abhängig vom Verankerungsgrad und dem Ladungsabstand strecken sich die Polymerketten in wässrigen Lösungen und bilden eine dreidimensionale Struktur, die viel Platz für Proteine, Gegenionen und Substratmoleküle bietet [40] (Abb. 3-1).

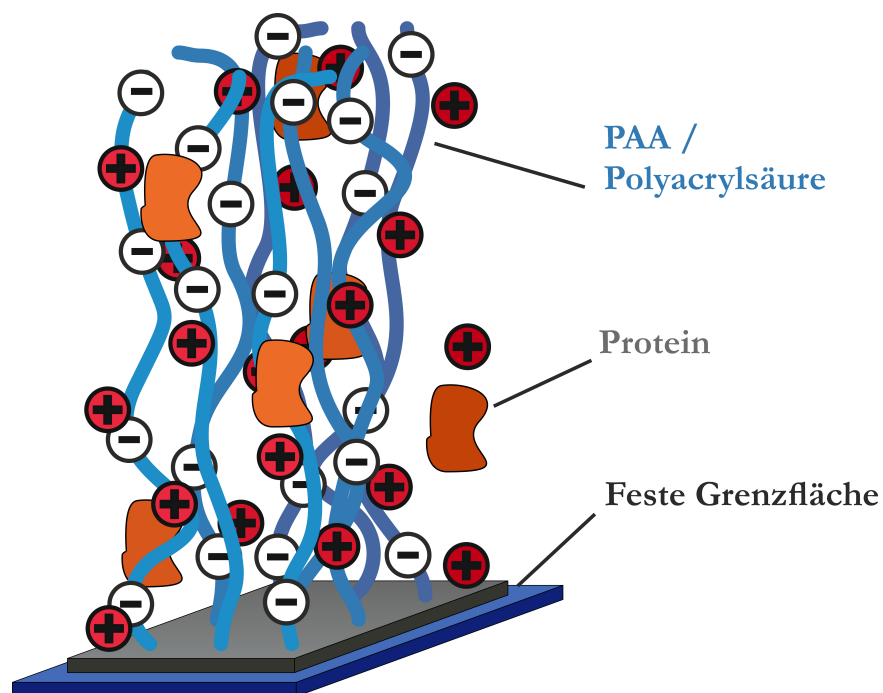


Abb. 3-1 Schematische Darstellung einer Polyacrylsäure-Bürste mit adsorbiertem Protein und Gegenionen. Auf der festen Grenzfläche ist eine Schicht (z.B. Polystyrol) aufgetragen in der die Polymerketten verankert sind.

Im Laufe der Masterarbeit [8] konnte gezeigt werden, dass für ein positiv geladenes Protein innerhalb von 30 min in der PAA-Bürste eine Sättigung bezüglich der Adsorption erreicht wird (Abb. 3-2). Wenn die Ionenstärke einer Proteinlösung niedrig ist, adsorbieren die Proteinmoleküle selbst auf der „falschen“ Seite des isoelektrischen Punkts (d.h. wenn das Protein eine negative Nettoladung aufweist) an einer PAA-Bürste [41, 42]. Durch Erhöhen der Ionenstärke auf einige 100 mM durch Zugabe von Salz wird die PAA-Bürste jedoch fast vollständig proteinresistent [43, 42] (Abb. 3-2). Strukturstudien ergaben ebenfalls, dass die Proteinmoleküle bei der Adsorption tief in die PAA-Bürste eindringen [44].

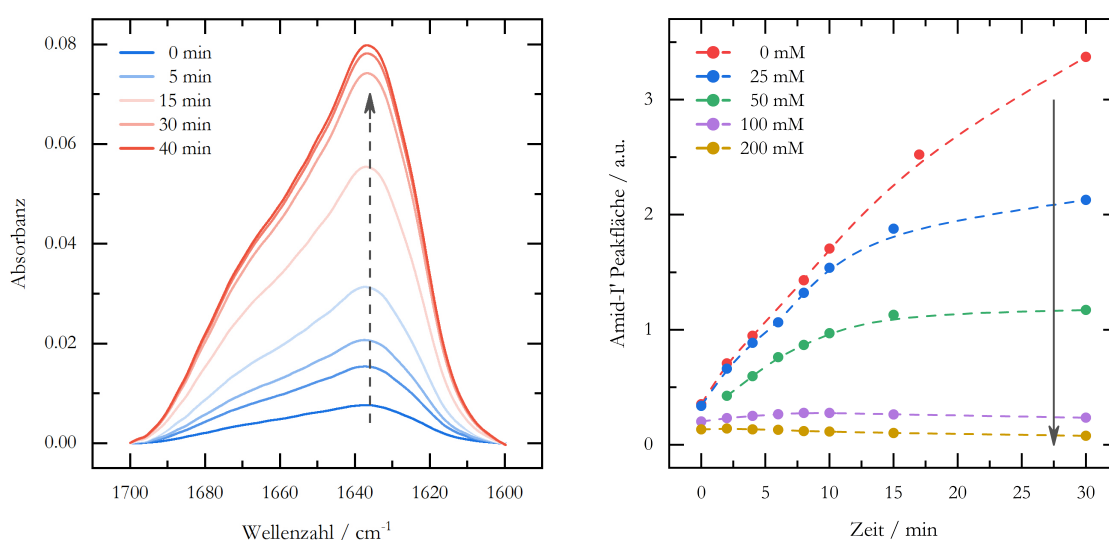


Abb. 3-2 Adsorptionsverlauf einer α -Chymotrypsin-Lösung (0.1 mg mL^{-1} , 20 mM MOPS-Puffer, $\text{pD} = 7.6$ [$\text{pI} = 9$]) an einer PAA-Bürste. *Links:* Zeitabhängige ATR-FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande von α -CT, die eine Sättigung der Bürste nach ca. 30 min zeigen. *Rechts:* Zeitabhängiger Verlauf der Amid-I'-Peakflächen mit steigender Ionenstärke der Lösung. Die Angaben in der Legende beziehen sich auf die Zugabe an NaCl zur Protein-Lösung und zeigen eine Proteinresistenz der Bürste ab einer Ionenstärke von wenigen 100 mM. Die Abbildungen sind aus [8, 9] entnommen und wurden zwecks Darstellung abgewandelt.

Tabelle 3-1 Anteile (angegeben in %) der Sekundärstrukturelemente bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ von freiem α -CT (in Lösung) und welchem, das in der PAA-Bürste adsorbiert ist. ^a

| | 1687 cm^{-1} | 1670 cm^{-1} | 1654 cm^{-1} | 1636 cm^{-1} |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Adsorbiert ^c | 2 | 19 | 24 | 53 |
| In Lösung ^b | 3 | 18 | 23 | 53 |

^a Die Fehler der angegebenen Werte liegen bei $\pm 2 \%$ (aus 2 bzw. 3 unabhängigen Messungen gemittelt).

^b Aus Transmissions-FTIR-Spektren ermittelt. ^c Aus ATR-FTIR-Spektren ermittelt.

Darüber hinaus ist die Sekundärstruktur von Proteinen in einer PAA-Bürste und in wässriger Lösung sehr ähnlich (Tabelle 3-1), und die katalytische Aktivität von adsorbierten Enzymen wurde als ziemlich hoch beobachtet [9].

Somit bietet eine PAA-Bürste eine günstige Umgebung für Proteine, und ihre Proteinaffinität kann leicht durch die Ionenstärke der Proteinlösung gesteuert werden. Es ist also sinnvoll, den Adsorptionsprozess genau zu verstehen, um solche Grenzflächen gezielt nutzen und modifizieren zu können.

Adsorption an Polyelektrolyt-Bürsten

Wenn das Protein eine positive Ladung trägt, so erscheint der Adsorptionsprozess simpel: Es gibt starke anziehende elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Protein und der PAA-Bürste, die die Haupttriebkraft der Adsorption darstellen müssen. Darüber hinaus werden die positiven Gegenionen der PAA-Kette und die negativen Gegenionen des Proteins in die Lösung freigesetzt, was eine zusätzliche, entropische Triebkraft ist. Jedoch ist es offenbar so, dass auch negativ geladene Proteine an der negativ geladenen PAA-Bürste, selbst unter elektrostatischer Abstoßung, adsorbieren [43, 44]. Anscheinend ist der Mechanismus der Proteinadsorption an einer PAA-Bürste nicht trivial, und es gibt einige Diskussionen bezüglich der Adsorption auf der „falschen“ Seite des isoelektrischen Punkts. So werden im Wesentlichen drei weitere Beiträge genannt:

- Ladungsanisotropie – Auch auf der Proteinoberfläche mit einer negativen Nettoladung gibt es stets Bereiche, die positiv geladen sind. Diese können bei der Adsorption mit den PAA-Ketten interagieren. Darüber hinaus führt die hohe Konzentration von Gegenionen in der PAA-Bürste zu einem großen osmotischen Druck, welcher mit einer günstigen Freisetzung von Gegenionen verbunden ist [45, 46].
- Ladungsregulierung – Ist der pH-Wert nicht signifikant höher als der isoelektrische Punkt des Proteins, so haben Modellrechnungen gezeigt, dass ein negativ geladenes Protein beim Eintritt in die PAA-Bürste eine Ladungsumkehr durchläuft [47]. Somit bekommt also ein zuvor negativ geladenes Protein positive Ladungen und kann unter elektrostatischer Anziehung mit der PAA-Bürste wechselwirken.
- Gegenionenverdampfung – Tritt ein negativ geladenes Protein mit seinen positiv geladenen Gegenionen in eine PAA-Bürste ein, so werden diese in die Bürste freigesetzt. Dieser Vorgang findet statt, weil die PAA-Bürste durch ein negatives Donnan-Potential gekennzeichnet ist und die positiv geladenen Gegenionen des Proteins nicht mehr ausschließlich an der Proteinoberfläche lokalisiert sind. Berechnungen haben gezeigt, dass diese Freisetzung der Gegenionen in die Bürste ebenfalls mit einem Gewinn an freier Energie verbunden wäre [33].

Es lässt sich also feststellen, dass die Triebkraft der Adsorption aus vielen konkurrierenden Faktoren besteht, deren Gleichgewicht mit Sicherheit von genauen Eigenschaften des Grenzflächensystems abhängt.

Die vorgestellten Mechanismen beruhen alle auf theoretischen Überlegungen, wobei es schwierig ist, die Beiträge der verschiedenen Wechselwirkungen zwischen einem Protein und der PAA-Bürste zu quantifizieren. Dies auf der Grundlage experimenteller Ergebnisse zu tun, ist jedoch noch sehr viel schwieriger. Daher wurde in dieser Arbeit die Kombination aus Druck und pH-Variation verwendet, um den Mechanismus der Proteinadsorption an einer PAA-Bürste auf der „falschen“ Seite des isoelektrischen Punkts, d.h. unter elektrostatischer Nettoabstoßung, genauer zu charakterisieren. Druck stellt dabei eine ausgezeichnete Sonde zur Volumenerkennung dar. Wenn der Proteinadsorptionsgrad mit dem Druck zu- oder abnimmt, muss der Adsorptionsprozess mit einer Volumenverringerung bzw. -vergrößerung verbunden sein. Es gibt einige Hauptursachen für die Volumenreduktion in einer wässrigen Proteinlösung unter hohem Druck. Zum einen werden Proteinhohlräume gefüllt, zum anderen neugebildete Ladungen hydratisiert. Das Volumen sinkt dabei, weil die Packungsdichte der Wassermoleküle, die an einer Hydrathülle beteiligt sind, höher ist als in freiem Wasser [48, 49]. Somit begünstigt Druck die Dissoziation von Ionenbindungen und die Freisetzung starkgebundener Gegenionen. Druckabhängige Messungen des Proteinadsorptionsgrades an einer PAA-Bürste stellen also eine vielversprechende Methode dar, um den Adsorptionsvorgang genauer zu verstehen, weil die begleitende Volumenänderung als zusätzlicher thermodynamischer Parameter erhalten wird, der mit dem vorgeschlagenen Interaktionsmechanismus in Einklang stehen muss.

Das Modell

Als Modellprotein wird in diesem Kapitel Calmodulin (CaM), welches mit Ca^{2+} -Ionen (holo-CaM) gesättigt ist, verwendet. Mit 148 Aminosäuren gehört es zu den relativ kleinen Proteinen und weist bei neutralen pH-Werten eine negative Nettoladung von -15 auf [50]. Es ist in der Lage, mit verschiedenen, in der Regel positiv geladenen und hydrophoben, Peptiden und Ligandenmolekülen zu interagieren. Während holo-CaM ohne Ligand eine offene, hantelförmige Konformation aufweist, induziert die Bindung von vier Trifluoperazin (TFP)-Molekülen eine geschlossene globuläre Konformation (Abb. 3-3) [51, 52]. In dieser Studie wird die TIRF-Spektroskopie eingesetzt, um den Grad der holo-CaM-Adsorption an einer PAA-Bürste in Abhängigkeit von Druck, pH-Wert und TFP-Bindung zu bestimmen. Hierfür wurde holo-CaM mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

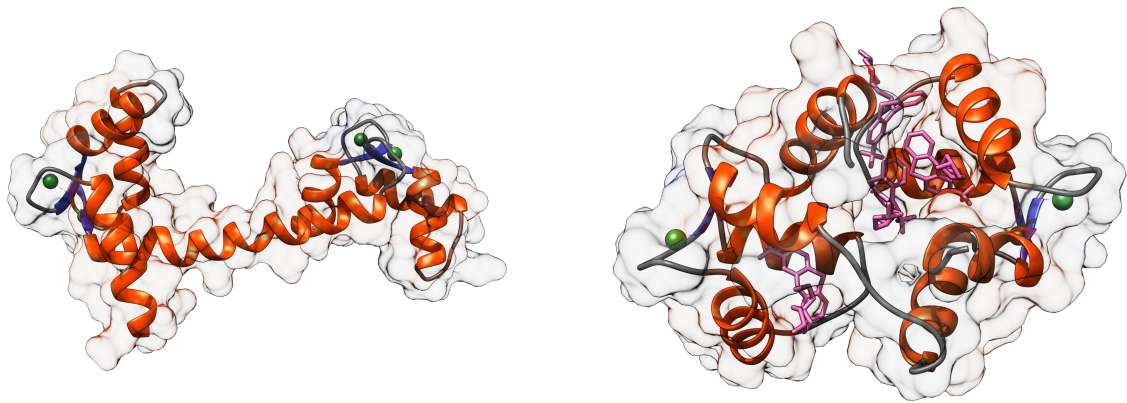


Abb. 3-3 Darstellung der Sekundär- und Tertiärstruktur vom Ca^{2+} gesättigten, hantelförmigen holo-CaM (links) und globulären holo-CaM + 4 TFP (rechts). Die Abbildungen sind mit der Software Chimera 1.10.2 angefertigt, es wurden folgende PDB-IDs verwendet: 3CLN und 1LIN. *Orange*: α -Helices, *Blau*: β -Faltblatt, *Grün*: keine definierte Sekundärstruktur, *Grün*: Ca^{2+} , *Pink*: TFP.



3.2 Präparation

Rekombinantes CaM aus der Ratte wurde unter Verwendung des (pET-14b)-Vektors von GenScript (Piscataway, New Jersey, USA) und *E. coli*-BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL-kompetenten Zellen von Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), wie in der Literatur beschrieben, hergestellt [53]. Die Reinheit des hergestellten Proteins wurde mithilfe einer SDS-PAGE überprüft. Die Größe und Konformation der erhaltenen Proteinmoleküle wurde mithilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung bestimmt [54]. Das Protein wurde anschließend mit dem Alexa-488-Fluorophor von Thermo Fischer Scientific (Kat.-Nr. A20000) gemäß der Anweisung des Herstellers markiert. Das aufgereinigte Protein wurde in 10 μL -Aliquots bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und jeden Tag eine frische Probe angesetzt. Dabei wurde ein Aliquot des Proteins mit der Pufferlösung zu 8 μM verdünnt. Die Pufferlösung enthielt 10 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), 2.5 mM CaCl_2 und optional 90 μM Trifluoperazin (TFP).

Langmuir-Schaefer Technik

Die PAA-Bürsten wurden im Wesentlichen entsprechend der Literatur auf Quarzprismen hergestellt [55]. Die Quarzprismen bestehen aus Quarzglas (Corning 7980) und wurden bei Micro Optics (Schmiedefeld, Deutschland) erworben. Zunächst erfolgte eine Reinigung mit Toluol, Ethanol und Salpetersäure. Anschließend wurde eine dünne Schicht $44\,000\text{ g mol}^{-1}$ Polystyrol (PS) aufgetragen, indem eine 6 mg mL^{-1} -PS-Lösung in Toluol für 30 s bei 3000 U min^{-1} durch *Spincoating* abgeschieden worden ist. Das beschichtete Prisma wurde für 15 min auf $100\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt, was zum „Schmelzen“ der PS-Schicht führt und eine möglichst glatte Oberfläche liefert. Die PAA-Bürste wurde durch Übertragen des Diblockcopolymer Poly(styrol-*b*-acrylsäure) (PS-PAA) von einer Wasseroberfläche auf die PS-Schicht nach der Langmuir-Schaefer-Technik (Abb. 3-4) hergestellt [42]. PS-PAA wurde von Polymer Source (Montreal, Kanada) mit 3500 g mol^{-1} PS und 11.500 g mol^{-1} PAA erhalten. Approximiert gibt es im Schnitt 160 PAA-Monomere mit einer Konturlänge von ca. 400 \AA . Es wurden 25 mg PS-PAA in 10 mL 1,4-Dioxan und 15 mL Toluol mithilfe von Ultraschall gelöst. Diese Lösung wurde anschließend auf der Wasseroberfläche eines Langmuir-Trogs (Modell 611D von Nima) verteilt. Um eine PS-PAA-Monoschicht und reproduzierbare Verankerungsdichten zu gewährleisten, wurde der Oberflächen- druck stets auf 15 mN m^{-1} gehalten. Der pH-Wert der Wassersubphase wurde mit konzentrierter HCl-Lösung auf etwa vier gesenkt, um die Ladung des Copolymer zu reduzieren und die Copolymer-Monoschicht auf der Wasseroberfläche zu stabilisieren. Das Quarzprisma wurde

langsam auf die Wasseroberfläche abgesenkt, so dass die PS-Schicht die PS-PAA-Monoschicht nahezu parallel berührt. Eine Neigung von wenigen Grad ist wichtig, um beim Anheben die Flüssigkeitskontaktlinie langsam über den PS-Film des Quarzprisma zu bewegen. Diese Methode gewährleistet ein reproduzierbares Übertragungsverhältnis von etwa 1.5 (aus der Flächenreduzierung der PS-PAA-Monoschicht und der Oberfläche des PS-Films auf dem Quarzprisma berechnet).

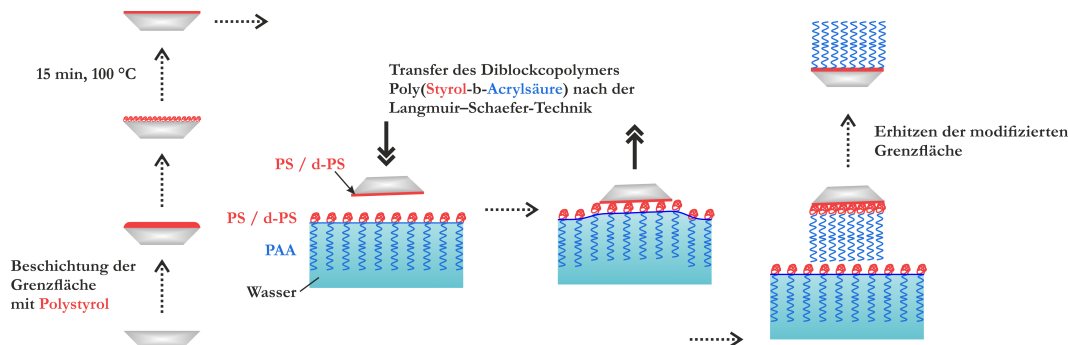


Abb. 3-4 Schematische Darstellung der Bürsten-Präparation nach der Langmuir-Schaefer-Technik.

Abschließend wurde das modifizierte Quarzprisma für 10 min auf 100 ° C erhitzt. Dies führt zu einer Diffusion der PS-Ketten des Copolymers in den PS-Film, wodurch eine stabile und irreversibel fixierte PAA-Bürste erzeugt wird.

Experimentelle Parameter

Die Röntgenreflektometrie wurde verwendet um den Aufbau der PAA-Bürste nachzuverfolgen. Die Messungen wurden bei 20 °C an der Luft aufgenommen. Für die Anpassung der Elektronendichten wurde ein einfaches Schichtenmodell in der Parratt32-Software [56] verwendet.

Die Hochdruck-TIRF-Spektroskopie wurde verwendet, um den Adsorptionsgrad von CaM zu bestimmen. Aus Sicherheitsgründen wurden keine höheren Drücke als 2500 bar verwendet. Die Temperatur wurde bei 20 °C konstant gehalten. Für jeden Scan wurde die Probenküvette mit Protein-Lösung gefüllt und 1 Stunde lang äquilibriert, um eine Sättigung der PAA-Bürste mit dem Protein zu gewährleisten. Die Daten wurden anschließend in Anwesenheit der Protein-Lösung in Schritten von 500 bar aufgenommen.

3.3 Ergebnisse

Nachfolgend werden die erhaltenen Ergebnisse dieses Projekts vorgestellt, dessen ausführliche Diskussion findet im folgenden Kapitel statt. Alle Messungen wurden stets mit frisch präparierten Lösungen und PAA-Bürsten durchgeführt und 3- bis 5-fach reproduziert, falls nicht anders erwähnt. In die gezeigten Mittelwerte sind alle Messreihen eingeflossen, so denn eine Messung nicht eindeutig als fehlerhaft identifiziert werden konnte (z.B. Defekte der Apparatur oder der Zelle während der Messung).

Charakterisierung des Systems

Der Aufbau der PAA-Bürste auf dem TIRF-Prisma wurde mittels Röntgenreflektometrie verfolgt. Für jede TIRF-Messung wurde stets eine frische Bürste hergestellt. Somit kann mit großer Sicherheit behauptet werden, dass jedes beschichtete Prisma auch tatsächlich eine Bürste enthalten hatte. In Abb. 3-5 (links) sind typische Röntgenreflektivitätskurven gezeigt, die während des Aufbaus der PAA-Bürste im trockenen Zustand an der Luft aufgenommen wurden.

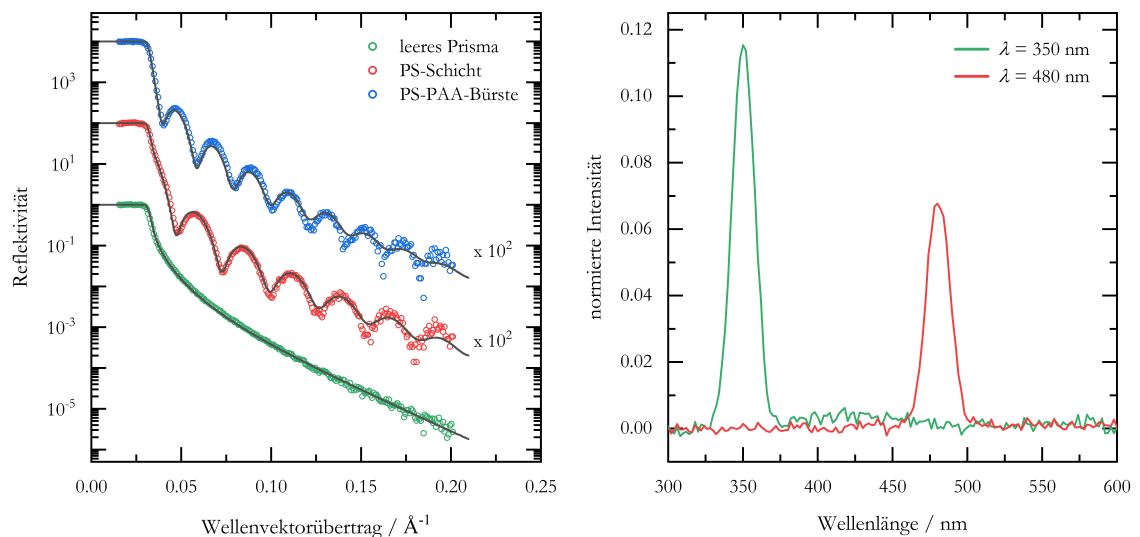


Abb. 3-5 Beispielhafte Charakterisierung der PAA-Bürste. *Links:* Überwachung des Aufbaus der PAA-Bürste auf dem Quarz-Prisma der TIRF-Probenzelle. Zur Berechnung der Reflektivität wurde auch das Artefakt des *Footprints* korrigiert. Die Symbole zeigen typische gemessene Reflektivitäten an, während die durchgezogenen Linien die Anpassungskurven repräsentieren. Die entsprechenden Anpassungen basieren auf Schichtmodellen, die Quarz, PS, PAA und Luft simulieren [31]. *Rechts:* Fluoreszenzspektren der reinen PAA-Bürste in Abhängigkeit der gewählten Anregungswellenlängen. Die Normierung erfolgte jeweils auf die Intensität des Referenzkanals. Die Spektren zeigen nur die Lichtstreuung der Anregung und keinen fluoreszenten Untergrund.

Werden PS und PS-PAA auf der Grenzfläche abgeschieden, so bilden sich ausgeprägte Kiessig-Oszillationen, die eine glatte, nicht periodische Schicht kennzeichnen. Diese entstehen durch die Interferenz der an der Quarz-Polymer- und der Polymer-Luft-Grenzfläche reflektierten Röntgenstrahlen. Die Breite der Schwingung ist dabei reziprok proportional zur Dicke des gesamten Films. Somit lässt sich der Erfolg des Aufbaus selbst ohne eine Anpassung qualitativ festhalten, da die Breite der Oszillationen beim Hinzufügen der PS-PAA-Schicht zum PS-Film abnimmt. Darüber hinaus sind in Abb. 3-5 (links) die Anpassungskurven dargestellt. Diese wurden unter der Annahme eines einfachen Schichtenmodells (Quarz-PS-PAA-Luft) für das Elektronendichteprofil modelliert. Es werden Werte für die Streulängendichte (SLD), Rauheit und Dicke der einzelnen Schichten erhalten (Tabelle 3-2). Aus diesen Werten kann nun, mithilfe des klassischen Elektronenradius r_e , die Verankerungsdichte der erhaltenen PAA-Bürste abgeschätzt werden:

$$\sigma = \frac{\rho_{\text{PAA}} \cdot d_{\text{PAA}}}{r_e \cdot N_{e,\text{PAA}}}. \quad (3-1)$$

Mit einer durchschnittlichen Anzahl an Elektronen N_e pro PAA-Kette von 6069 und den aus den Anpassungen erhaltenen Werten (Tabelle 3-2) für die $\text{SLD} \approx \rho_{\text{PAA}}$ und Schichtdicke d_{PAA} ergibt sich eine Verankerungsdichte von $\sigma = 0.3 \text{ nm}^{-2}$. Die Ergebnisse zeigen darüber hinaus eine PS-Schichtdicke von $219 \pm 3 \text{ \AA}$ und eine Höhe der kollabierten PAA-Bürste von $59 \pm 9 \text{ \AA}$.

Tabelle 3-2 Die aus den Anpassungen der Röntgenreflektivitätskurven erhaltenen Daten für die Parameter zur Charakterisierung des PAA-Bürstenaufbaus. Die Mittelwerte wurden aus 5 bis 9 Messungen gebildet und beziehen sich auf die einzelnen Schichten.

| | Schichtdicke / \AA | SLD / $10^{-6} \cdot \text{\AA}^{-2}$ | Rauheit / \AA |
|--------------|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| Quarz | | 19 ± 3 | 8 ± 1 |
| PS | 219 ± 3 | 9 ± 1 | 6 ± 1 |
| PAA | 59 ± 9 | 11 ± 1 | 8 ± 1 |
| PS* | 221 ± 7 | 9 ± 1 | 6 ± 1 |
| PAA* | 62 ± 3 | 9 ± 1 | 10 ± 3 |

* Daten nach Waschen mit Wasser: Nach der herkömmlichen Herstellung der Schichten und Vermessung mittels Röntgenreflektometrie wurde das modifizierte Prisma gründlich mit Wasser gespült um eventuel überschüssiges Polymer abzuwaschen und sicher zu gehen, dass eine irreversibel gebundene Schicht erhalten und weiterverwendet worden ist.

Dabei ist die Dicke der PS-Schicht irrelevant. Zum einen nimmt diese keine Proteine auf und zum anderen ist der Brechungsindex von PS höher als der von Quarz. Dies führt dazu, dass die totale Reflexion erst hier stattfindet und die evaneszente Welle somit erst an der Grenzfläche

PS-PAA entsteht. Die Höhe der PAA-Schicht dagegen ist entscheidend und beträgt im kollabierten Zustand ca. 60 Å. Wird die Konturlänge ausgehend von 160 Monomeren pro PAA-Kette berechnet, so ist die maximale Höhe der gebildeten Bürste 400 Å. Eine Anpassung von Neutronenreflektivitätskurven (diese wurden im Gegensatz zu Röntgenreflektivitäten in wässriger Lösung und nicht an Luft aufgenommen) hat gezeigt, dass sich die PAA-Ketten in wässriger Umgebung strecken und eine Länge von 200 – 250 Å aufweisen [9]. Zum Vergleich: Die Handtelform des zu adsorbierenden Proteins besitzt eine maximale Länge von 70 Å und die mit 4 TFP Molekülen komplexierte globuläre Form einen Durchmesser von 45 Å, wie durch SAXS-Messungen gezeigt wurde [54].

Abschließend wurden die Fluoreszenz-Eigenschaften der hergestellten PAA-Bürste sowie des gesamten Systems untersucht. Dies ist notwendig um sicher zu gehen, dass die detektierten Signale der TIRF-Intensitäten tatsächlich nur vom markierten Protein stammen. Hierfür wurden die für die normalen TIRF-Messungen verwendeten PAA-Bürsten Puffer vermessen. Es wurden unterschiedliche Anregungswellenlängen gewählt und entsprechende TIRF-Emissionsspektren aufgenommen. Wie in Abb. 3-5 (rechts) zu sehen, können lediglich Signale des Streulichtes detektiert werden. Die präparierte PAA-Bürste zeigt also keine Fluoreszenz bei den gewählten Anregungswellenlängen ($\lambda = 350$ und 480 nm).

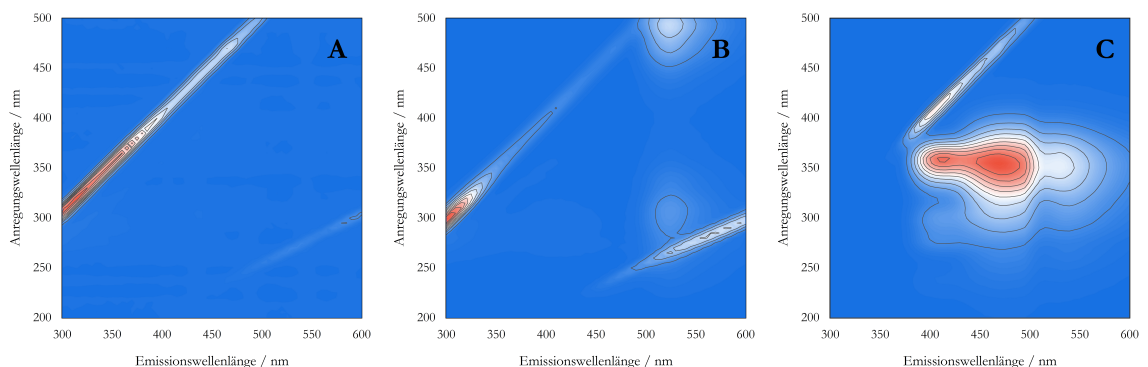


Abb. 3-6 Fluoreszenzmatrizen der Einzelkomponenten des Systems. Dargestellt sind die Emissionsintensitäten (300 – 600 nm) in Abhängigkeit der Anregungswellenlängen (200 – 500 nm). Die Intensitäten sind auf die Anregungsintensität normiert. Die Skalierung entspricht einem Farbgradienten zwischen blau (Min) und rot (Max). Die Konturlinien geben die 10 %-Einteilung an. **A:** MES-Puffer; **B:** Alexa-488 markiertes CaM in MES-Puffer; **C:** TFP in MES-Puffer bei pH 5.

Die zuvor verwendeten (Abb. 3-5, rechts) Anregungswellenlängen (350 und 480 nm) wurden gewählt, weil diese die einzigen Punkte sind, bei denen das gewählte System angeregt werden kann (Abb. 3-6). Um diese Punkte zu finden, wurde von jeder Komponente eine Matrix aufgenommen. Hierfür wurde in einem Bereich von 200 bis 500 nm die Anregungswellenlänge in Schritten von 5 nm variiert und für jeden Punkt ein Emissionsspektrum im Bereich von 300 bis

600 nm und einer Schrittweite von 5 nm aufgenommen. Dabei ist zu erwähnen, dass sowohl die Konzentrationen, als auch die instrumentellen Parameter zwischen den unterschiedlichen Messungen nicht gleich gehalten worden sind. Der Zweck dieser Messungen war es nicht quantitative Fluoreszenzen zu bestimmen, sondern qualitativ zu untersuchen, ob die einzelnen Komponenten überhaupt Fluoreszenz zeigen, und falls, ja wo die maximale Ausbeute gefunden werden kann. Die Matrizen haben gezeigt, dass der gewählte Puffer absolut keine Fluoreszenz zeigt (Abb. 3-6, A). Hier ist lediglich das Streulicht erster ($\lambda_{\text{Ex.}} = \lambda_{\text{Em.}}$) und zweiter ($\lambda_{\text{Em.}} = 2 \cdot \lambda_{\text{Ex.}}$) Ordnung zu sehen. Da die verwendete holo-CaM-Mutante keine Trp-Seitenkette mehr besitzt (Abb. 3-6, B), ist in der aufgenommenen Matrix auch, wie erwartet, kein Trp-Peak ($\lambda_{\text{Ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em.}} = 350 \text{ nm}$) zu sehen, sondern lediglich Peaks der Alexa-Fluoreszenz ($\lambda_{\text{Ex.}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em.}} = 525 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Ex.}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em.}} = 525 \text{ nm}$). Zwar besitzt das TFP (Abb. 3-6, C) ein pH-abhängiges Fluoreszenzspektrum, allerdings ändert sich der Bereich nicht signifikant ($\lambda_{\text{Ex.}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em.}} = 400 - 550 \text{ nm}$). Es ergeben sich somit die zwei sinnvollen Anregungswellenlängen für das komplette System: zur Detektion von Alexa-488 an der CaM-Mutante $\lambda_{\text{Ex.}} = 480 \text{ nm}$ und zur Detektion von TFP $\lambda_{\text{Ex.}} = 350 \text{ nm}$.

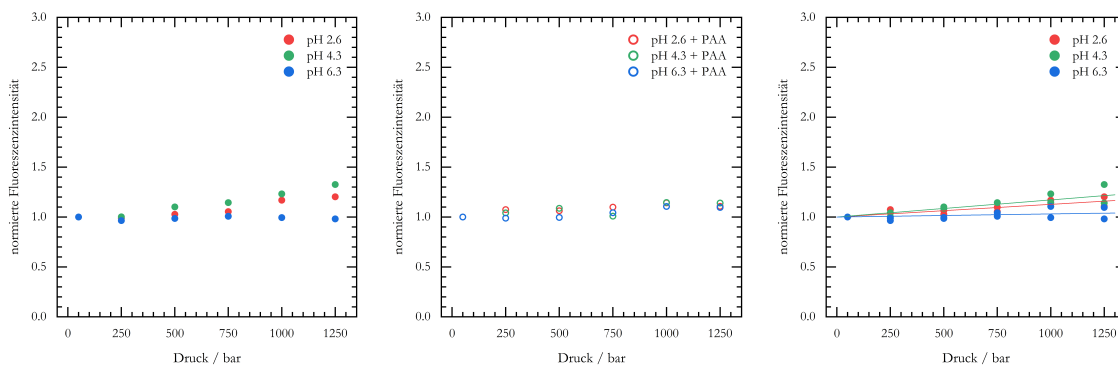


Abb. 3-7 Druckabhängige Fluoreszenzmessungen zwecks Bestimmung der Quantenausbeute. Die Fluoreszenzintensitäten sind auf die Intensität des Anregungslichtes normiert. Die Datenpunkte zeigen integrierte Alexa-488-Banden (500 – 600 nm), die auf den ersten Druckpunkt bei 50 bar normiert sind. *Links:* Alexa-488 markiertes CaM in Puffer; *Mitte:* Alexa-488 markiertes CaM in Puffer mit PAA; *Rechts:* Alle Messpunkte mit der zugehörigen linearen Regression. Die Fehler betragen für alle Punkte 5 – 10 % und stammen aus einer dreifachen Reproduktion (nicht gezeigt).

Nachdem die Charakterisierung des Systems abgeschlossen war, wurde die Adsorption von holo-CaM (gesättigt mit Ca^{2+}) an einer planaren PAA-Bürste untersucht. Hierfür wurden TIRF-Spektroskopie-Messungen in Abhängigkeit vom Druck bei verschiedenen pH-Werten in wässriger Protein-Lösung durchgeführt (Abb. 3-8). Die integrierte Intensität der TIRF-Bande von Alexa-488 ist im Allgemeinen proportional zu der Menge an markiertem holo-CaM, das sich in der

evaneszenten Welle an der Grenzfläche befindet, und zur Quantenausbeute der Fluoreszenzmarkierung, die vom Druck abhängen kann. Daher wurde die Fluoreszenzintensität von mit Alexa-488 markiertem holo-CaM auch in Puffer-Lösung als Funktion des Drucks bei denselben pH-Werten unter Verwendung herkömmlicher Fluoreszenzspektroskopie bestimmt, um die Korrekturfaktoren bezüglich der Quantenausbeute zu erhalten (Abb. 3-7, links). Neben der Messreihe mit gelöstem Protein wurde eine weitere in Gegenwart von gelöstem PAA bei einer Konzentration von 2 M in Bezug auf Monomere durchgeführt, um die Umgebung einer PAA-Bürste nachzuahmen (Abb. 3-7, mittig). Es konnte allerdings kein signifikanter Einfluss von PAA auf die Druckabhängigkeit der Fluoreszenzintensität des Alexa-488 markierten holo-CaM nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden die beiden Messreihen zusammengefasst (Abb. 3-7, rechts) und die Korrekturfaktoren (Tabelle 3-3) für die einzelnen Drücke und pH-Werte mittels einer linearen Regression berechnet.

Tabelle 3-3 Mittels linearer Regression (Abb. 3-7) erhaltene Korrekturfaktoren der Quantenausbeute.

| | 50 bar | 500 bar | 1000 bar | 1500 bar | 2000 bar |
|---------------|--------|---------|----------|----------|----------|
| pH 2.6 | 1.01 | 1.06 | 1.13 | 1.19 | 1.25 |
| pH 4.3 | 1.01 | 1.09 | 1.17 | 1.26 | 1.34 |
| pH 6.3 | 1.00 | 1.02 | 1.03 | 1.05 | 1.06 |

Adsorptionsverhalten mit Protein-Lösung

Eine Betrachtung der typischen, nicht prozessierten TIRF-Spektren (Abb. 3-8) lässt bereits Unterschiede feststellen. So fällt auf, dass bei pH 2.6 die Alexa-Bande mit steigendem Druck geringer wird, während diese bei höheren pH-Werten steigt. Zusätzlich scheint die absolute Intensität der Alexa-Bande bei einem pH-Wert von 6.3 geringer zu sein als bei niedrigeren pH-Werten. Dies deutet darauf hin, dass neben unterschiedlichem Wechselwirkungsverhalten unter Druck auch die adsorbierte Menge variiert. Beide Beobachtungen sprechen dafür, dass der Adsorptionsvorgang nicht durch rein elektrostatische Wechselwirkung beschrieben werden kann.

Zwar sind die absoluten Werte der integrierten Flächen der Alexa-Banden proportional zur adsorbierten Menge an CaM in der Bürste, allerdings ist ein direkter Vergleich zwischen zwei präparierten Bürsten oder zwei pH-Werten nicht sinnvoll. Quantenausbeuten und Fluoreszenzintensitäten sind direkt abhängig vom Übergangsdipolmoment und dieses wiederum von vielen Faktoren, die bei einem solch komplexen System wie hier sich nicht vollständig kontrollieren lassen. Deswegen besitzt jede Messung einen eigenen Proportionalitätsfaktor zwischen der Fluoreszenzintensität und der absoluten adsorbierten CaM-Menge, der nicht genau bestimmt

werden kann. Allerdings ändert sich innerhalb einer Druckreihe kaum etwas an diesem Faktor, was eine relative Betrachtung mit steigendem Druck zulässt. Um den relativen Grad der holo-CaM-Adsorption an der PAA-Bürste zu erhalten, wurden die integrierten TIRF-Intensitäten (500 – 600 nm, Abb. 3-8) auf die Werte des Anfangsdrucks von 50 bar normiert und durch die Korrekturfaktoren (Tabelle 3-3) an jedem Druckpunkt dividiert (Abb. 3-9).

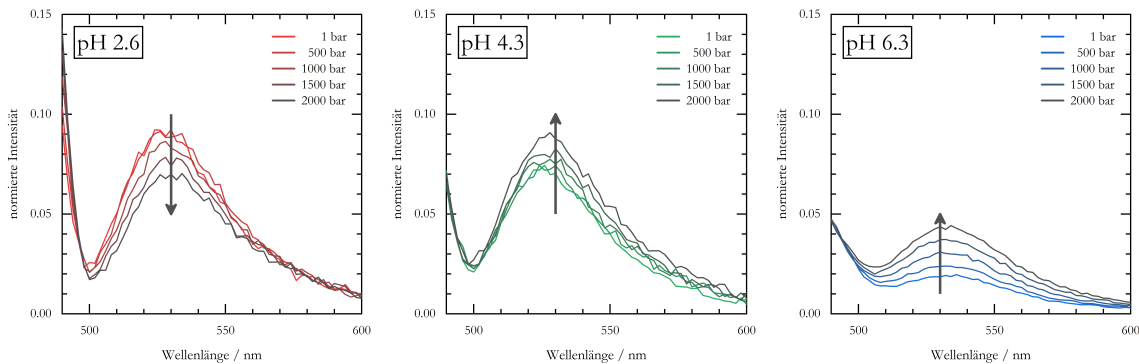


Abb. 3-8 Typische TIRF-Spektren von holo-CaM, markiert mit Alexa-488, an der Protein-Lösung / PAA-Bürste / Quarz-Grenzfläche. Es sind Spektren bei drei unterschiedlichen pH-Werten gezeigt. Alle Messungen wurden 3 -5 mal reproduziert und sind bereits auf das Anregungslicht normiert.

Bei einem pH-Wert von 2.6 ist die Nettoladung von holo-CaM (die Ca^{2+} -Ionen könnten nicht mehr gebunden sein) positiv, da der pH niedriger ist, als der isoelektrische Punkt ($\text{pI} = 4.1$) des Proteins [57]. Die PAA-Bürste ist bei diesem pH-Wert, der ca. zwei Einheiten unter dem pK_a -Wert (4.5) von PAA liegt, nahezu ungeladen [58]. Die Differenz von ca. zwei Einheiten entspricht einem Dissoziationsgrad von 1 %. Bei einer mittleren Kettenlänge von 160 PAA-Monomeren im Copolymer, ergibt das 1 bis 2 Ladungen pro PAA-Kette. Es besteht also eine schwache elektrostatische Anziehung zwischen holo-CaM und der PAA-Bürste, wenn man davon ausgeht, dass ein Protein-Molekül innerhalb der Bürste von einigen PAA-Ketten umgeben ist. Bei diesen Bedingungen zeigen sowohl die rohen TIRF-Daten (Abb. 3-8) als auch die normierten und korrigierten Daten (Abb. 3-9) eine druckinduzierte holo-CaM-Desorption von der PAA-Bürste. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für das positiv geladene α -Chymotrypsin an der PAA-Bürste gefunden [9].

Bei einem pH-Wert von 4.3 besitzt das holo-CaM keine nennenswerte Nettoladung ($\text{pI}=4.1$), wobei die PAA-Bürste (pK_a) zu einem großen Teil negativ geladen ist. Bei diesen Bedingungen zeigen die rohen (Abb. 3-8) und die normierten TIRF-Daten (Abb. 3-9, links) einen leichten Anstieg der Fluoreszenzintensität. Nach der Korrektur auf die Quantenausbeute deuten die Ergebnisse allerdings eher darauf hin, dass sich der Adsorptionsgrad bei $\text{pH}=4.3$ nicht mit steigendem Druck ändert (Abb. 3-9, rechts).

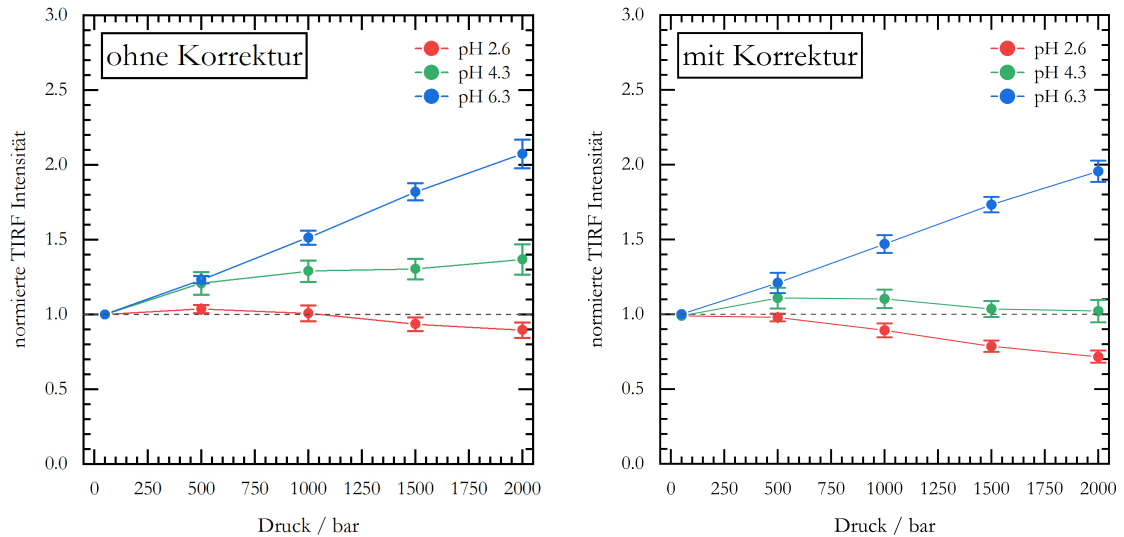


Abb. 3-9 Die relative Menge des an der PAA-Bürste adsorbierten holo-CaM als Funktion des Druckes unter pH-Variation. *Links*: integrierte Flächen der Alexa-Bande (s. Abb. 3-8), auf den ersten Druck-Punkt (50 bar) normiert; *Rechts*: integrierte Flächen der Alexa-Bande (s. Abb. 3-8), auf den ersten Druck-Punkt (50 bar) normiert und mit der Quantenausbeute (s. Tabelle 3-3) korrigiert. Die gestrichelte Linie zeigt den Wert von 1 und gibt somit den Vergleich zu 50 bar an.

Bei einem pH-Wert von 6.3 hat holo-CaM eine negative Nettoladung, da der isoelektrische Punkt signifikant niedriger ist. Die PAA-Bürste ist oberhalb eines pH-Wertes von 5 ebenfalls stark negativ geladen. Das Protein und die Grenzfläche tragen also die gleiche Ladung. Wie in Abb. 3-8 deutlich zu sehen ist, kann dennoch eine Adsorption detektiert werden, was auch schon für negativ geladenes Rinderserumalbumin [42] und α -Lactalbumin [44] beobachtet wurde. Darüber hinaus nimmt die Intensität der rohen TIRF-Daten mit steigendem Druck sogar zu (Abb. 3-8). Da der Druckeffekt auf die Alexa-488-Quantenausbeute nur sehr gering (Abb. 3-7) ist, bleibt dieser Trend selbst nach Normierung und Korrektur bestehen (Abb. 3-9). Bemerkenswerterweise zeigen die Experimente bei diesen Bedingungen eine Zunahme an adsorbiertem holo-CaM innerhalb der PAA-Bürste mit steigendem Druck. Der Adsorptionsprozess muss also mit einer Volumenabnahme verbunden sein, da der adsorbierte Zustand unter hohen Drücken favorisiert wird.

Adsorptionsverhalten mit Puffer-Lösung

Bei den bisher gezeigten Daten handelt es sich um Untersuchungen von Protein-Lösung / PAA-Bürste / Quarz- Systemen. Somit steht immer ausreichend Protein zur Verfügung welches in die Bürste adsorbieren kann. Auch ist es möglich, dass sich nicht nur fest adsorbierte, sondern auch frei diffundierende Proteine in der Bürste befinden.

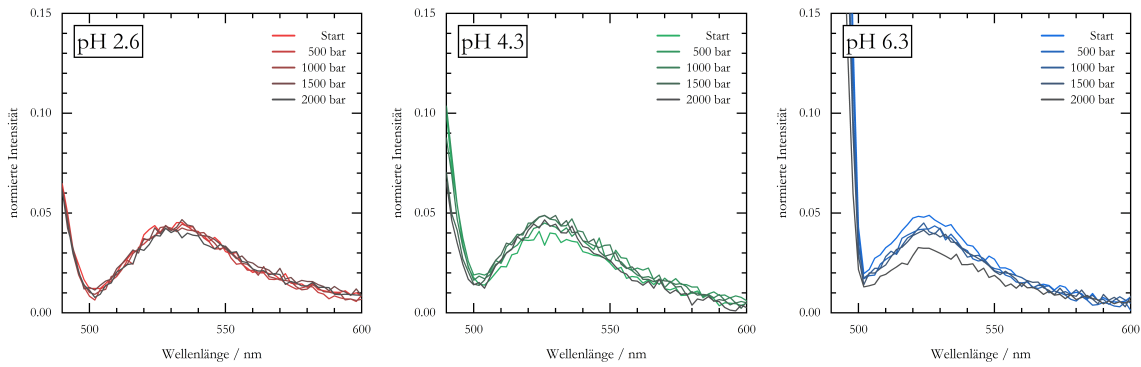


Abb. 3-10 Typische TIRF-Spektren von holo-CaM, markiert mit Alexa-488, an der Puffer-Lösung / PAA-Bürste / Quarz-Grenzfläche. Es sind Spektren bei drei unterschiedlichen pH-Werten gezeigt. Alle Messungen wurden 3 -5 mal reproduziert und sind bereits auf das Anregungslicht normiert.

Um die beobachteten Effekte besser erklären zu können, wurden die bereits vermessenen Bürsten mit adsorbiertem holo-CaM gründlich gespült und nochmals vermessen. Nun wurde die TIRF-Zelle statt mit Proteinlösung mit Puffer gefüllt. Somit konnte sichergestellt werden, dass ausschließlich adsorbiertes holo-CaM gemessen wird.

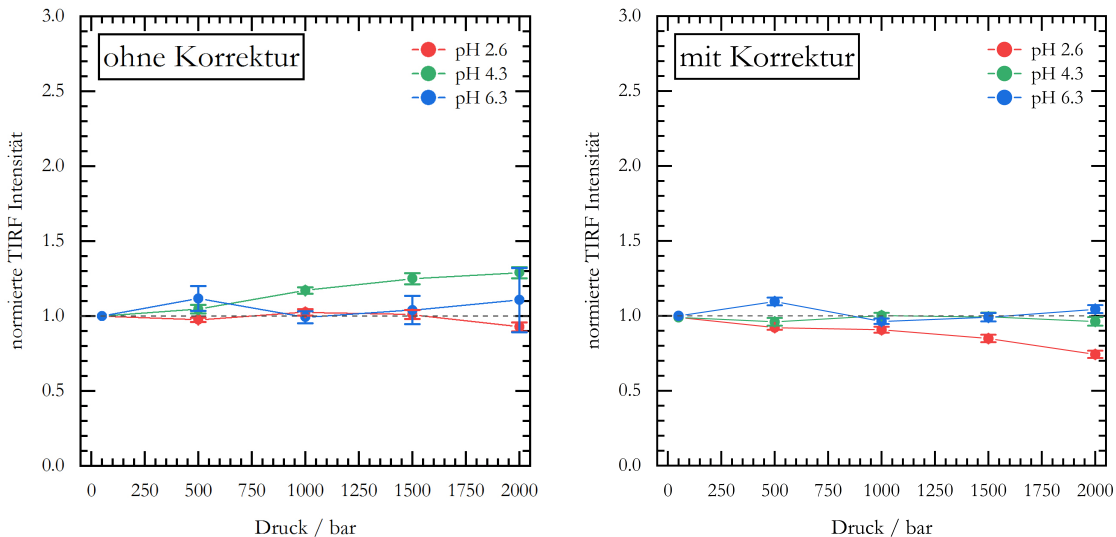


Abb. 3-11 Die relative Menge des an der PAA-Bürste adsorbierten holo-CaM als Funktion des Druckes unter pH-Variation. *Links*: integrale Flächen der Alexa-Bande (s. Abb. 3-10), auf den ersten Druck-Punkt (50 bar) normiert; *Rechts*: integrale Flächen der Alexa-Bande (s. Abb. 3-10), auf den ersten Druck-Punkt (50 bar) normiert und mit der Quantenausbeute (s. Tabelle 3-3) korrigiert. Die gestrichelte Linie zeigt den Wert von 1 und gibt somit den Vergleich zu 50 bar an.

Die Betrachtung der rohen TIRF-Spektren zeigt, dass keine signifikante Veränderung der Intensitäten beobachtet werden kann (Abb. 3-10). Dies würde dafür sprechen, dass weder Adsorption noch Desorption bei diesen Bedingungen stattfinden. Die normierten und auf die Quantenausbeute korrigierten Daten (Abb. 3-11) zeigen jedoch, dass bei einem pH-Wert von

2.6 weiterhin Desorption mit steigendem Druck stattfindet. Bei einem pH-Wert von 4.3 bleibt der Adsorptionsgrad weiterhin konstant und bei dem pH-Wert von 6.3 im Gegensatz zur vorhergegangenen Messreihe ebenfalls. Somit sind diese Ergebnisse konsistent mit den zuvor erhaltenen Werten. Das Verhalten für tiefe pH-Werte bleibt annähernd gleich, unabhängig davon ob in der überstehenden Lösung freies Protein zur Verfügung steht oder nicht. Bei einem pH-Wert von 6.3 findet keine Desorption statt, die zuvor beobachtete Erhöhung des Adsorptionsgrades wurde weder beobachtet noch erwartet: Da kein Protein in der überstehenden Lösung vorhanden ist, kann auch kein weiteres unter Druck adsorbieren.

Adsorptionsverhalten mit TFP

Wie in der Einführung beschrieben, ist holo-CaM in der Lage verschiedene Liganden bei neutralen pH-Werten zu binden [51]. Ohne einen Liganden hat holo-CaM eine hantelförmige Konformation. Bei der Komplexierung von 4 TFP Liganden findet eine Änderung der Konformation zu einem kugelförmigen, bis mindestens 3000 bar stabilen Komplex (Abb. 3-3) statt [52]. Bei neutralem pH trägt TFP zwei positive Ladungen, sodass beim Binden nicht nur eine stabilere globuläre Form eingenommen wird, sondern auch die negative Ladung von holo-CaM stark ($\sim +8 e$) verringert wird. In dieser Arbeit wurde der holo-CaM Lösung 12 eq. TFP zugesetzt um eine vollständige Komplexierung zu gewährleisten.

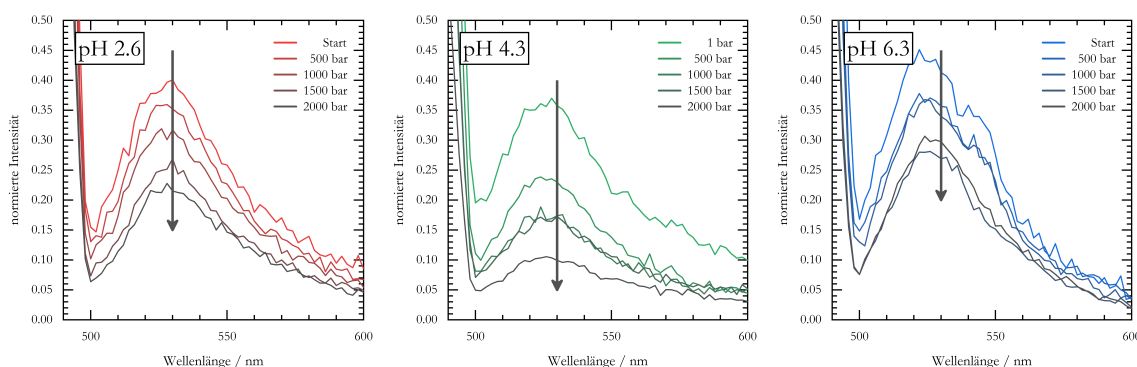


Abb. 3-12 Typische TIRF-Spektren von holo-CaM + 4 TFP, markiert mit Alexa-488, an der Protein-Lösung / PAA-Bürste / Quarz-Grenzfläche. Es sind Spektren bei drei unterschiedlichen pH-Werten gezeigt. Alle Messungen wurden 3 mal reproduziert und sind bereits auf das Anregungslicht normiert.

Vollständigkeitshalber wurden auch für dieses System die Messungen bei allen drei pH-Werten durchgeführt. Dabei ist zu erwähnen, dass lediglich die Messreihe bei $\text{pH} = 6.3$ relevant ist. Für die niedrigen pH-Werte sind weder Strukturen noch Bindungsverhältnisse bekannt. Deswegen wird im Folgenden lediglich die Wechselwirkung bei $\text{pH} 6.3$ ausführlich diskutiert. Die rohen

TIRF-Spektren (Abb. 3-12) deuten bereits darauf hin, dass sowohl der Adsorptionsgrad als auch die Druckabhängigkeit für alle drei pH-Werte sehr ähnlich ist. Mit steigendem Druck scheint bei der TFP-komplexierten Konformation unabhängig vom pH-Wert eine Desorption stattzufinden.

Die normierten und korrigierten Daten zeigen ebenfalls ausschließlich Desorption mit steigendem Druck für die globuläre Konformation des holo-CaM (Abb. 3-13). Die erhaltenen Daten für niedrige pH-Werte besitzen eine eher geringe Relevanz, weil diese nur schwer interpretiert werden können. Dennoch ist auffällig, dass die Verläufe bei allen pH-Werten nahezu gleich (Abb. 3-13) und sehr ähnlich zum Verlauf der nicht komplexierten Konformation bei pH 2.6 (Abb. 3-9) sind.

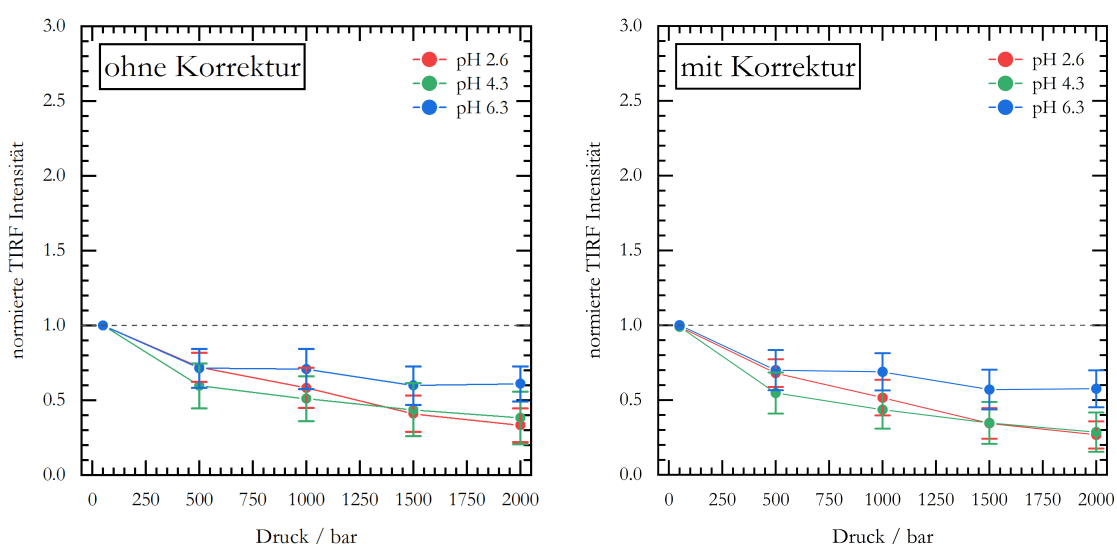


Abb. 3-13 Die relative Menge des an der PAA-Bürste adsorbierten holo-CaM · 4 TFP als Funktion des Druckes unter pH-Variation. *Links*: integrale Flächen der Alexa-Bande (s. Abb. 3-12), auf den ersten Druck-Punkt (50 bar) normiert; *Rechts*: integrale Flächen der Alexa-Bande (s. Abb. 3-12), auf den ersten Druck-Punkt (50 bar) normiert und auf die Quantenausbeute (s. Tabelle 3-3) korrigiert. Die gestrichelte Linie zeigt den Wert von 1 an und gibt somit den Vergleich zu 50 bar an.

Wie im vorausgegangenen Abschnitt wurden auch für dieses System Messungen mit gespülter Bürste und Puffer-Lösung in der TIRF-Zelle durchgeführt (s. Anhang Abb. 9-1). Allerdings konnte hier, insbesondere bei pH 6.3, kaum bzw. keine Adsorption festgestellt werden. Zwar wurden die Daten ebenfalls ausgewertet, werden aber hier nicht im Detail vorgestellt, weil deren Aussagekraft aufgrund des schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nur sehr gering ist und große Fehler aufweisen kann. Nichtsdestotrotz sollte erwähnt werden, dass die Trends der druckabhängigen Adsorption (Abb. 9-2) die gleichen sind und keinesfalls im Widerspruch mit den hier gezeigten Daten stehen

3.4 Diskussion

Wie in der Einführung erwähnt, wurde die Adsorption von Proteinen an einer PAA-Bürste bereits intensiv untersucht. Bei niedriger Ionenstärke adsorbieren Proteine an einer PAA-Bürste und dringen tief in diese ein, unabhängig von ihrer Nettoladung bei neutralem pH. Wenn jedoch die Ionenstärke der Proteinlösung auf wenige hundert millimolar erhöht wird, ist eine PAA-Bürste nahezu vollständig proteinresistent. Die Bindung von negativ geladenen Proteinen an einer PAA-Bürste wurde durch zwei theoretische Modelle erklärt, bei denen die Ladungsregulierung [47] und die Ladungsanisotropie der Proteinoberfläche [45] eine entscheidende Rolle spielen. Im letzteren Fall ist die Freisetzung von Gegenionen eine zusätzliche, wesentliche Triebkraft für die Adsorption. In dieser Arbeit wurde Druck als Parameter verwendet, um die theoretischen Modelle mit den beobachteten Druckreaktionen zu bewerten. Druck begünstigt immer denjenigen Prozess, der unter einer Volumenreduzierung verläuft. Insbesondere für wässrige Lösungen ist bekannt, dass Ionenbindungen durch Druck bis etwa 2000 bar gebrochen werden [48, 49]. Diese Beobachtung hängt im Wesentlichen damit zusammen, dass die Hydratisierung von Ionen mit einer Volumenabnahme einhergeht. Die dabei pro Ladung entstehende, geordnete Struktur der Hydrathülle besitzt ein um ca. 10 mL mol^{-1} kleineres Volumen als freies Wasser [59].

Die pH-Werte und das Protein in dieser Studie wurden so gewählt, dass drei unterschiedliche Fälle der Proteinadsorption betrachtet werden können. Der isoelektrische Punkt des Proteins ($pI = 4.1$) ist nahezu gleich dem pK_a -Wert der PAA-Ketten (4.5). Somit sind die betrachteten Fälle:

- Bei pH 2.6 – Unterhalb des isoelektrischen Punkts des Proteins und unterhalb des pK_a -Wertes der PAA-Ketten → Entgegengesetzte Nettoladung
- Bei pH 4.3 – In etwa am isoelektrischen Punkt des Proteins und am pK_a -Wert der PAA-Ketten → Keine bzw. kaum Nettoladung
- Bei pH 6.3 – Oberhalb des isoelektrischen Punkts des Proteins und oberhalb des pK_a -Wertes der PAA-Ketten → Gleiche Nettoladung

Im ersten Fall (pH 2.6) findet die Proteinadsorption an der PAA-Bürste unter schwacher elektrostatischer Anziehung statt, d.h. das Protein hat eine positive Ladung. Hier kann die Wechselwirkung auf eine einfache Weise erklärt werden: Die wenigen, noch vorhandenen negativen Ladungen der PAA-Ketten binden an die positiven Ladungen auf der Proteinoberfläche (Abb. 3-14, A). Solange sich die Gesamtzahl der hydratisierten Ladungen nicht ändert, sollte kein signifikanter Druckeffekt auf den Adsorptionsgrad erwartet werden. Da die Proteinoberfläche bei $pH = 2.6$ jedoch weitgehend positiv geladen ist, können sich die PAA-Ketten um das gesamte

Protein wickeln. Wahrscheinlich werden das Protein und die PAA-Ketten bei dieser Komplexbildung teilweise dehydratisiert. Die Freisetzung der hydratisierenden Wassermoleküle führt dann zu einer Volumenvergrößerung des Systems. In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde die Neutronenreflektometrie verwendet, um die Adsorption von positiv geladenem α -Chymotrypsin an einer negativ geladenen PAA-Bürste zu untersuchen [9].

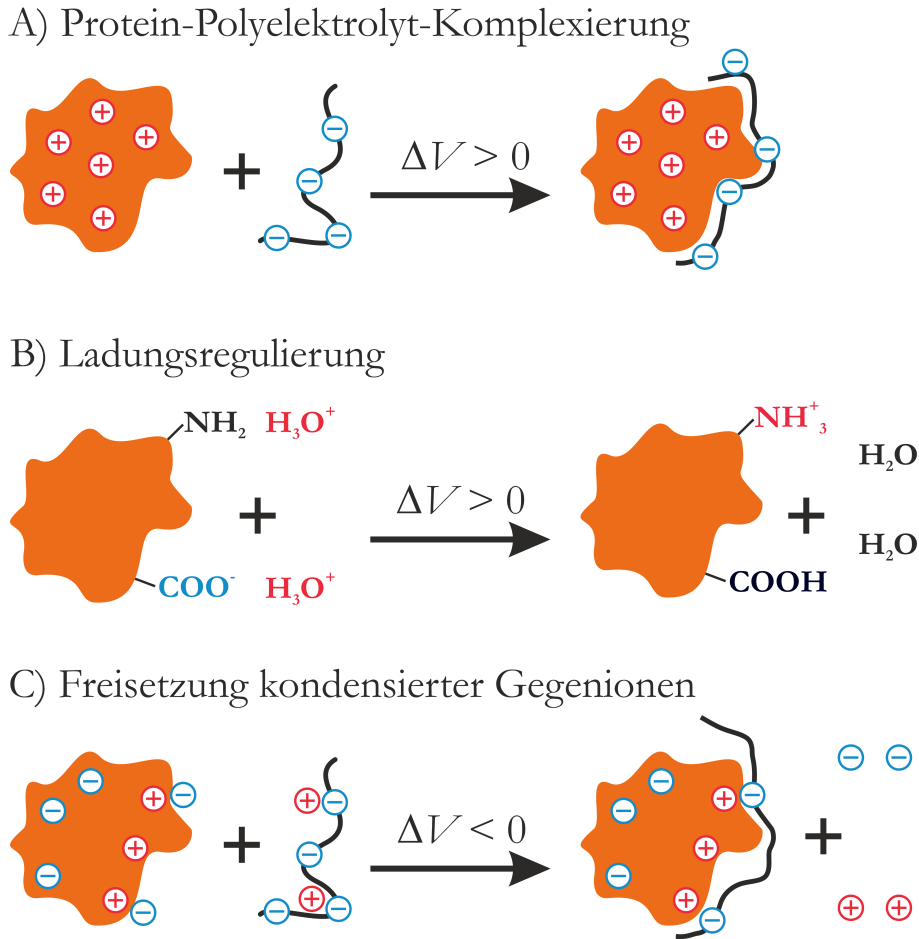


Abb. 3-14 Schematische Darstellung verschiedener Wechselwirkungen zwischen einem Protein und einer PAA-Bürste, die eine Volumenänderung beinhalten. Um die Volumenänderung ΔV abzuschätzen, wird angenommen, dass hydratisierende Wassermoleküle um getrennte Ladungen eine höhere Packungsdichte aufweisen als Wassermoleküle in der Volumenphase. Bei Druckanwendung werden stets Reaktionen mit Volumenabnahme bevorzugt [31].

Bei einer Erhöhung des Drucks auf 1000 – 2000 bar verringerte sich der Proteinadsorptionsgrad. Dies stimmt mit der Erwartung überein, dass Ionenbindungen zwischen PAA-Kette und Protein in wässriger Lösung unter diesen Drücken, aufgrund der Hydratisierung der entstehenden freien Ladungen, gebrochen werden. In dieser Arbeit kann bei einem pH-Wert von 2.6 ein ähnlicher Effekt beobachtet werden (Abb. 3-9). Bei diesen Bedingungen ist holo-CaM positiv geladen, wohingegen die PAA-Ketten einige negative Ladungen tragen. Wenn der Druck erhöht wird,

werden die bei der Adsorption gebildeten Ionenbindungen zwischen holo-CaM und PAA gebrochen und der Proteinadsorptionsgrad sinkt (Abb. 3-8 und Abb. 3-9). Gleiches Verhalten kann auch für das adsorbierte Protein mit Puffer im Überstand beobachtet werden.

Im zweiten Fall (pH 4.3) gibt es positive und negative Ladungen auf der Proteinoberfläche, da der pH-Wert nah am isoelektrischen Punkt des Proteins liegt. Unter diesen Bedingungen muss es also auch einen Komplexierungsmechanismus geben, da die negativen Ladungen der PAA-Ketten an die positiven Ladungsgebiete des Proteins binden können (Abb. 3-14, A). Dann sollte eine Erhöhung des Drucks wiederum dazu führen, dass diese Ionenbindungen gebrochen werden und der Proteinadsorptionsgrad sinkt. Alternativ wird nahe des isoelektrischen Punkts eine Ladungsregulierung des Proteins beim Eintritt in die Bürste vorgeschlagen [47]. Dabei kommt es zur Protonierung des Proteins, weil der lokale pH-Wert in der Bürste aufgrund der negativen Ladung der PAA-Ketten erniedrigt ist. Wie in Abb. 3-14, B schematisch dargestellt ist, gibt es zwei Hauptbeiträge: die Protonierung von Aminogruppen (Lys-, Arg- und His-Seitenketten) und die Protonierung von Carboxylatgruppen (Asp- und Glu-Seitenketten). Offensichtlich ist dieser Prozess mit einem Verlust der Gesamtladungszahl des Systems verbunden. Also führt die Ladungsregulierung auch zu einem Verlust von hydratisierenden Wassermolekülen um freie Ladungen und somit auch zu einer Volumenvergrößerung des Systems. Bei Druckapplikation würde also auch dieser Mechanismus zu einer Proteindesorption von der PAA-Bürste führen. Tatsächlich wurde allerdings im Rahmen des Fehlers keine druckinduzierte Veränderung des Adsorptionsgrades von holo-CaM an der PAA-Bürste beobachtet (Abb. 3-9). Entweder sind also die Beiträge der beschriebenen Mechanismen und somit auch die Effekte der Volumenänderungen zu klein, um detektiert werden zu können, oder die Mechanismen der Komplexierung und der Ladungsregulation sind nicht hinreichend, um den Adsorptionsvorgang nahe des isoelektrischen Punkts zu beschreiben. Dann muss es noch einen weiteren Mechanismus geben, der eine entscheidende Rolle bei der Adsorption spielt und den beiden beschriebenen bezüglich des Volumens entgegengesetzt wirkt.

Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse des Adsorptionsverhaltens bei einem pH-Wert von 6.3 bestätigt und wurde auch schon mal für ein ähnliches System diskutiert [60]. Bei einem pH-Wert von 6.3 wurde in dieser Arbeit ein druckinduzierter Anstieg des Adsorptionsgrades beobachtet. Dieses Verhalten widerspricht dem bisher diskutierten Komplexierungs- und Ladungsregulationsmechanismus (Abb. 3-14, A und B). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen also unterschiedliche Mechanismen für die Proteinadsorption an einer PAA-Bürste ober und unterhalb des isoelektrischen Punktes des Proteins.

Im dritten Fall (pH 6.3) sind alle Asp- und Glu-Seitenketten (insgesamt 37) von holo-CaM negativ und alle Lys- und Arg-Seitenketten (insgesamt 14) positiv geladen, wenn von den in Lehrbüchern angegebenen pK_a -Werten für die Aminosäuren ausgegangen wird [61]. Es gibt also eine große Ladungsanisotropie auf der Proteinoberfläche, wobei so genannte „Ladungsflecken“ entstehen. In diesem Fall wird die Anziehungskraft zwischen den gleich geladenen Proteinen und PAA-Ketten auf der Grundlage multipolarer Wechselwirkungen, der Eigenenergie der Ladungsverteilung und der Freisetzung von Gegenionen aus der PAA-Bürste vorgeschlagen [62]. Dabei ist zu erwähnen, dass nicht alle Gegenionen der PAA-Bürste auf dieselbe Art und Weise wirken. Laut Russel und Co-Autoren [63] wird die Ladungsdichte einer PAA-Bürste durch die Anzahl der effektiven Ladungen pro PAA-Kette als L/l_B bestimmt, wobei L die Konturlänge der PAA-Kette und l_B die BJERRUM-Länge sind. Die BJERRUM-Länge ergibt sich dabei aus der Gegenionen-Kondensationstheorie [64] als

$$l_B = \frac{1}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r} \cdot \frac{e^2}{k_B T} \quad (3-2)$$

Dabei sind ϵ_0 und ϵ_r die Vakuum- bzw. relative Permittivität, e ist die Elementarladung, k_B ist die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur. Der Ladungsabstand innerhalb der PAA-Kette kann näherungsweise als 0.25 nm angenommen werden. Die BJERRUM-Länge in Wasser bei 298 K lässt sich als 0.72 nm bestimmen. Die Konsequenz ist, dass 2/3 aller Gegenionen „kondensieren“ und somit einen Teil der PAA-Ladung neutralisieren, während nur 1/3 zur tatsächlichen Ionenstärke in der PAA-Bürste beiträgt. Es ist offensichtlich, dass die kondensierten Gegenionen nicht vollständig hydratisiert sein können, da eine vollständige Hydratisierung eine Dissoziation von der PAA-Ladung erfordert. Eine Freisetzung kondensierter Gegenionen durch die Proteinadsorption hätte zur Folge, dass diese vollständig hydratisiert werden. Eine Erhöhung der Hydratation wiederum geht mit einer Volumenerniedrigung einher (Abb. 3-14, C). Somit kann der beobachtete, druckinduzierte Anstieg des holo-CaM-Adsorptionsgrades bei einem pH-Wert von 6.3 (Abb. 3-9) durch die Freisetzung und Hydratisierung kondensierter Gegenionen der PAA-Bürste erklärt werden.

Des Weiteren wird in der Literatur noch ein Mechanismus zur Proteinadsorption an einer PAA-Bürste vorgeschlagen, wenn das Protein stark negativ geladen ist [33]. Im Wesentlichen basiert das beschriebene Modell darauf, dass ein günstiger entropischer Beitrag zu den Protein-PAA-Wechselwirkungen bei der Adsorption hinzukommt, der durch die Freisetzung von Protein-Gegenionen hervorgerufen wird. Außerhalb der PAA-Bürste befinden sich Protein-Gegenionen innerhalb der Debye-Länge auf der Proteinoberfläche. Das negative Donnan-

Potential der PAA-Bürste ist ähnlich dem negativen Oberflächenpotential des Proteins. Dies führt dazu, dass innerhalb der PAA-Bürste den Protein-Gegenionen ein viel größerer Raum zur Verfügung steht. Folglich werden diese in die PAA-Bürste freigesetzt, was ebenfalls eine Triebkraft der Adsorption darstellen kann. Einige dieser Ionen waren wiederum stark an das Protein gebunden und wurden nur teilweise hydratisiert. Eine Freisetzung aus dem Potential des Proteins führt zur Erhöhung der Hydratation und einer Volumenreduzierung, was unter Druck ebenfalls begünstigt werden wird.

Der zuletzt betrachtete Fall ist die Adsorption des mit 4 TFP Molekülen komplexierten holo-CaM an der PAA-Bürste. Bei einem pH-Wert von 6.3 führt die Bindung der vier positiv geladenen Liganden dazu, dass die negative Nettoladung signifikant (um etwa 8 e) abgebaut wird und das Protein eine kompakte Kugelform annimmt. Somit ist die Anisotropie der Ladungen auf der Proteinoberfläche weniger stark ausgeprägt und die Anzahl der Proteingegenionen ist geringer. Dieser Effekt auf die Ladung durch die Bindung der vier TFP-Moleküle ist ähnlich dem Absenken des pH-Werts. Daher ist es wahrscheinlich, dass für diesen Fall die Mechanismen der Komplexierung und der Ladungsregulierung einen größeren Beitrag haben als die der Gegenionenfreesetzung. Somit müsste die Adsorption unter Volumenzunahme ablaufen und durch Druckerhöhung gehemmt werden. Genau dieses Verhalten konnte in dieser Studie beobachtet werden (Abb. 3-13).



3.5 Zusammenfassung

In der Literatur wird die Adsorption von Proteinen an einer PAA-Bürste mit verschiedenen theoretischen Modellen erläutert, insbesondere wenn das Protein eine negative Nettoladung aufweist. Druck stellt einen zusätzlichen thermodynamischen Parameter dar, der zur Auswahl des vorherrschenden Adsorptionsmechanismus nützlich ist, der unter einer Volumenänderung abläuft. In dieser Arbeit wurde eine Zunahme des Proteinadsorptionsgrades auf einer PAA-Bürste mit steigendem Druck beobachtet, wenn das Protein eine stark negative Nettoladung trägt. Der umgekehrte Fall, bei dem das Protein positiv geladen ist, zeigt eine druckinduzierte Desorption. Eine wichtige Schlussfolgerung dieser Studie ist daher, dass negativ und positiv geladene Proteine unterschiedlichen Adsorptionsmechanismen folgen, da sie ein unterschiedliches Druckverhalten zeigen. Darüber hinaus stehen die Druckexperimente dieser Studie im Einklang mit den in der Literatur theoretisch beschriebenen Mechanismen: unterhalb des isoelektrischen Punktes steht der Komplexierungsmechanismus im Vordergrund, am isoelektrischen Punkt kann die Adsorption mit einem Gleichgewicht aus dem Ladungsregulationsmechanismus und der Freisetzung von Gegenionen beschrieben werden, bei höheren pH-Werten scheint der Mechanismus zur Freisetzung von Gegenionen zu überwiegen. Es wird daher vorgeschlagen, dass stark gebundene, nur teilweise hydratisierte Gegenionen der PAA-Ketten oder des Proteins unter Druck dissoziieren und hydratisiert werden. Dies führt zu einer Volumenabnahme und einer Entropiezunahme des Systems. Allerdings können hier jedoch nur mögliche Protein-PAA-Bürsten-Wechselwirkungen diskutiert werden, die eine Volumenänderung beinhalten. Um das vollständige Gleichgewicht zwischen allen Faktoren abzuschätzen, sind weitere theoretische und experimentelle Studien erforderlich.

4 Projekt „Magnetische Nanopartikel“

Die Rückgewinnung von Enzymen aus einem Reaktionsmedium kann auf bequeme Weise erreicht werden, indem magnetische Nanopartikel (MNP) als Träger verwendet werden. In diesem Kapitel werden MNP mit einer Polyelektrolytbürste aus Poly(ethylenimin) (PEI) vorgestellt, die eine biokompatible Umgebung für die immobilisierten Enzymmoleküle erzeugt. Darüber hinaus wurden die PEI-Dendrimere methyliert (PMEI), um zusätzlich MNP zu erhalten, welche keine starke pH-Abhängigkeit der Ladung zeigen. Hefe-Alkohol-Dehydrogenase (ADH) wurde auf enzymatische Aktivität getestet, wenn sie frei in Lösung oder auf den PEI-Dendrimer-MNP adsorbiert ist. Darüber hinaus wurde der Einfluss des Drucks auf die enzymatische Aktivität untersucht, um Aktivierungsvolumina zu ermitteln, die einen charakteristischen Parameter für die Übergangszustandsgeometrie darstellen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Sekundärstruktur der ADH bis 9 kbar druckstabil ist. Die enzymatische Aktivität von ADH kann unter Verwendung der Michaelis-Menten-Kinetik in Lösung und auf den MNP analysiert werden. Bemerkenswerterweise werden bei der Adsorption keine signifikanten Änderungen der Michaelis-Konstante und des Aktivierungsvolumens beobachtet. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Wechselzahl von ADH im freien und adsorbierten Zustand gleich ist. Die maximale enzymatische Rate wird jedoch reduziert, wenn ADH adsorbiert, was durch eine niedrigere effektive Enzymkonzentration aufgrund sterischer Hinderung des Enzyms in der PEI-Bürste der MNP erklärt werden kann. Auf diese Weise ermöglichen die in dieser Studie durchgeführten Druckexperimente eine Unterscheidung zwischen sterischen und kinetischen Effekten auf die enzymatische Rate adsorbierter ADH.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen wurden teilweise in [65] publiziert. Die Abbildungen wurden mit der Erlaubnis von Elsevir übernommen oder abgewandelt.



4.1 Einführung

Die Verwendung von Enzymen hat für die industrielle Produktion von organischen Molekülen, für medizinische Anwendungen und die Biotechnologie zunehmend an Bedeutung gewonnen [66]. Dabei ist es sinnvoll, teure Enzyme zu recyceln, was ihre Entfernung aus dem Reaktionsmedium erfordert. Dies kann durch Immobilisierungstechniken auf festen Trägern [67, 68] wie Nanopartikeln erreicht werden. Auf einfache Weise können diese von einer Lösung getrennt werden: durch Sedimentation, Zentrifugation oder sogar Magnetkräfte, wenn sie einen Magnetkern besitzen [69, 70]. Ein mögliches Problem bei der Immobilisierung von Proteinen oder Enzymen auf Nanopartikeln ist die adsorptionsinduzierte partielle Entfaltung und Denaturierung [71, 72]. Daher muss die Adsorbensoberfläche mit Proteinen biokompatibel sein. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Polyelektrolytbürsten nützliche Oberflächenmodifikationen für die Immobilisierung von Proteinen und Enzymen darstellen, in denen Proteinstruktur und biologische Aktivität erhalten werden [9, 73]. Darüber hinaus kann der Proteinadsorptionsgrad bei einer Polyelektrolytbürste durch die Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke der Proteinlösung gesteuert werden [42, 45]. In diesem Kapitel werden magnetische Nanopartikel (MNP) vorgestellt, die eine Bürste aus Poly(ethylenimin) (PEI) auf der Oberfläche aufweisen, d.h. PEI-Ketten sind auf einen magnetischen Kern verankert [74]. Die Synthese dieser PEI-Bürsten-MNP wurde im Arbeitskreis Prof. Dr. O. Reiser (Regensburg) durchgeführt [75, 76].

Protein-Kinetik

Als Modellenzym wurde in diesem Kapitel die Alkoholdehydrogenase (ADH) aus der Hefe verwendet [77, 78]. Die berechnete Molmasse ist $147396 \text{ g mol}^{-1}$, der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei 5.6 und die katalysierte Reaktion lautet:



Dabei sind NAD^+ und NADH die oxidierte und reduzierte Form des Nicotinamidadenindinucleotids, welches als Cosubstrat fungiert. Im Laufe der Arbeit wurde die katalytische Aktivität von ADH frei in Lösung und im adsorbierten Zustand gemessen. Hierfür wurde das Enzym bei $\text{pH} = 7$ auf beiden MNP (PEI und PMEI) durch elektrostatische Anziehung zwischen der kationischen Bürste und dem anionischen Enzym adsorbiert.

Häufig werden temperaturabhängige Untersuchungen eines Enzyms durchgeführt, um die Aktivierungsenergie der katalytischen Reaktion zu bestimmen. Viele Enzyme leiden jedoch unter einer niedrigen Temperaturstabilität und denaturieren leicht bei erhöhten Temperaturen. Druck

wird als eher mildes Proteindenaturans beschrieben: Proteine entfalten im Allgemeinen nur bei sehr hohen Drücken von 4 bis 10 kbar [49, 48]. Druck stellt eine Sonde für Volumeneffekte dar. Diese können durch *void volumes* in der natürlichen Struktur eines Proteins entstehen, die beim Entfalten mit Wasser gefüllt werden. Darüber hinaus ist die Hydratisierung von Ladungen, die entstehen, wenn Salzbrücken aufgebrochen werden, mit einer Volumenverringering (Elektrostriktion) aufgrund der dichten Packung der hydratisierenden Wassermoleküle verbunden. Die Untersuchung enzymatischer Reaktionen findet im Allgemeinen bis zu einem Druckbereich von 2 – 3 kbar statt. Da in diesem Bereich keine Proteinentfaltung erwartet wird, hängen also die beobachteten Änderungen der Aktivitäten nicht mit einer druckinduzierten Entfaltung des Enzyms zusammen. Vielmehr ist für die druckabhängige, enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit die Bildung eines Übergangszustandes verantwortlich, welcher eine Volumenänderung hervorruft [48]. Obwohl typischerweise das Gegenteil beobachtet wird, gibt es sogar Enzyme, die durch Druck aktiviert werden [9, 79]. Die Änderung der katalytischen Aktivität eines Enzyms durch Druck kann als die Druckableitung der Aktivierungs-GIBBS-Energie ΔG^\ddagger beschrieben werden:

$$\left(\frac{\partial \Delta G^\ddagger}{\partial p} \right)_T = \Delta V^\ddagger, \quad (4-1)$$

mit ΔV^\ddagger als Aktivierungsvolumen. Dieses kann positiv oder negativ sein und somit zu einer Verringerung bzw. Erhöhung der enzymatischen Aktivität mit steigendem Druck führen [80]. Im Allgemeinen ist das Aktivierungsvolumen ein empfindlicher Parameter, um die Geometrie des Übergangszustandes zu beschreiben. Für viele Enzyme wird ein ΔV^\ddagger -Wert im Bereich von $\pm 20 \text{ mL mol}^{-1}$ gefunden, was lediglich der Größe eines einzelnen Wassermoleküls entspricht [80, 81].

In der Literatur wird die durch ADH vermittelte Produktbildungsrate mit Hilfe der Michaelis-Menten-Kinetik [82] beschrieben:

$$v = k_{\text{cat}} \cdot [E]_0 \frac{[S]}{[S] + K_M}. \quad (4-2)$$

Dabei ist $[E]_0$ die totale Enzymkonzentration, $[S]$ die Konzentration des freien Substrats, K_M die Michaelis-Konstante und k_{cat} die Wechselzahl. Findet die Reaktion bei einer sehr hohen Substratkonzentration ($[S] \gg K_M$) statt, so wird die maximale Geschwindigkeit v_{max} beobachtet, welche

durch $k_{\text{cat}} \cdot [\text{E}]_0$ beschrieben ist. Nach der Theorie des Übergangszustandes steht eine Geschwindigkeitskonstante, wie k_{cat} , im direkten Zusammenhang mit der entsprechenden Aktivierungs-GIBBS-Energie ΔG^\ddagger :

$$\Delta G^\ddagger = -RT \cdot \ln(k_{\text{cat}}/k_0), \quad (4-3)$$

wobei R die universelle Gaskonstante und T die Temperatur ist. Dann kann die Druckabhängigkeit von v_{max} und k_{cat} beschrieben werden als [83]:

$$\frac{d \ln(v_{\text{max}}/v_0)}{dp} = \frac{d \ln(k_{\text{cat}}/k_0)}{dp} = -\frac{\Delta V^\ddagger}{RT}, \quad (4-4)$$

mit v_0 und k_0 als Geschwindigkeit bzw. Geschwindigkeitskonstante bei einem Referenzdruck von 50 bar.



4.2 Präparation

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde dieses Kapitel im Rahmen des DFG-Forschergruppenprojektes FOR 1979 in Kooperation mit der Gruppe von Oliver Reiser bearbeitet. Die Synthese der untersuchten MNP wurde dabei vollständig von dieser Gruppe übernommen [75], und die fertigen Teilchen wurden zur Verfügung gestellt.

Das Enzym Alkohol-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (ADH) wurde von Merck bezogen (Kat.-Nr. A7011). Die beiden Substrate Nicotinamidadenindinukleotid (Kat.-Nr. 1.24542) und Ethanol (Kat. Nr. 1.00990) wurden ebenfalls von Merck erhalten. Die Pufferlösungen wurden mit 10 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS von VWR), 10 mM Semicarbazid (von Merck) und 1,5 mM L-Glutathion (reduzierte Form von VWR) in gereinigtem Wasser bei pH = 7.0 hergestellt. Bei den FTIR-Experimenten wurde D₂O als Lösungsmittel verwendet. Die PEI-MNP wurden wie zuvor beschrieben [75] synthetisiert und in der Pufferlösung bei einer Konzentration von 1 mg mL⁻¹ gelöst.

Die FTIR-Spektroskopie zur Bestimmung der Struktur und Stabilität von ADH in D₂O-Pufferlösung wurde mit dem FTIR-Spektrometer Nicolet 6700 von Thermo Fisher Scientific durchgeführt, das mit einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten MCT-Detektor betrieben und mit trockener Luft gespült wurde (siehe auch [84]). Jedes FTIR-Spektrum ist eine Mittelung aus 256 Interferometer-Scans mit einer spektralen Auflösung von 2 cm⁻¹. Druckabhängige Messungen wurden unter Verwendung der P-Series-Diamantstempelzelle von High Pressure Diamond Optics (Tucson, AZ, USA) durchgeführt. Bariumsulfat wurde als interner Drucksensor zu der Probe gegeben. Die Verschiebung der 983 cm⁻¹-Bande zu höheren Wellenzahlen gibt den angelegten Druck gemäß $p/\text{kbar} = 0.031 \cdot (\Delta\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1})^2 + 2.097 \cdot (\Delta\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1})$ wieder, wobei p der Druck und $\Delta\tilde{\nu}$ die Wellenzahlverschiebung sind [26]. Die Spektralanalyse wurde mit der Software Grams / AI 9 von Thermo Fisher Scientific durchgeführt.

Dynamische Lichtstreuung (DLS) zur Messung der Größe und des Zetapotentials der PEI-MNP wurde mit dem Zetasizer Nano ZS von Malvern Panalytical durchgeführt. Die Daten wurden mit der vom Hersteller bereitgestellten Software analysiert.

UV/Vis-Absorptionsspektroskopie-Messungen zur Untersuchung der ADH-Enzymaktivität wurden mit dem Lambda 25 Spektrometer von PerkinElmer durchgeführt. Die Messreihen bei Umgebungsdruck wurden in einer Quarz-Küvette durchgeführt. Für die Hochdruck UV/Vis-Messreihen wurde eine selbstgebaute Hochdruckzelle verwendet. Der Druck wurde dabei mit einer hydraulischen Handpumpe aufgebaut. Um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden vom Enzym 10 µL-Aliquots der Konzentration 1 mg mL⁻¹ hergestellt und

Präparation

eingefroren. An jedem Messtag wurde ein frisches Aliquot aufgetaut und alle Lösungen bis zur Messung bei 4 °C gelagert. Um bei den Kinetik-Messungen eine möglichst kurze Totzeit zu erreichen, wurde ein großes Volumen an Messlösung hergestellt:

9 mL Puffer-Lsg. + 300 μ L NAD⁺-Stammlsg. (190 mM) + 400 μ L EtOH

Anschließend wurden aus dieser Lösung 450 μ L entnommen und mit 7 μ L ADH-Lösung (68 nM) versetzt. Nach guter Durchmischung wurde die Probenzelle gefüllt und die Messung gestartet. Die endgültigen Konzentrationen der Reaktionslösung sind:

- MOPS 10.0 mM
- Semicarbazid 10.0 mM
- GSH 1.5 mM
- NAD⁺ 5.8 mM
- EtOH 692.3 mM
- ADH $1 \cdot 10^{-6}$ mM

Genauere Informationen zu den Messtechniken und dem Aufbau der Messzellen sind im entsprechenden Kapitel zu finden.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

Zunächst erfolgte die Charakterisierung des untersuchten Systems. Hierfür wurden die Eigenschaften der MNP mit PEI- und PMEI-Dendrimern ausführlich bestimmt. Im Anschluss wurde das Enzym charakterisiert und schließlich die Michaelis-Menten-Kinetik der ADH, frei in Lösung und an beiden Trägerteichen adsorbiert, untersucht.

Charakterisierung der Magnetischen Nanopartikel

Laut Literatur bestehen die MNP aus einem Kobalt-Kern, welcher im Durchschnitt einen Radius von 25 nm misst [75, 76]. Dieser ist von einer Kohlenstoffschicht ummantelt, dessen Dicke nicht genannt ist. Diese Teilchen wurden mit einem PEI-Dendrimer beschichtet, sodass ein Polymer-Massen-Anteil von ca. 60 % erhalten werden konnte [75]. Wird die Kohlenstoffschicht vernachlässigt, kann die Menge an PEI pro MNP-Teilchen als $9 \cdot 10^{-16}$ g approximiert werden. Dies entspricht dann einem berechneten Gesamtradius für ein Teilchen von 61 nm, ausgehend von 25 nm Kobalt-Kern und trockener, kollabierter PEI-Bürste. Die Teilchengröße in wässriger Lösung wird deutlich größer erwartet, da aufgrund der hohen Ladung und des damit verbundenen osmotischen Drucks die Bürste viel Lösungsmittel aufnimmt und anschwillt. Es wurden zwei Arten von MNP untersucht: welche mit PEI-Dendrimern und welche mit PMEI-Dendrimern. Der Unterschied liegt darin, dass PMEI eine methylierte Form des PEI darstellt. Da PEI keine feste Ladung besitzt und diese stark vom pH-Wert der Lösung abhängt, wurde eine methylierte Form hergestellt, um diesen Effekt zu minimieren und somit eine breitere Anwendbarkeit zu schaffen.

Zunächst wurde eine Stammlösung beider Teilchen von ca. 1 mg mL^{-1} hergestellt. Hierfür wurde eine kleine Krume der trockenen Teilchen eingewogen und mit Puffer verdünnt. Aufgrund der magnetischen Eigenschaft lassen sich die MNP nur sehr schlecht lösen.

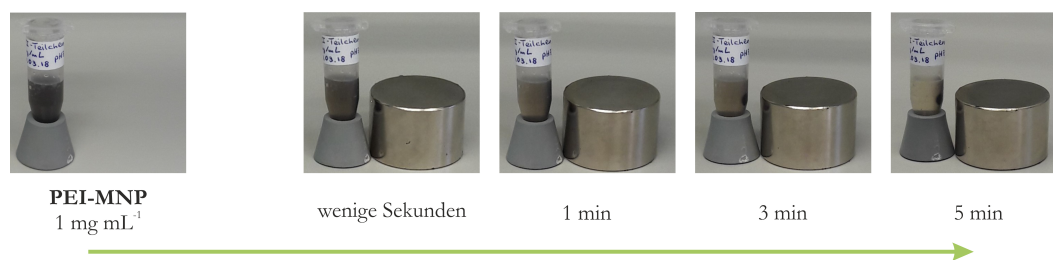


Abb. 4-1 Beispielhafte Darstellung der Abtrennung der MNP-Teilchen mit Hilfe eines Magneten. Eine wässrige Lösung der PEI-MNP (1 mg mL^{-1}) wurde einem starken Magneten ausgesetzt (Neodym 45N). Die zeitabhängige Separation wurde fotografisch dokumentiert [65].

Aus diesem Grund wurden die Stammlösungen über zwei Tage mit Ultraschall behandelt, wobei die Temperatur 40 °C nicht übersteigen sollte und die Eppendorf-Gefäße gelegentlich geschüttelt wurden. Es wurde eine dunkle Suspension erhalten, welche sich innerhalb von wenigen Stunden absetzte und eine gräuliche Lösung hinterließ. Anscheinend tendieren die Teilchen dazu zu aggregieren und setzten sich am Boden des Reaktionsgefäßes ab, wobei nach einem Tag nur eine geringe Menge in Lösung zurückzubleiben scheint. Um die magnetischen Eigenschaften der MNP und somit auch die Möglichkeit zur Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch zu überprüfen, wurde ein Neodym-Magnet (45N) angeschafft. Dessen Effekt dieses ist in Abb. 4-1 gezeigt. Die MNP der Konzentration 1 mg mL⁻¹ werden innerhalb von wenigen Minuten fast vollständig aus der Lösung an die Wand in Richtung des Magneten gezogen.

Um das Ausmaß der Abtrennbarkeit zu quantifizieren, wurden UV/Vis-Messungen durchgeführt. Hierfür wurde die Stammlösung von 1 mg mL⁻¹, was in etwa 1 nM entspricht, 1:10 verdünnt. Gemäß der Literatur [85] kann die Extinktion für Kobalt-Teilchen in wässriger Lösung, mit einem Radius von 5 nm, bei einer Wellenlänge von 500 nm, für eine 1 M Lösung der Dicke von 1 cm berechnet werden als $26 \cdot 10^6$. Es wurde die Konzentrationsbestimmung der verdünnten Teilchen-Lösung durchgeführt, sowie des Überstandes nach Zentrifugation für 2 min bei 28 000 g und nach Einwirkung des Magneten für 30 min. Für alle Messungen wurde eine Quarzküvette der Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4-1 dargestellt. Dabei wurden die Konzentrationen wie folgt berechnet:

$$c = \frac{(E_{500,Probe} - E_{500,Puffer})}{26 \cdot 10^6} \cdot 10^9 \text{ nM}. \quad (4-5)$$

Sowohl durch Zentrifugation als auch durch den Magneten können die MNP nahezu vollständig aus der Lösung entfernt werden, wobei ca. 8 % in Lösung bleiben. Die Konzentration der verdünnten Lösung kann als 4-6 nM bestimmt werden. Zu erwarten wäre eine Konzentration von 0.1 nM. Da die Bestimmung auf dem Extinktionskoeffizienten für Kobalt-Teilchen mit einem Radius von 5 nm beruht, muss noch eine Korrektur vorgenommen werden. Das Volumen aller Teilchen kann als $N \cdot (4/3) \pi R^3$ bestimmt werden. Ist der Radius 5-mal größer, dann ist die Anzahl der absorbierenden Teilchen 5³-mal kleiner. Die Konzentration für 25 nm große MNP sollte daher 125-mal kleiner sein, also 0.03-0.05 nM. Trotz dieser groben Näherung ist die gemessene Konzentration in guter Übereinstimmung mit der aus der Einwaage berechneten.

Die Größe beider Teilchen in wässriger Lösung wurde für zwei Konzentrationen und zwei pH-Werte mit Hilfe von DSL bestimmt. Da die Teilchen aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften

dazu tendieren zu aggregieren, wurden stark verdünnte Lösungen von $0.01 - 0.02 \text{ mg mL}^{-1}$ verwendet. Die Lösungen wurden sofort und nach der Zentrifugation bei 800 g für 15 min vermessen. Die Größenverteilungen sind in Abb. 4-2 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass trotz sorgfältiger Präparation die MNP dennoch zum Teil als Aggregate vorliegen können. Dies wird dadurch deutlich, dass die durchschnittliche Teilchengröße nach der Zentrifugation für beide MNP und beide pH-Werte sinkt.

Tabelle 4-1 Die gemessenen Extinktionswerte, sowie die berechneten Konzentrationen der Lösungen. Die Konzentrationen wurden ausgehend von Kobaltteilchen mit 5 nm Radius berechnet.

| Zentrif. | UV-Wert | Konzentration /nM | Magnet | UV-Wert | Konzentration /nM |
|----------|---------|-------------------|--------|---------|-------------------|
| Puffer | 0.041 | 0 | Puffer | 0.039 | 0 |
| 0 g | 0.140 | 3.8 | 0 min | 0.192 | 5.9 |
| 28 000 g | 0.049 | 0.3 | 30 min | 0.051 | 0.5 |

Die Größenverteilung ist somit nach der Zentrifugation repräsentativ für isolierte Teilchen und entspricht einem Radius von $100 \pm 20 \text{ nm}$ für beide Teilchenarten bei pH 7. Mit Erhöhung des pH-Wertes ändert sich die Größenverteilung der PEI-MNP kaum, jedoch die der PMEI-MNP. Diese zeigen schon bei pH 7 eine höhere Tendenz zur Aggregation als die nicht methylierten Teilchen, welche nun bei pH 9 noch größer ist. Die Größe der isolierten Teilchen hingegen ändert sich für beide MNP kaum.

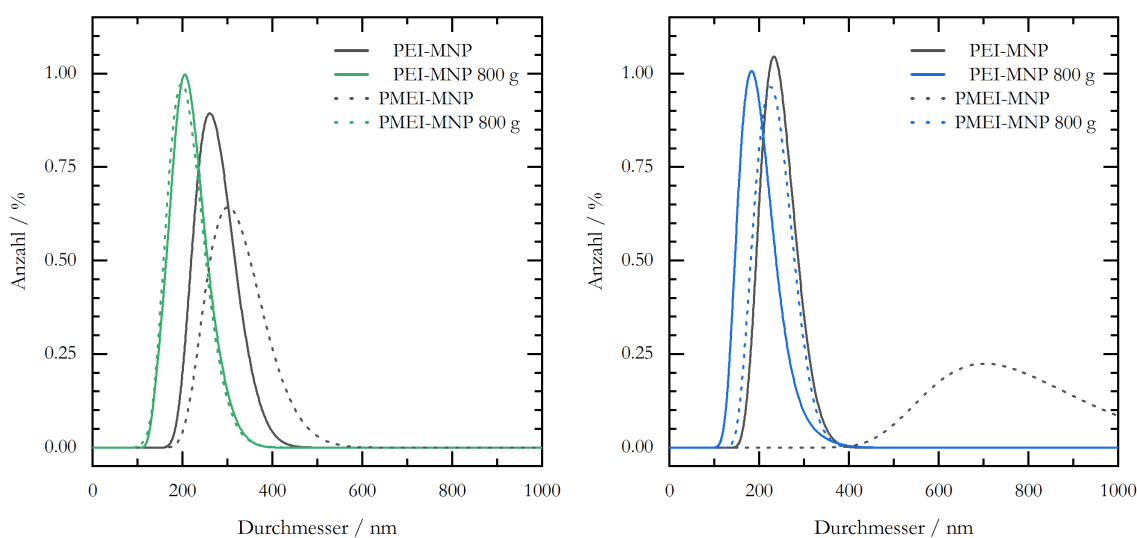


Abb. 4-2 Dargestellt sind die Größenverteilungen der MNP in Pufferlösung bei pH 7 (links) und pH 9 (rechts) mit einer Konzentration von 0.01 mg mL^{-1} . Die durchgezogenen Linien gehören zu den Teilchen, welche mit PEI-Dendrimern beschichtet wurden, die gepunkteten zu denen mit PMEI. Die schwarzen Linien sind frisch verdünnte Lösungen, die farbige gekennzeichneten die zentrifugierten. Es ist der Durchschnitt aus drei Ansätzen, zu je fünf Messungen dargestellt.

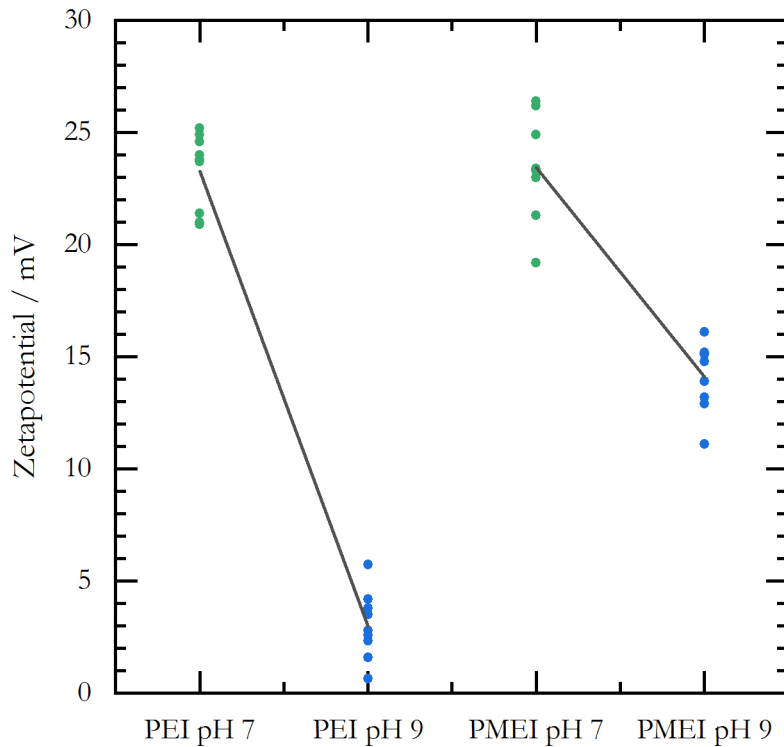


Abb. 4-3 Änderung der Zetapotentiale beider MNP in Abhängigkeit des pH-Wertes der wässrigen Lösung. Links sind die Werte der PEI-MNP gezeigt und rechts die der PMEI-MNP. Es ist die Messwerteverteilung von drei Ansätzen zu je 5 Messungen zu sehen. Es wurden nur diejenigen Ergebnisse verwendet, dessen Dispersionskoeffizient ≤ 0.7 gewesen ist.

Das Anschwellen der Bürste um +39 nm aufgrund der Hydratation entspricht einer Zunahme der PEI-Schichtdicke von ca. 100 %. Die Höhe der Dendrimere scheint dabei pH-abhängig zu sein: bei pH 7 sind die Verteilungen nahezu deckungsgleich, bei pH 9 ist eine deutliche Diskrepanz zwischen den Verteilungen zu sehen (Abb. 4-3). Zwar könnte der Effekt innerhalb des experimentellen Fehlers liegen, doch kann diese Beobachtung auch damit erklärt werden, dass bei erhöhtem pH-Wert die Ladungsdichte der PEI-Ketten geringer ist, was sich auf die Bürstendicke auswirkt. Um diese These zu untersuchen, wurden zusätzlich von den angesetzten Lösungen die Zetapotentiale gemessen. Die Messungen erfolgten mit 0.01 mg mL^{-1} Lösungen nach der Zentrifugation bei 800 g, um größere Aggregate zu entfernen, und wurden dreifach reproduziert. In Abb. 4-3 sind die Verteilungen der Messwerte zu sehen. Bei neutralem pH-Wert ist das Zetapotential für beide Teilchen gleich groß und hat einen Wert von $23 \pm 3 \text{ mV}$. Mit steigendem pH-Wert sinkt der Wert für beide MNP, allerdings in unterschiedlichem Maß. Die PEI-MNP sind mit $3 \pm 3 \text{ mV}$ bei pH 9 nahezu ungeladen, wobei die PMEI-MNP mit $14 \pm 2 \text{ mV}$ noch 60 % ihrer ursprünglichen Ladung besitzen. Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass bei

den PEI-MNP ausschließlich Amine zur Ladung beitragen, was zur Folge hat, dass sämtliche Ladungen pH-abhängig sind und somit bei steigendem pH deprotonieren. Bei den PMEI-MNP ist ein Teil der Amine methyliert. Dies führt dazu, dass quartäre Ammonium-Ionen entstehen, die eine permanente positive Ladung tragen, die nicht pH-abhängig ist. Die Ergebnisse zeigen den Erfolg der Methylierung, da die pH-Abhängigkeit der Ladungen unterschiedlich ist. Beide verwendeten Teilchen tragen eine positive Ladung, die pH-abhängig ist, wobei die methylierten MNP selbst bei hohen pH-Werten noch positiv geladen bleiben.

Charakterisierung von ADH

Die Sekundärstruktur von ADH in D₂O-Pufferlösung (pD = 7.4) wurde aus der Amid-I'-Bande im FTIR-Spektrum bestimmt (der Apostroph zeigt D₂O an). Als Lösungsmittel wurde D₂O verwendet, da die Biege-Schwingungsbande von H₂O mit der Amid-I-Bande von Proteinen überlappt. Die Amid-I-Bande ist eine Überlagerung von Subbanden bei verschiedenen Wellenzahlen, die den verschiedenen Sekundärstrukturelementen zugeordnet werden können [86]. Somit hängt eine Änderung der Amid-I-Bandenform mit einer Änderung der Anteile der Sekundärstrukturelemente zusammen. In Abb. 4-4 sind die Amid-I'-Banden von ADH in Abhängigkeit von Temperatur und Druck gezeigt.

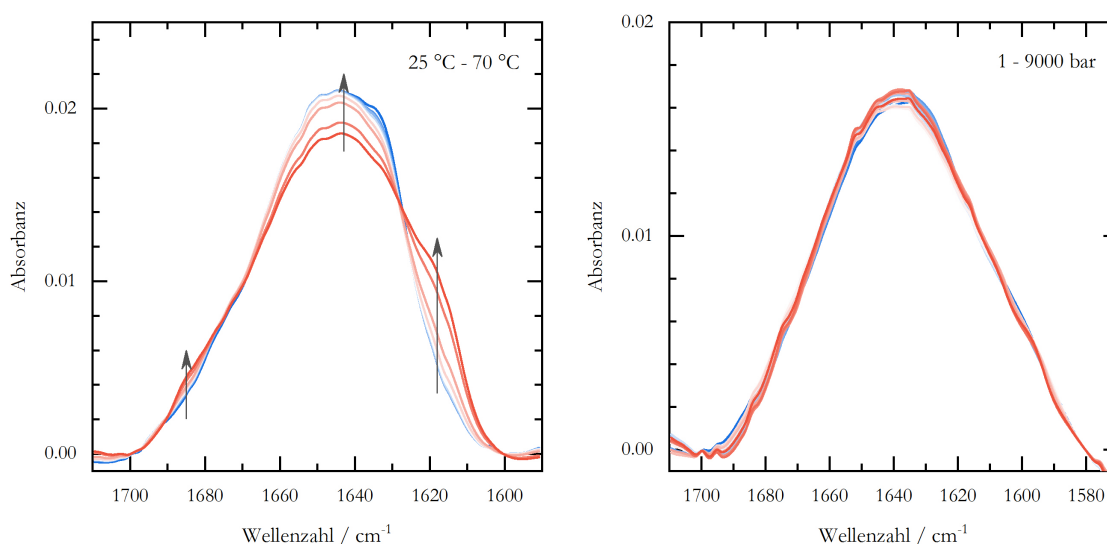


Abb. 4-4 FTIR-Spektren von ADH in D₂O-Puffer als Funktion der Temperatur (links) und des Drucks (rechts). Die Daten wurden untergrundkorrigiert und die Fläche normiert. Die Pfeile deuten die Änderung der Amid-I'-Bande mit steigender Temperatur an. Keine signifikante Änderung kann mit steigendem Druck beobachtet werden [65].

Eine temperaturabhängige Änderung der Bandenform ist deutlich erkennbar, was mit einer Änderung der Sekundärstruktur verbunden ist. Das Einsetzen der temperaturabhängigen Denaturierung von ADH wurde bereits beobachtet [87]. Die Amid-I'-Bande von ADH in D₂O wurde in Subbanden zerlegt, um die Sekundärstruktur aufzulösen. Im ersten Schritt wurde deren Position durch FSD und 2. Ableitung des Spektrums berechnet. Im zweiten Schritt wurden die Subbanden so angepasst, dass diese die Amid-I'-Bande möglichst gut wiedergeben. Die so erhaltenen Flächenanteile der Subbanden sind in Abb. 4-5 dargestellt und geben in guter Näherung die korrespondierenden Sekundärstrukturanteile von ADH wieder.

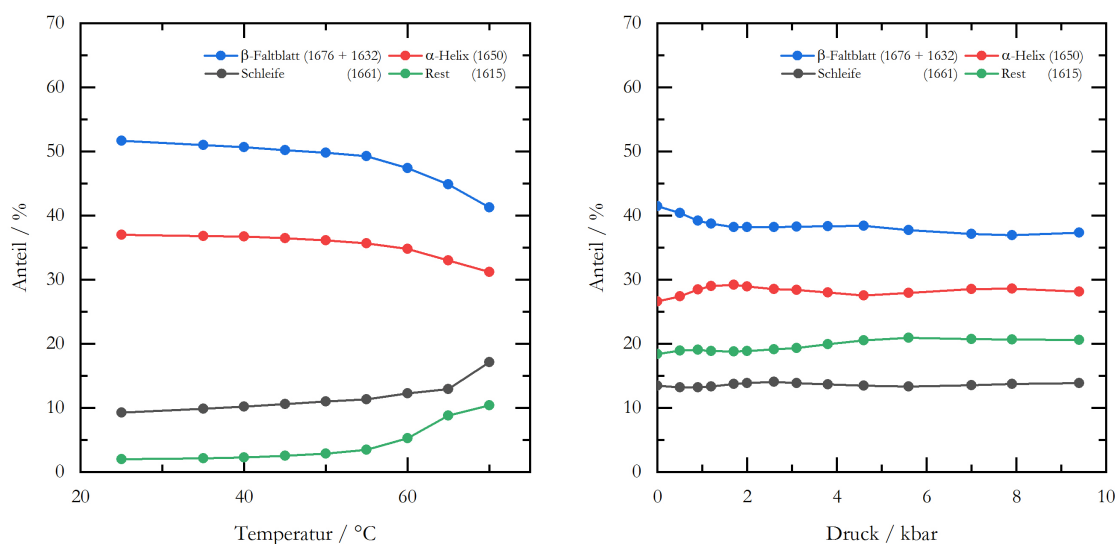


Abb. 4-5 Die Änderung der Sekundärstrukturelemente von ADH als Funktion der Temperatur (links) und des Drucks (rechts). Die in der Legende angegebenen Zahlenwerte entsprechen den Wellenzahlen der Subbanden. In Abhängigkeit der Temperatur kann eine Denaturierung bei 65 °C beobachtet werden, wobei ab 40 °C die Aggregation einsetzt. Druckabhängig sind keine signifikanten Änderungen zu verzeichnen, da die Amid-I'-Bande (Abb. 4-4, rechts) sich unter Druck nicht verändert.

Die Verläufe zeigen eine temperaturabhängige Denaturierung des Proteins und eine Druckstabilität bis ca. 10 kbar. Eine genaue Betrachtung der Sekundärstrukturanteile zeigt einen kleinen Unterschied in den Strukturen beider Messungen. Zum Anpassen beider Spektren wurde eine Bande bei 1615 cm⁻¹ benötigt. Diese stammt wahrscheinlich vom restlichen Untergrund und ist aufgrund von zusätzlichem BaSO₄ in der Lösung bei den druckabhängigen Messungen höher. Jedoch kann diese Subbande keiner bestimmten Struktur zugeordnet werden, weswegen die Berechnung der Anteile nochmals vorgenommen wurde indem die Flächen der strukturgebenden Komponenten (α-Helix, β-Faltblatt und Schleife) auf 100 % normiert wurden. Entsprechende Verläufe sind in Abb. 4-6 dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die Werte bei 25 °C und 1 bar nun im Rahmen des Fehlers gleich sind. Ab 45 °C fängt bereits die Aggregation des

Proteins an, weswegen die nachfolgenden Messungen bei 25 °C durchgeführt worden sind. Im Gegensatz zur Temperatur (Abb. 4-6, links) kann in dieser Studie keine Änderung der Sekundärstruktur mit steigendem Druck beobachtet werden (Abb. 4-6, rechts). Es können also druckabhängige Messungen bei 25 °C durchgeführt werden, ohne, dass mit Sekundärstrukturänderungen gerechnet werden muss.

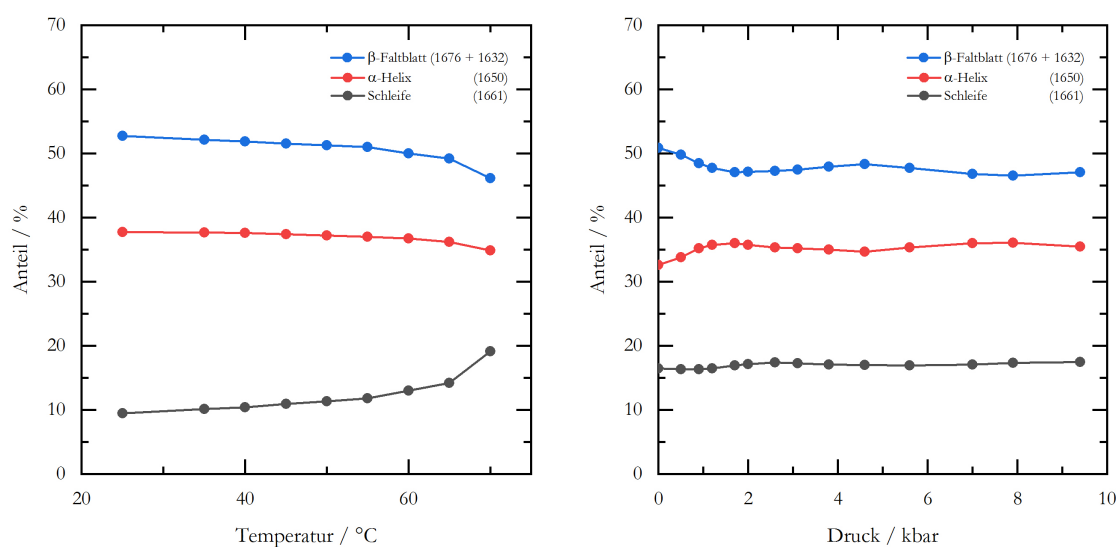


Abb. 4-6 Die Änderung der korrigierten Sekundärstrukturelemente von ADH als Funktion der Temperatur (links) und des Drucks (rechts). Die in der Legende angegebenen Zahlenwerte entsprechen den Wellenzahlen der verwendeten Subbanden. Der Fehler der dargestellten Messpunkte liegt links bei $\pm 2\%$ und rechts bei $\pm 3\%$. In Abhängigkeit der Temperatur kann eine Denaturierung bei 65 °C beobachtet werden, wobei ab 40 °C die Aggregation einsetzt. Druckabhängig sind keine signifikanten Änderungen zu verzeichnen, da die Amid-I'-Bande (Abb. 4-4, rechts) sich unter Druck nicht verändert.

Michaelis-Menten Kinetik der freien und adsorbierten ADH

Die enzymatische Aktivität von ADH wurde bereits detailliert untersucht und es wurde festgestellt, dass sie der Michaelis-Menten-Kinetik folgt [82, 88]. In diesem Projekt wurden die Aktivitäten von ADH verglichen, wenn das Protein frei in Lösung und auf MNP adsorbiert ist. Dabei wurden zwei unterschiedliche MNP verwendet: welche mit PEI-Dendrimern auf der Oberfläche und mit PMEI-Dendrimern. Obwohl die maximale Aktivität des Enzyms bei pH = 9 [82] angegeben ist, wurde in dieser Studie pH = 7 gewählt, da dieser pH-Wert zu einer negativen Nettoladung des Enzyms und einer positiven Ladung der MNP führt. Somit sollte die maximale Adsorption erreicht werden. Darüber hinaus wurden stark verdünnte Proben mit nur 0.01 nM MNP verwendet, um Partikelaggregation oder -ausfällung zu minimieren. Die Geschwindigkeit der Produktbildung, $v = dc / dt$, wurde bestimmt, indem die UV-Absorption bei 340 nm als Funktion der Zeit aufgezeichnet wurde. Dabei ist zu erwähnen, dass das Produkt NADH eine

starke Absorptionsbande in diesem Bereich aufweist. Unter Verwendung des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes mit einem Extinktionskoeffizienten von $6300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für NADH [38] wurde anschließend die Extinktion in eine molare Konzentration von NADH umgewandelt. Da das Cosubstrat äquivalent umgesetzt wird, ist die Bildung von NADH antiproportional zum Ethanolabbau.

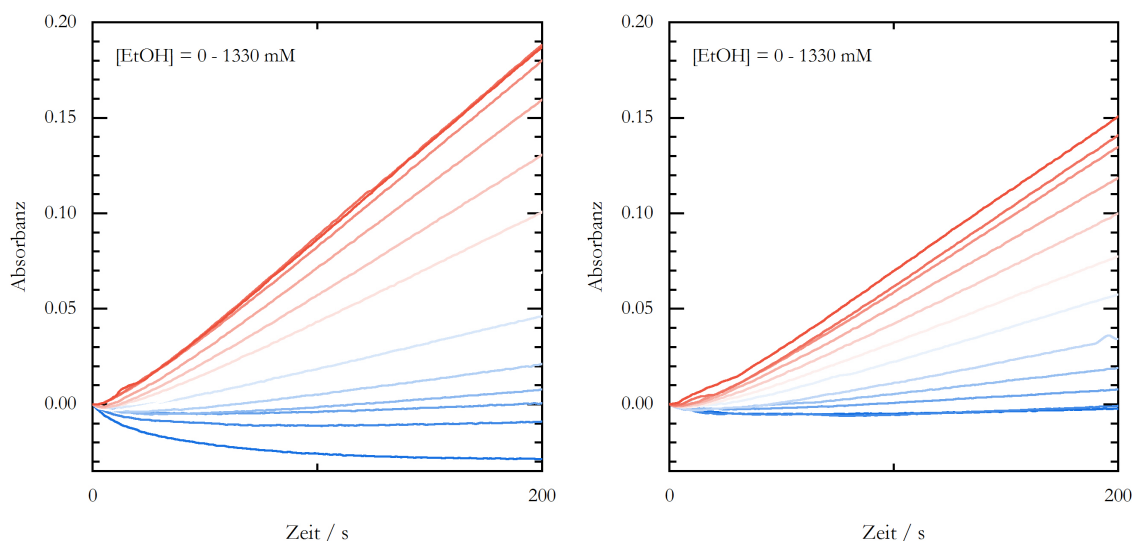


Abb. 4-7 Typische Aktivitäten von freier (links) und adsorbierter (rechts) ADH als Funktion der Ethanolkonzentration (von blau nach rot: 0 – 1330 mM) bei 1 bar. Die Daten sind dreifach reproduziert. Bedingungen: 1 nM ADH, 6 mM NAD^+ , pH = 7, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 0.01 nM PEI-MNP (optional).

Im ersten Schritt wurde geprüft, ob das untersuchte System sich tatsächlich nach Michaelis-Menten verhält. Es wurden also Aktivitäten in Abhängigkeit der Substratkonzentration gemessen. In Abb. 4-7 ist die NADH-Bildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration gezeigt. Für beide Fälle (in Abwesenheit und Anwesenheit der PEI-MNP) nimmt die Geschwindigkeit mit zunehmender Ethanol-Konzentration zu. Bei Anwesenheit der Partikel werden jedoch deutlich kleinere Steigungen beobachtet. Die Verläufe sind zwar linear, zeigen jedoch in den ersten 100 Sekunden häufig ein Artefakt. Aus diesem Grund wurde für jede Kurve die Steigung im Bereich 100 – 200 s bestimmt. Die Raten sind in Abb. 4-8 (links) dargestellt und zeigen in beiden Fällen einen typischen Verlauf nach Michaelis-Menten. Die Anpassung mit der Michaelis-Menten-Gleichung (4-2) liefert für beide Systeme Werte für die Michaelis-Konstante K_M und die maximale Umsatzrate v_{\max} . In Lösung wird $K_M = 35 \pm 2 \text{ mM}$ und $v_{\max} = 2.5 \cdot 10^{-7} \text{ M s}^{-1}$ für ADH bei pH = 7 mit 6 mM NAD^+ gefunden. Die beobachtete Michaelis-Konstante stimmt in guter Näherung mit dem in der Literatur [88] berichteten Wert von $K_M = 21 \text{ mM}$

überein. Wenn das Enzym an den PEI-MNP adsorbiert ist, wird ein $K_M = 31 \pm 2$ mM und $v_{\max} = 1.5 \cdot 10^{-7}$ M s⁻¹ gefunden.

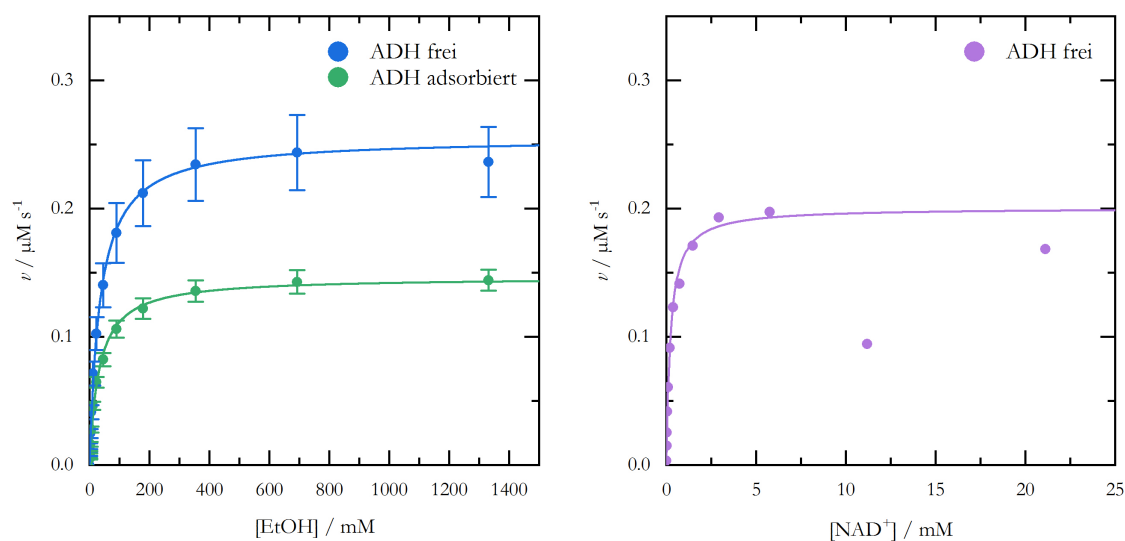


Abb. 4-8 Produktbildungsrate durch ADH im freien und adsorbierten Zustand in Abhängigkeit der Ethanol-Konzentration (links) und NAD^+ -Konzentration (rechts). Die Datenpunkte links stellen den Mittelwert aus drei Messreihen dar. Zugehörige Standardfehler, deren Gewichtung direkt erfolgte, sind angegeben. Die Linien geben die Anpassung mit der Michealis-Menten-Gleichung (4-2) wieder [65].

Während K_M von ADH unverändert bleibt, wird die maximale Rate nach Adsorption von ADH an den PEI-MNP signifikant verringert. Da $v_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot [\text{E}]_0$ ist, könnte eine Abnahme von v_{\max} durch eine Abnahme von k_{cat} erklärt werden, was eine partielle Denaturierung des Enzyms bei Wechselwirkung mit dem PEI-MNP widerspiegeln würde. Obwohl die Gesamtkonzentration des Enzyms $[\text{E}]_0$ immer gleich bleibt, könnten andererseits einige der Enzyme bei der Adsorption auch innerhalb der PEI-Dendrimere vergraben und blockiert werden, was als verringerte effektive Enzymkonzentration erscheinen würde, da ein Teil für das Substrat nicht mehr zugänglich wäre. Wie im nächsten Abschnitt gezeigt ist, kann mit Hilfe von Druck zwischen diesen beiden Effekten unterschieden werden.

Wie in Abb. 4-8, rechts gezeigt, gilt der Michaelis-Menten-Mechanismus auch für ADH, wenn die Ethanolkonzentration fixiert ist und die NAD^+ -Konzentration variiert wird. In diesem Fall wird so ein $K_M = 0.2$ mM und $v_{\max} = 2.0 \cdot 10^{-7}$ M s⁻¹ gefunden, was wiederum gut mit dem in der Literatur [88] angegebenen Wert von $K_M = 0.16$ mM übereinstimmt. Um die maximale Produktbildungsrate durch ADH zu erhalten, wurde daher im Folgenden eine Ethanolkonzentration von ca. 700 mM ($23 \times K_M$) und eine NAD^+ -Konzentration von 6 mM ($30 \times K_M$) verwendet. Dann ist $v = v_{\max}$ gemäß Gleichung 4-2, und es können lineare Aktivitäten über lange Messzeiten detektiert werden. Es ist zu erwähnen, dass die maximale ADH-Rate, v_{\max} ,

einen ziemlich großen Fehler aufweist. Dies ist zum Teil der niedrigen Proteinkonzentration geschuldet und zum anderen auf den nicht idealen pH-Wert zurückzuführen. Noch wichtiger ist jedoch, dass die Aktivität von ADH in Lösung und sogar bei gefrorener Lagerung mit der Zeit abnimmt [89, 90]. Obwohl die ADH-Lösungen in dieser Arbeit nach dem gleichen Protokoll mit großer Sorgfalt hergestellt wurden, kann eine teilweise Denaturierung des Enzyms nicht vollständig vermieden werden.

Bestimmung des Adsorptionsgrades von ADH

Des Weiteren wurden Aktivitätsmessungen bei v_{\max} durchgeführt (Abb. 4-9). Auch wenn die absoluten Werte im Schnitt etwas geringer sind als zuvor, kann auch in dieser Messreihe eine Verringerung der Aktivität durch die Adsorption beobachtet werden. Zunächst wurden Messungen des freien Enzyms, des adsorbierten Enzyms und des zentrifugierten Überstandes durchgeführt (Abb. 4-9, links). Auch in dieser Messreihe ist die große Schwankung der v_{\max} -Werte auffällig. Dies lässt sich allerdings nicht vermeiden und zieht einen enormen Aufwand nach sich, welcher eine Vielzahl an Messungen erfordert, um statistisch relevante Daten zu erhalten.

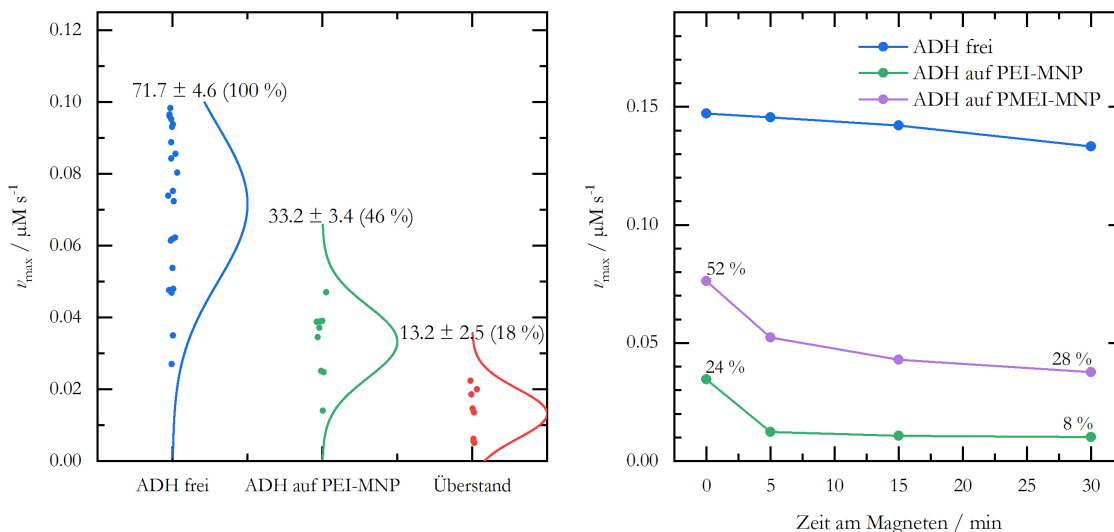


Abb. 4-9 Maximale Produktbildungsraten durch ADH. Nach Zugabe von ADH zu den MNP wird eine reduzierte Produktbildungsgeschwindigkeit, verursacht durch Adsorption, beobachtet. Die Teilchen wurden mittels Zentrifugation bei 28 000 g für 15 min (links) und mit Hilfe eines Magneten (N 45) zeitabhängig (rechts) aus der Lösung entfernt. Restaktivität des Überstandes von 18 ± 10 % kann für beide Methoden beobachtet werden. In der linken Abbildung sind zusätzlich die Normalverteilungen der Datensätze angegeben.

Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym im auf den PEI-MNP adsorbierten Zustand 25-50 % Aktivität zeigt (Abb. 4-9, links). Wird die Lösung bei 28 000 g für 15 min zentrifugiert und der

Überstand vermessen, so sind noch 5-20 % Aktivität detektierbar (Abb. 4-9, links). Da, wie zuvor gezeigt, ca. 8 % der MNP bei gleicher Zentrifugation im Überstand zurückbleiben, kann also von einer nahezu vollständigen Adsorption von > 90 % des Enzyms auf den PEI-MNP ausgegangen werden. Zusätzlich wurde eine Messreihe mit in Lösung freier ADH, auf PEI-MNP adsorbierter ADH und auf PMEI-MNP adsorbierter ADH bei v_{\max} durchgeführt, wobei die Entfernung der Teilchen mittels des Magneten (45N) spektroskopisch verfolgt worden ist (Abb. 4-9, rechts). Hier hat sich gezeigt, dass die Aktivität auf den methylierten Teilchen im Schnitt höher als auf den normalen ist, allerdings bleibt auch mehr Restaktivität nach der Abtrennung mittels Magneten übrig. Dies kann nun zwei Ursachen haben: Es adsorbiert weniger ADH auf den methylierten Teilchen, sodass eine höhere Untergrundaktivität vorhanden ist, oder es kommt bei der Adsorption zu konformellen Änderungen, und das k_{cat} verändert sich, sodass die Aktivität der adsorbierten ADH tatsächlich höher ist. Auch zwischen diesen Effekten kann mit Hilfe von Druck unterschieden werden, wie im folgenden Abschnitt gezeigt.

Druckabhängigkeit der freien und adsorbierten ADH

Mit Hilfe von Druck können kleinste Volumenänderungen detektiert werden, die während einer Reaktion von einem Enzym durchlaufen werden. Steigt das Volumen zum Beispiel um nur 18 mL mol⁻¹, was einem Wassermolekül entspricht, so führt die Applikation von 1000 bar zu einem Anstieg der Gibbs Energie um 1.8 kJ mol⁻¹. Ein Übergangszustand, welcher unter dieser Volumenzunahme gebildet wird, wird destabilisiert, und die Wechselzahl für die Reaktion sinkt auf 50 % bei 1000 bar. Somit können schon geringe Aktivierungsvolumina zu großen Druckeffekten auf die enzymatische Aktivität führen. Des Weiteren kann die Wechselwirkung eines Enzyms mit einer immobilisierenden Grenzfläche zu einer Änderung des Aktivierungsvolumens führen. Grund dafür ist dessen hohe Abhängigkeit von den räumlichen Gegebenheiten des reagierenden Substratmoleküls in der aktiven Tasche des Enzyms. In dieser Arbeit wurde die druckabhängige Aktivität von ADH untersucht, um die Aktivierungsvolumina im freien und adsorbierten Zustand zu bestimmen und zu vergleichen.

Zunächst wurden die gewählten Bedingungen und die Zuverlässigkeit des Systems überprüft. Hierfür wurden Langzeitmessungen durchgeführt um festzustellen, über welche Zeit die Reaktionsgeschwindigkeit für die gewählten Systeme konstant bleibt (s. Anhang, Abb. 9-3). Die Ergebnisse zeigen, dass die Reaktion erst nach ca. 2 Stunden vollständig abgelaufen ist, bzw. sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Der zeitliche Rahmen von 250 Sekunden, der im Folgenden verwendet wird, zeigt daher eine konstante Reaktionsgeschwindigkeit. Die Druckmessungen

wurden wie folgt durchgeführt. Die Probenpräparation fand wie zuvor beschrieben statt, anschließend wurde die Zelle befüllt, der Druck auf 50 bar gestellt und die Messung gestartet. Der Startdruck von 50 bar ist notwendig um sicher zu stellen, dass sich in dem System keine Luftblasen befinden. Die Drücke wurden während der Messung variiert, sodass dieselbe Probe vermessen werden konnte. Hierfür wurde die Aktivität 40 Sekunden lang detektiert und anschließend der Druck erhöht. Für den Schritt der Druckerhöhung wurden 10 Sekunden eingeplant um zum einen sicher zu stellen, dass sich der Druck reproduzierbar eingestellt hat (Abb. 4-10).

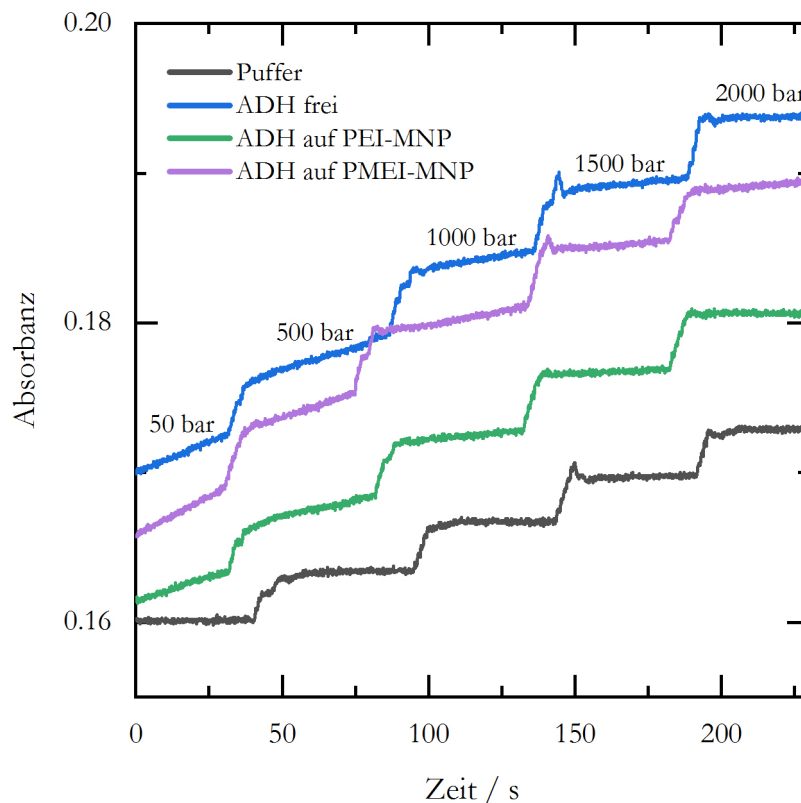


Abb. 4-10 Der Verlauf einer typischen druckabhängigen Messung zur Bestimmung der ADH Aktivität. Der Ablauf war wie folgt: 40 s Messung – 10 s Druckaufbau – 40 s Messung – u.s.w. . Die Steigungen der entsprechenden linearen Bereiche liefert die Produktbildungsgeschwindigkeit.

Die Messung ohne ADH in der Lösung zeigt deutlich, dass es zwar keine Untergrundaktivität gibt, allerdings ist die Extinktion der Lösung linear druckabhängig. Der Effekt wurde ausgewertet (Abb. 9-4) und als Korrekturfaktor zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeiten herangezogen. In Abb. 4-10 sind auch die UV-Absorbanzen der NADH-Bildung für die drei untersuchten ADH-Systeme dargestellt, welche druckabhängig aufgezeichnet worden sind. Offensichtlich sind die Verläufe zwar stets linear, jedoch nimmt die Steigung mit steigendem Druck ab, was auf eine sinkende NADH-Bildungsgeschwindigkeit hinweist. Die Steigungen wurden

wie zuvor beschrieben in absolute Produktbildungsraten umgerechnet, wobei zusätzlich die Druckabhängigkeit der Untergrund-Absorbanz berücksichtigt wurde. Erhalten wurde eine lineare Druck-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten, wenn diese logarithmisch aufgetragen werden (Abb. 4-11). Die Steigungen dieser liefern das Aktivierungsvolumen des Ethanolumsatzes durch ADH für die untersuchten Systeme. In Tabelle 4-2 sind die berechneten Aktivierungsvolumina zusammengefasst. Die ΔV^\ddagger -Werte für freies und auf den PEI-MNP adsorbiertes Enzym betragen ca. $+27 \text{ mL mol}^{-1}$ und sind im Rahmen des experimentellen Fehlers gleich. Die positiven Aktivierungsvolumina zeigen eine gewisse Ausdehnung beim Bilden des Übergangszustands an, welcher somit mit steigendem Druck immer weniger favorisiert wird. Die hier beobachteten Druckeffekte sind in guter Übereinstimmung mit der Literatur, wo ebenfalls eine druckinduzierte Desaktivierung von freier ADH bis 2000 bar mit ähnlichem Aktivierungsvolumen ($20 \pm 5 \text{ mL mol}^{-1}$) beobachtet wurde [91]. Das hier erhaltene Aktivierungsvolumen für die Reaktion auf den methylierten MNP liegt zwar in einer ähnlichen Größenordnung, unterscheidet sich allerdings signifikant von den anderen beiden Systemen (Tabelle 4-2).

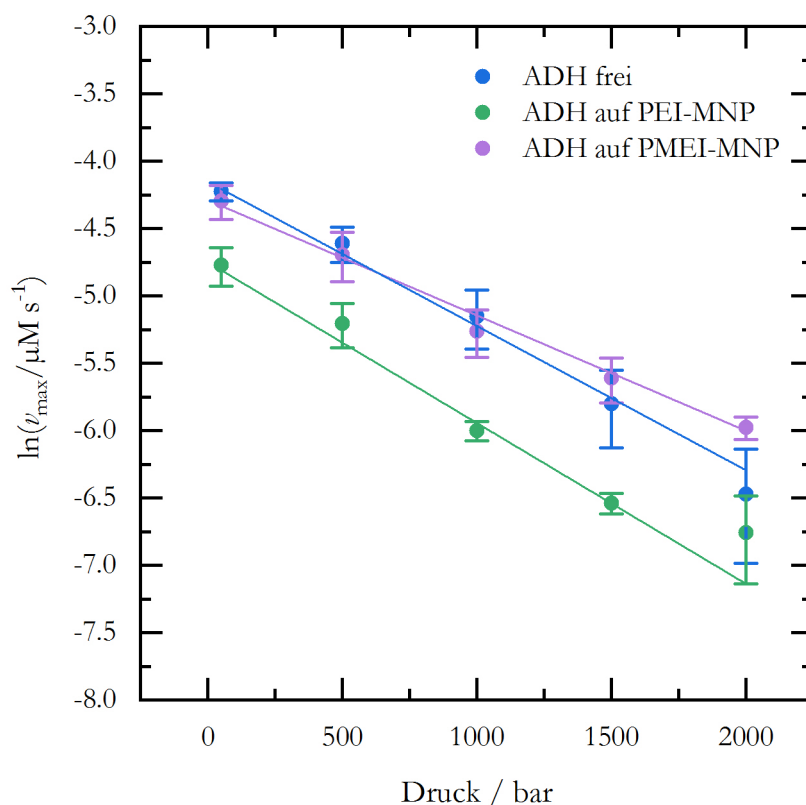


Abb. 4-11 Logarithmische Darstellung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten. Bei den dargestellten Fehlerbalken handelt es sich um Standardfehler, die Gewichtung bei der Anpassung erfolgte direkt. Es sind die Mittelwerte aus drei Messansätzen dargestellt.

Tabelle 4-2 Übersicht der erhaltenen Aktivierungsvolumina für den Ethanolumsatz durch ADH der untersuchten Systeme. Die Werte wurden mittels Gleichung 4-4 erhalten. Als Fehler ist der Standardfehler angegeben.

| System | $\Delta V^\ddagger / \text{mL mol}^{-1}$ |
|-------------------------|--|
| ADH frei | + 27 \pm 2 |
| ADH auf PEI-MNP | + 29 \pm 3 |
| ADH auf PMEI-MNP | + 21 \pm 1 |

Schlussendlich ermöglichen die durchgeführten Druckexperimente nun, zwischen den zuvor postulierten Mechanismen der ADH-Adsorption auf den MNP zu unterscheiden. Für die Adsorption auf den PEI-MNP wurden Michaelis-Menten-Experimente durchgeführt: Es hat sich gezeigt, dass sich an der Michaelis-Konstante nichts ändert, jedoch sinkt ν_{\max} (Abb. 4-8). Dabei findet definitiv eine Adsorption statt und das adsorbierte Enzym ist weiterhin aktiv, da durch das Entfernen der MNP ein Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet wird (Abb. 4-9). Da die maximale Reaktionsgeschwindigkeit nur von k_{cat} und $[E]_0$ abhängt, muss also einer dieser Faktoren für die Reduktion verantwortlich sein. Da sich das Aktivierungsvolumen auf die Wechselzahl bezieht (4-4) und die Aktivierungsvolumina und die Michaelis-Konstanten im freien und adsorbierten Zustand gleich sind (Tabelle 4-2), ist davon auszugehen, dass sich auch k_{cat} durch die Adsorption nicht ändert und somit die Reaktionsverläufe gleich sind. Also kann die beobachtete Reduktion der Enzymrate nur durch $[E]_0$ erklärt werden. Obwohl für alle Messungen dieselbe Stamm-Lösung verwendet wurde, der Präparationszyklus derselbe war und die Messreihen vielfach reproduziert worden sind, wird ein reduziertes $[E]_0$ beobachtet. Es wird also ein erheblicher Teil des Enzyms in den PEI-Dendrimern der MNP „vergraben“ und ist für das Substrat nicht mehr zugänglich. Für auf den PMEI-MNP adsorbierte ADH wird ebenfalls ein reduziertes ν_{\max} im Vergleich zum freien Enzym beobachtet, allerdings ist dieses höher als das des auf den PEI-MNP adsorbierten Enzyms (Abb. 4-9). Auch hier findet definitiv eine Adsorption statt, und das Enzym ist ebenfalls aktiv, allerdings ist die Restaktivität nach Entfernen der PMEI-MNP höher als nach Entfernen der PEI-MNP. Da ca. 10 % der MNP nicht aus der Lösung entfernt werden können, ist eine gewisse Restaktivität für beide Systeme zu erwarten. Die Beobachtungen können nun mit zwei Mechanismen erklärt werden: eine Änderung von $[E]_0$ oder eine Änderung von k_{cat} . Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit hängt weiterhin ausschließlich von k_{cat} und $[E]_0$ ab. Die naheliegende Erklärung wäre, dass weniger Enzym auf den PMEI-MNP adsorbiert als auf den PEI-MNP. Deswegen ist die Abnahme der Aktivität geringer, da auch weniger Enzym unzugänglich vergraben wird. Da mehr Enzym in Lösung verbleibt, ist auch die Restaktivität höher. Die Ergebnisse der druckabhängigen Messungen zeigen allerdings ein anderes Aktivierungsvolumen auf den PMEI-MNP (Tabelle 4-

2) als in Lösung oder auf den PEI-MNP. Somit sind die räumlichen Gegebenheiten, d.h. Konformation, des Enzyms durch die Adsorption auf PMEI-MNP definitiv verändert. Ein kleineres ΔV^\ddagger bedeutet, dass der Übergangszustand $ES \rightarrow E + P$ dichter gepackt ist, was ein größeres k_{cat} hervorrufen könnte. Eine Kombination aus beiden Effekten ist dabei sehr wahrscheinlich.



4.5 Zusammenfassung

Die Rückgewinnung von Enzymen aus einem Reaktionsmedium ist in vielen Bereichen der angewandten Naturwissenschaften von großer Bedeutung. In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass sich MNP für diesen Zweck sehr gut eignen. Werden die Teilchen mit PEI- oder PMEI-Dendrimeren modifiziert, so zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass der native Zustand der ADH bei der Adsorption wahrscheinlich beibehalten wird. Zwar wird bei der Adsorption ein Teil des Enzyms „vergraben“ und blockiert, allerdings lässt es sich auf eine einfache Weise durch Zentrifugation oder Einwirkung eines Magneten nahezu vollständig aus der Reaktionslösung entfernen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Druck ein wirkungsvolles Werkzeug darstellt, um einen Einblick in den Mechanismus der ADH-Adsorption zu erhalten. Auf diese Weise konnten die Beiträge der kinetischen und sterischen Effekte auf die enzymatische Reaktion von immobilisierter ADH voneinander getrennt werden. Mit Hilfe von Druck als thermodynamischen Parameter konnte nicht nur das Adsorptionsverhalten von ADH erklärt werden, sondern auch der Unterschied zwischen den unterschiedlichen Grenzflächen gedeutet werden.

5 Projekt „Polyelektrolyt-Multischichten“

Polyelektrolyt-Multischichten (PEM) lassen sich leicht durch die sog. Schicht-für-Schicht Abscheidungstechnik herstellen, bei der eine feste Oberfläche abwechselnd in eine Polykation- und eine Polyanionlösung getaucht wird [92]. Vor kurzem wurde eine PEM entwickelt, welche ein Protein, Calmodulin (CaM), als Polyanion enthält [54]. Diese CaM-PEM wurde durch Röntgen- und Neutronenreflektometrie bei Umgebungsdruck charakterisiert. Interessanterweise konnte eine strukturelle Änderung in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration in der Lösung beobachtet werden, die mit der Bindung von vier Ca^{2+} -Ionen durch ein CaM-Protein verbunden ist. Darüber hinaus kann CaM viele Moleküle binden, wie beispielsweise Trifluoperazin (TFP). Wenn CaM TFP in wässriger Lösung bindet, kommt es zu einer großen Konformationsänderung des Proteins [51]. Diese Konformationsänderung scheint jedoch in einer PEM durch starke elektrostatische Wechselwirkungen unterdrückt zu werden [54]. Im Gegensatz dazu wird eine bioresponsive Grenzfläche erhalten, wenn CaM in eine nicht geladene Poly(ethylenglykol)-(PEG)-Schicht eingebettet ist, welche ihre Struktur in Abhängigkeit von der TFP-Konzentration und damit von der Konformation von CaM in der PEG-Schicht ändert [93].

Angesichts dieser vielversprechenden Ergebnisse ist es das Ziel dieses Kapitels, das bioresponsive Verhalten der CaM-PEM-Grenzfläche und die Konformationsfreiheit des eingebetteten CaM als Funktion des Drucks mittels Röntgenreflektometrie zu charakterisieren. Es ist bekannt, dass Druck Ionenbindungen in wässriger Lösung bricht [49]. Die Hydratation der freiverdenden Ionen ist mit einer höheren Packungsdichte der Wassermoleküle verbunden, die bei Drücken bis etwa 2000 bar beobachtet wird. Hier wird dieser Druckeffekt ausgenutzt, um die starke elektrostatische Anziehungskraft zwischen CaM und den Polykationen in einer CaM-PEM zu reduzieren, sodass Konformationsbewegungen des eingebetteten Proteins erleichtert werden. Auf diese Weise unterstützt der Druck das bioresponsive Verhalten der Multischicht. Insbesondere, wenn TFP in einer CaM-PEM an CaM bindet, durchläuft CaM eine große Konformationsänderung von der offenen in die geschlossene Form, vorausgesetzt, der Druck ist hoch genug, um die starke elektrostatische Wechselwirkung zwischen CaM und den Polykationen der PEM zu verringern. Infolgedessen wird eine signifikante Veränderung der CaM-PEM-Dicke erwartet.

Ein Teil der im folgenden Kapitel vorgestellten Ergebnisse und Daten wurden bereits in [94] veröffentlicht. Die Abbildungen wurden mit der Erlaubnis von Elsevier übernommen oder abgewandelt.

5.1 Einführung

Es wurden vier Arten von Grenzflächen hergestellt und charakterisiert:

- Si-Plättchen – PEI – PSS – PAH – (PSS – PAH)_x
- Si-Plättchen – PEI – PSS – PAH – (CaM – PAH)_x
- Si-Plättchen – PEI – PSS – PDDA – (PSS – PDDA)_x
- Si-Plättchen – PEI – PSS – PDDA – (CaM – PDDA)_x

Die Polykationen sind Poly(ethylenimin) (PEI), Poly(allylaminhydrochlorid) (PAH) und Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) (PDDA), das Polyanion ist Polystyrolsulfonat (PSS). Die Charakterisierung erfolgte hinsichtlich des Aufbaus, der Stabilität und des Ionenaustausches, um den Kontrast zu verbessern. Es ist zu erwähnen, dass die erste und zweite Grenzfläche bereits bei Umgebungsdruck teilweise charakterisiert wurde [54].

Polyelektrolyt-Multischichten als Grenzfläche

Die Bildung von Polyelektrolyt-Multischichten (PEM) bietet eine weitere effiziente Möglichkeit, Materialoberflächen mit einer Vielzahl von verschiedenen Polyelektrolyten zu beschichten [95]. Auch wenn die Untereinheiten mit den zuvor beschriebenen Polyelektrolytbürsten sehr ähnlich sind, so sind der Aufbau und die Struktur unterschiedlich. In solche Multischichten lassen sich Proteine einbetten oder auf ihnen adsorbieren, um biofunktionalisierte Schnittstellen zu entwerfen [96, 97]. Es konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur von in PEM eingebetteten Proteinen weitgehend erhalten werden kann [98, 99]. Darüber hinaus scheinen PEM eine freundliche Umgebung für Enzyme zu liefern, da die katalytische Aktivität und somit die interne Dynamik erhalten bleibt [100]. In einigen Fällen wurde auch die Diffusion von Proteinen und Peptiden in PEM nachgewiesen. So können sich beispielsweise Poly(L-lysin) und Lysozym in Multischichten aus Poly(L-lysin) und Hyaluronsäure bewegen [101].

Offensichtlich behalten Proteine, die an PEM adsorbiert oder in diese eingebettet sind, eine gewisse Konformationsfreiheit, da dies für die enzymatische Aktivität erforderlich ist. Es gibt jedoch starke Wechselwirkungen der Proteine mit entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten, die diese Freiheit in gewissem Maße einschränken. Es fehlt immer noch an Wissen über das Ausmaß einer solchen Konformationsfreiheit von Proteinen, die an PEM adsorbiert oder darin eingebettet sind. Die Konformationsfreiheit von CaM als Polyanion in PEM wurde bereits von Süleyman Cinar untersucht [54]. CaM hat eine Molmasse von etwa $16\,800\text{ g mol}^{-1}$ (148 Aminosäurereste) und eine stark negative Nettoladung von -15 e bei neutralen pH-Werten mit vier

Ca^{2+} -Ionen [102]. Zunächst befindet sich holo-CaM (mit 4 Ca^{2+} gesättigt) in einer offenen, hantelförmigen Konformation, nach Bindung eines Liganden hat holo-CaM eine geschlossene, globulare Konformation (Abb. 3-3). Wenn beispielsweise Ca^{2+} -gesättigtes CaM Trifluoperazin (TFP) bindet, nimmt der Gyrationradius von 21.9 auf 17.6 Å und der maximale Durchmesser von 61 auf 48 Å ab [51]. Nach der Ligandenbindung erfährt holo-CaM also eine signifikante Änderung der Größe. Daher ist es sehr interessant, ob diese Konformationszustände noch induziert werden können, wenn CaM als Teil einer PEM verbaut ist. Ein Effekt in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Sättigung konnte für eine der hier untersuchten PEM bereits bei Umgebungsdruck beobachtet werden [54].

5.2 Präparation

Die Methode der Wahl zur Strukturuntersuchung in diesem Projekt ist die Röntgenreflektometrie. Diese erlaubt eine Analyse der Elektronendichte in z-Richtung mit Å-Auflösung und ist somit sensitiv für die Schichtdickenänderung des Grenzflächensystems. Die Herstellung der PEM erfolgte auf Si-Plättchen der Größe $1.5 \times 2.0 \text{ cm}^2$, die von Siltronic (Burghausen, Deutschland) bereitgestellt wurden. Für die Messungen am DELTA wurden Plättchen der Größe $7.6 \times 7.6 \text{ mm}^2$ verwendet. Zur Säuberung wurden die Plättchen in einer Reinigungslösung (30 %ig $\text{NH}_3 \text{ (aq.)}$ / 30 %ig $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ (aq.)}$ / H_2O ; im Verhältnis 1:1:5) kurz aufgekocht und anschließend mit entionisiertem Wasser gespült. Saubere Plättchen konnten nun in entionisiertem Wasser über Wochen gelagert werden. Der Aufbau der Multischicht erfolgte auf den gereinigten Plättchen mit Hilfe der *layer-by-layer*-Methode wie in Abb. 5-1 schematisch dargestellt.

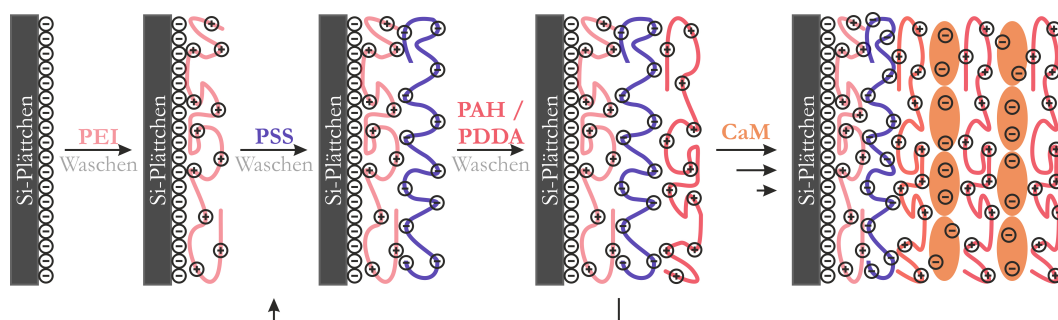


Abb. 5-1 Schematische Darstellung des Aufbaus einer PEM mit eingebettetem Protein mittels der *layer-by-layer*-Methode. Zwischen den alternierenden Adsorptionsschritten wurde ein Waschschritt mit entionisiertem Wasser durchgeführt. In rot sind die Kationen und in Blau die Anionen dargestellt. Nach einem Vorläufer wird als Anion das negativ geladen CaM verwendet (letzte Schritte).

Alle Polymerlösungen wurden als 10 mM, bezogen auf die Monomerkonzentration, mit 10 mM CaCl_2 und 500 mM NaCl angesetzt, der pH Wert wurde nicht eingestellt. Die Proteinlösung wurde als 0.1 mg mL^{-1} CaM in 10 mM MES-Puffer mit 10 mM CaCl_2 und 100 mM NaCl bei pH 7 angesetzt. Die Präparation erfolgte durch sequentielles Inkubieren der Si-Plättchen in den Polymer- bzw. Protein-Lösungen für 5 Minuten. Zwischen den Schichten erfolgte vorsichtiges Spülen mit entionisiertem Wasser, gefolgt von gründlichem Schwenken in entionisiertem Wasser, um loses Polymer bzw. Protein zu entfernen, welches ansonsten zur Komplexbildung führen könnte. Es wurden zwei unterschiedliche Multischichten, mit PAH und mit PDDA, hergestellt. Unabhängig von der Multischicht ist die erste Schicht stets PEI gewesen, weil dies für eine stabilere und regelmäßige Schicht gesorgt hat. Insgesamt wurden vier unterschiedliche Multischichten untersucht: Mit PAH oder PDDA als Kation und PSS als Anion, jeweils mit und ohne Protein. Es wurden auch Ansätze mit Hyaluronsäure getestet, lieferten aber keine verwertbaren

Ergebnisse. Eine unterschiedliche Anzahl an Schichten wurde untersucht. Als die reproduzierbarsten und stabilsten Multischichten haben sich folgende erwiesen:

- Si-PEI-PSS-PAH-(PSS-PAH)₂
- Si-PEI-PSS-PAH-(CaM-PAH)₂
- Si-PEI-PSS-PDDA-(PSS-PDDA)₂
- Si-PEI-PSS-PDDA-(CaM-PDDA)₂

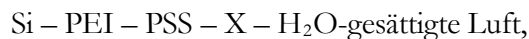
Diese wurden ausführlich mittels der Röntgenreflektometrie untersucht. Es wurde die Stabilität gegenüber Pufferwechsel, Spülen mit Wasser und Lagerung getestet. Nach dem Aufbau der PEM wurde der Puffer gegen einen NaI-haltigen gewechselt, um die Elektronendichte innerhalb der Multischichten zu erhöhen. Die Idee war, dass die Gegenionen innerhalb der Multischicht ausgetauscht werden können und somit die Elektronendichte steigt, was zu einer Kontrastverbesserung für die Messungen am DELTA gegen Wasser führt. Am DELTA wurde dann die Multischicht mit PAH, mit und ohne CaM, druckabhängig vermessen. Anschließend wurde versucht, eine Konformationsänderung des in der Multischicht eingebetteten CaM durch die Bindung von vier TFP Molekülen mit Hilfe von Druck einzuleiten.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

Es wurden viele unterschiedliche Ansätze und Multischichtdicken ausprobiert und getestet. Im nachfolgenden Kapitel werden die finalen und erfolgreichsten vorgestellt und diskutiert. Zunächst wurde der Aufbau der beiden PEM ohne das eingebettete Protein studiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung des Aufbaus mit dem Protein. Ein Pufferwechsel wurde durchgeführt, um die Elektronendichte innerhalb der PEM zu erhöhen. Die Idee war, dass die Gegenionen innerhalb der Multischicht ausgetauscht werden könne und somit die Elektronendichte steigt, was zu einer Kontrastverbesserung für die Messungen am DELTA gegen Wasser (Abb. 2-7) führen sollte.

Polyelektrolytmultischichten ohne CaM

Zunächst wurde der Aufbau der beiden PEM ohne Protein untersucht, um eine Referenz zu erhalten. Da die ersten drei Schichten, der so genannte Vorläufer, für beide Fälle gleich sind, wurde zunächst dieser studiert. Die Sequenz ist dabei:



mit X als PAH bzw. PDDA, je nach PEM. Nach jedem Beschichtungsschritt wurde sofort in der Hydratationszelle (Abb. 2-6) eine Reflektivitätskurve aufgenommen (Abb. 5-2).

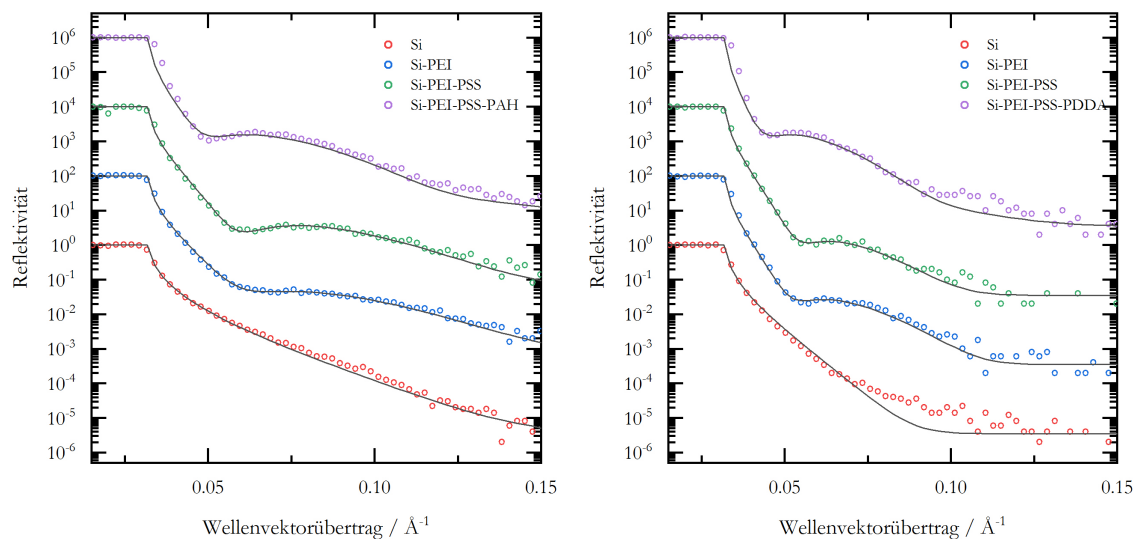


Abb. 5-2 Aufbau des Vorläufers der beiden untersuchten Multischichten, verfolgt mithilfe der Röntgenreflektometrie. Gezeigt sind die prozessierten Reflektivitätskurven mit den korrespondierenden Anpassungskurven. Die einzelnen Messungen wurden um den Faktor 100 zu einander versetzt.

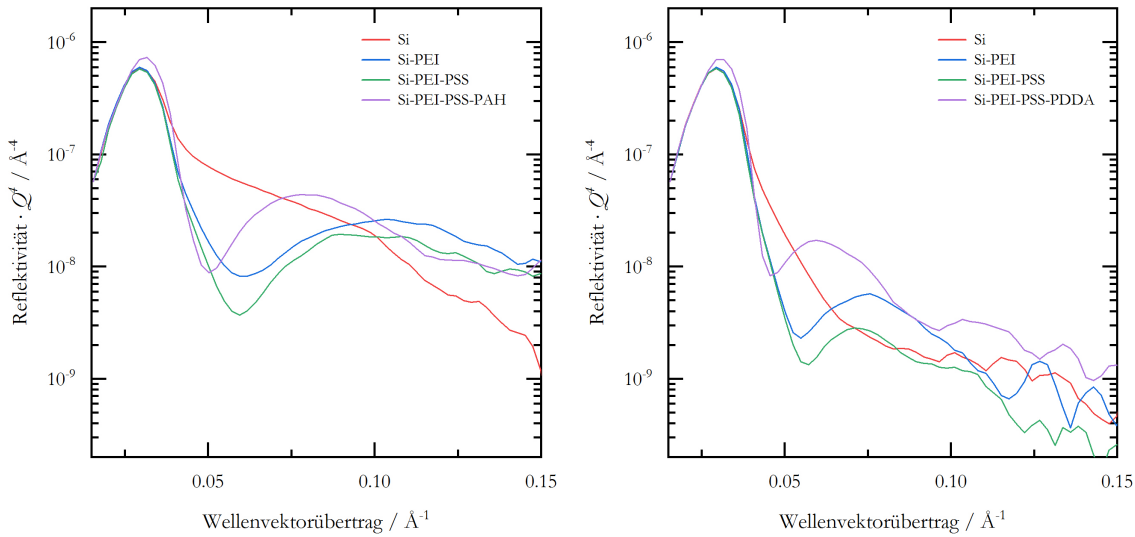


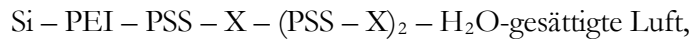
Abb. 5-3 Auf $1/Q^4$ normierte Reflektivitätskurven der beiden Vorläufersequenzen. Es handelt sich um dieselben Daten wie in Abb. 5-2.

Die Anpassung der Kurven erfolgte stets mit einem Ein-Schicht-Model, wobei die Parameter des vorherigen Schrittes als Ausgangspunkt für den nächsten verwendet worden sind. Wie in Abb. 5-2 zu erkennen, sind die Oszillationen nicht sehr groß, sodass die Effekte und Unterschiede nur schwierig zu sehen sind. Aus diesem Grund werden im Folgenden die aufgenommenen Kurven mit Q^4 multipliziert, um den Reflektivitätsabfall einer glatten Grenzfläche zu berücksichtigen. Zusätzlich wurden die Kurven mittels eines gleitenden Durchschnitts über 5 Messpunkte geglättet. Die Anpassungskurven werden im Folgenden nicht mehr mit aufgetragen (Abb. 5-3), um die Abbildungen übersichtlich zu halten. Die Schichtdicke des Vorläufers mit PDDA ist deutlich größer, als die mit PAH (Tabelle 5-1). Obwohl hier lediglich 3 Schichten insgesamt aufgebracht wurden und sich die beiden PEM nur in einer Schicht unterscheiden, ist die Differenz deutlich zu sehen. Diese Beobachtung hängt damit zusammen, dass PDDA eine permanente und PAH eine pH-abhängige Ladung trägt. Somit sind die Wechselwirkungen stärker und nicht so stark vom pH oder der Ionenstärke der Lösung abhängig. Allerdings sollte auch der Effekt der Hydratisierung nicht vernachlässigt werden. Es ist durchaus möglich, dass PDAA mit seiner permanenten Ladung zusätzlich stärker hydratisiert wird, was zum Anschwellen der PEM führt.

Tabelle 5-1 Schichtdicken der beiden Vorläufer. Erhalten aus der Anpassung der Röntgenreflektivitätskurven mithilfe eines Ein-Schicht-Modells, gemittelt aus 7-9 Messungen.

| Schicht | Dicke / Å |
|-----------------------|-------------|
| Si – PEI – PSS – PAH | 61 ± 7 |
| Si – PEI – PSS – PDDA | 78 ± 11 |

Anschließend wurden auf die Vorläufer-Sequenzen jeweils zwei weitere Polymerdoppelschichten aufgebracht:



mit X als PAH bzw. PDDA, je nach PEM. Von diesen wurden ebenfalls Röntgen-Reflektivitätskurven aufgenommen und normiert. In Abb. 5-4 ist der entsprechende Vergleich der vollständigen Multischicht ohne CaM zum zuvor vorgestellten Vorläufer gezeigt. Die Kurven wurden ebenfalls angepasst, um die entsprechenden Beiträge zu den Schichtdicken zu erhalten (Tabelle 5-2). Nicht nur bei dem Aufbau des Vorläufers, sondern auch während des Aufbaus der kompletten Multischicht führt eine Polymerdoppelschicht mit PDDA zu einer ca. doppelt so dicken Schicht wie die mit PAH. Nachdem der Aufbau der Multischichten charakterisiert worden ist, wurde der Ionenaustausch durchgeführt. Hierfür wurden die fertig präparierten Multischichten in einer NaI-Lösung für unterschiedliche Zeiten inkubiert und Reflektivitätskurven (Abb. 5-5) aufgenommen. Der erwartete Effekt der Kontrasterhöhung konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Oszillationshöhe hätte zunehmen müssen, wenn ein signifikant großer Kontrast induziert worden wäre. Stattdessen kann für die PAH-haltigen PEM kaum ein Unterschied in den Kurven beobachtet werden und für die PDDA-haltigen eine Verschiebung zu größeren Wellenvektorüberträgen.

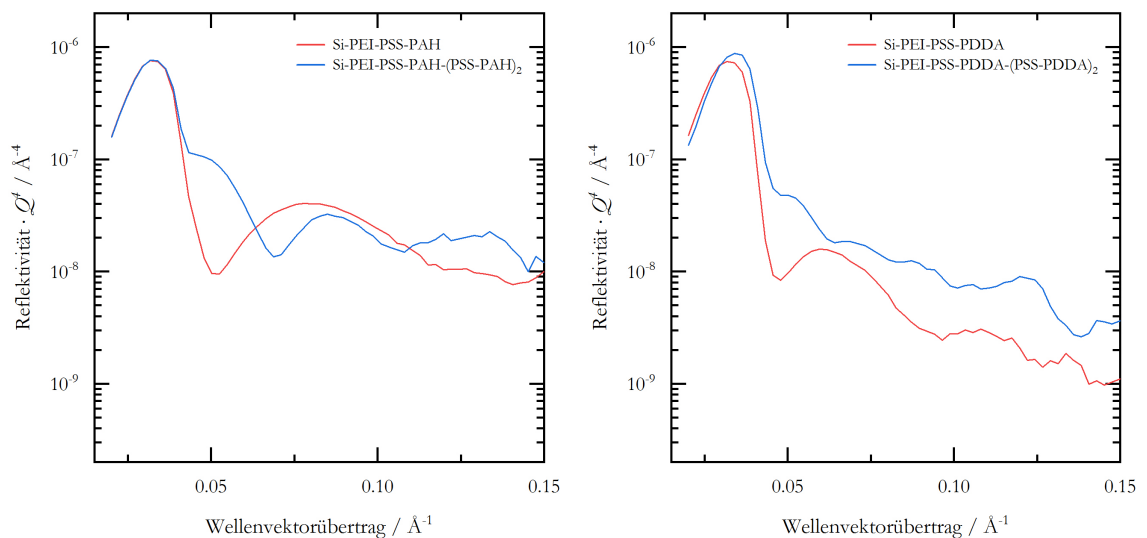


Abb. 5-4 Auf $1/Q^4$ normierte Reflektivitätskurven verschiedener PEM. Es ist der Vergleich der vollständigen Multischicht (blau) zur entsprechenden Vorläufersequenz gezeigt (rot). Bei der Messung der vollständigen PDDA-haltigen Multischicht scheint es zu einer Dejustage gekommen zu sein, weswegen die Höhe der Oszillationen gering ausfällt.

Tabelle 5-2 Schichtdicken verschiedener Multischichten. Erhalten aus der Anpassung der Röntgenreflektivitätskurven mithilfe eines Ein-Schicht-Modells, gemittelt aus 7-9 Messungen.

| Schicht | Dicke / Å |
|---|--------------|
| PSS-PAH (Teilschicht) | 34 ± 5 |
| PSS-PDDA (Teilschicht) | 83 ± 12 |
| Si-PEI-PSS-PAH-(PSS-PAH) ₂ | 143 ± 15 |
| Si-PEI-PSS-PDDA-(PSS-PDDA) ₂ | 245 ± 22 |

Zwar ist die Oszillationsbreite und nicht die Position umgekehrt proportional zur Schichtdicke, dennoch spricht diese Verschiebung für eine Schichtdickenabnahme. Dies kann durch eine Desorption der Polymere oder durch eine Konformationsänderung von PDDA hervorgerufen werden. Ein Schnelltest, bei dem der PDDA-Lösung NaI hinzugegeben worden ist, wurde durchgeführt. Es hat sich gezeigt, dass PDDA durch Iodid komplexiert wird und ausfällt. Der gleiche Test mit PAH-Lösung hat keinen Effekt gezeigt.

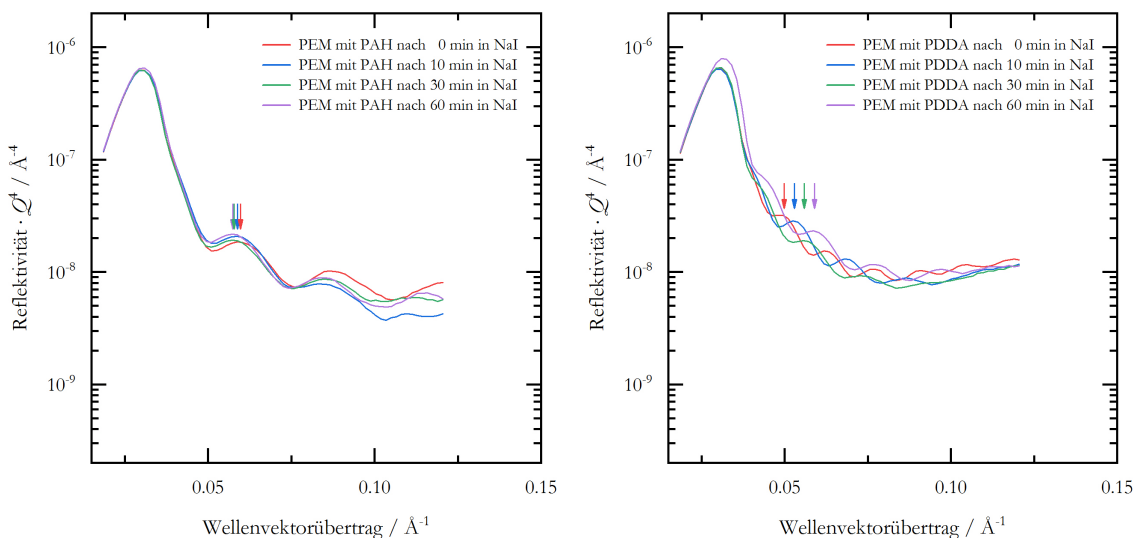
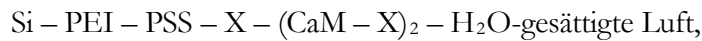


Abb. 5-5 Beispielhafte auf $1/Q^4$ normierte Reflektivitätskurven der PEM nach Inkubation in NaI-Lösung zur Untersuchung des Effekts von Iodid auf die Struktur und den Kontrast der Schichten.

Die Ergebnisse zeigen, dass keine starke Wechselwirkung zwischen PAH und I stattfindet. Lediglich eine geringe Verschiebung, die auf ein Anschwellen der Multischicht hindeutet, wird beobachtet. Weder konnte eine Erhöhung des Kontrastes beobachtet werden, noch hat die direkte Vermischung einen Effekt gezeigt. Mit PDDA hingegen ist die Wechselwirkung sehr stark. Bei direkter Vermischung wird das Polymer komplexiert und fällt aus, im Fall der Multischicht scheint eine Desorption stattzufinden, welche vermutlich ebenfalls der Komplexbildung geschuldet ist.

Polyelektrolytmultischichten mit CaM

Nachdem die Referenz-Polyelektrolytmultischichten charakterisiert worden sind, wurden die Multischichten mit eingebettetem holo-CaM hergestellt. Dabei wurde ab der zweiten Schicht das negative PSS gegen holo-CaM ausgetauscht, was folgende Sequenz ergab:



mit X als PAH bzw. PDDA, je nach PEM. Es wurde jeder Schritt mittels Röntgenreflektometrie verfolgt.

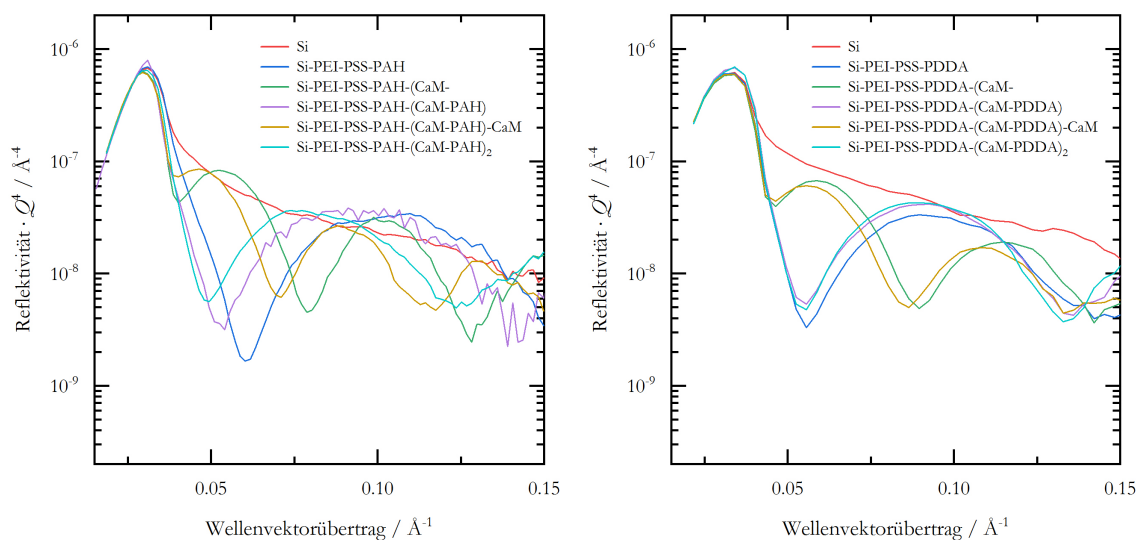


Abb. 5-6 Beispielhafte auf $1/Q^4$ normierte Reflektivitätskurven des Aufbaus der PEM mit CaM. Es ist der Aufbau der Multischichten, sowie der Effekt der 60 min andauernden Inkubation in NaI gezeigt.

Der Aufbau der PEM + CaM ist in Abb. 5-6 gezeigt. Auffällig sind zwei wesentliche Unterschiede zu den Multischichten ohne holo-CaM:

- Die Gesamtschichtdicke ist für beide Versionen mit CaM (Tabelle 5-3) sehr viel geringer als ohne (Tabelle 5-2).
- Die Gesamtschichtdicken sind mit CaM für beide Multischichten, mit PAH und PDDA, sehr ähnlich (Abb. 5-6 und Tabelle 5-3).

Die genauen, aus den Anpassungen resultierenden Schichtdicken sind in Tabelle 5-3 gezeigt. Wie in Abb. 5-6 deutlich zu sehen, scheidet sich zunächst sehr viel Calmodulin auf den Multischichten ab, wovon das meiste mit der anschließenden Polyelektrolytschicht desorbiert. Eine Doppelschicht aus Calmodulin und Polymer scheint nur eine geringe, aber dennoch signifikante Ände-

rung der Schichtdicke zu verursachen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass entweder verbleibendes CaM tief in der Multischicht vergraben werden muss, oder dieses fast vollständig desorbiert. In beiden Fällen wird aber eine Multischicht mit eingebetteten CaM erhalten. Insbesondere bei PAH ist der schrittweise Anstieg der Schichtdicke deutlich zu sehen (Abb. 5-6).

Tabelle 5-3 Gemittelte Schichtdicken der beiden vollständigen Multischichten mit holo-CaM, sowie der entsprechenden Doppelschichten. Erhalten aus der Anpassung der Röntgenreflektivitätskurven mithilfe eines Ein-Schicht-Modells, gemittelt aus 5 Messungen.

| Schicht | Dicke / Å |
|---|------------|
| CaM-PAH | 9 ± 1 |
| CaM-PDDA | 4 ± 1 |
| Si-PEI-PSS-PAH-(CaM-PAH) ₂ | 77 ± 1 |
| Si-PEI-PSS-PDDA-(CaM-PDDA) ₂ | 70 ± 6 |

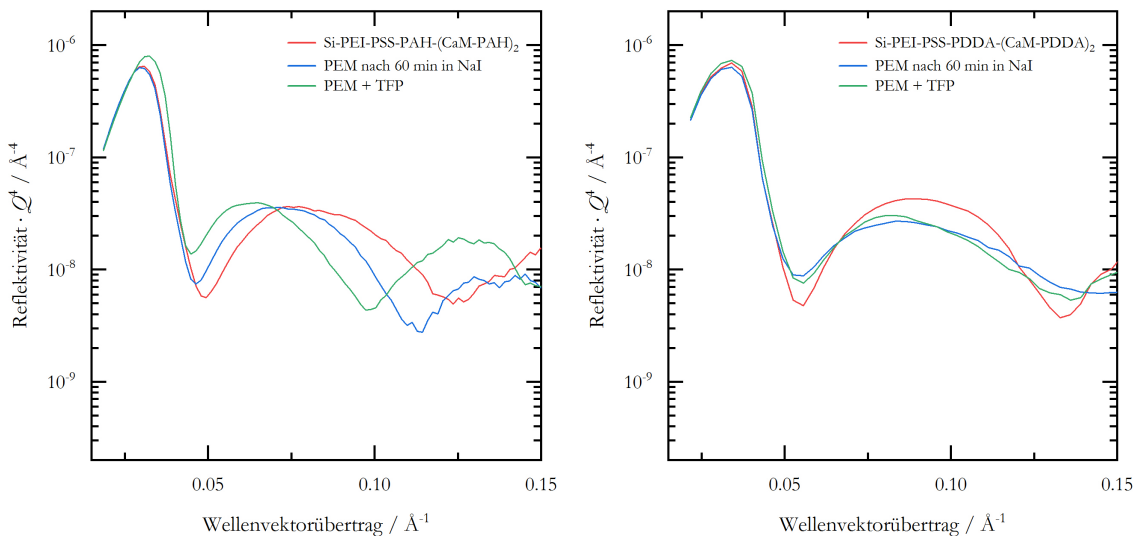


Abb. 5-7 Beispielhafte auf $1/Q^4$ normierte Reflektivitätskurven der PEM vor und nach Einwirkung von NaI- und TFP-Lösungen.

Abschließend wurde der Effekt von Iodid und TFP auf die aufgebauten Multischichten untersucht. In Abb. 5-7 sind die Effekte im Vergleich zu den aufgebauten Multischichten dargestellt. Bei der Abbildung auf der linken Seite handelt es sich um die PEM mit PAH und eingebettetem holo-CaM. Durch die Inkubation über 60 min in 500 mM NaI-Lösung findet wie bei der PEM ohne CaM (Abb. 5-5) ein Anschwellen ($+ 7 \text{ Å}$) der Multischicht statt. Dies ist durch schmalere, zu kleineren Q -Werten verschobene Oszillation gekennzeichnet. Nach der Inkubation mit TFP steigt die Schichtdicke nochmals um 13 Å an. Die Reflektivitätskurven der PEM mit PDDA und eingebettetem holo-CaM (Abb. 5-7, rechts) zeigen deutlich, dass die zuvor stark ausgeprägte

Wechselwirkung von Iodid mit PDDA der Multischicht (Abb. 5-5) nicht mehr beobachtet werden kann. Auch die Inkubation mit TFP zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Elektrodendichte-Struktur.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei der Multischicht mit PAH Calmodulin eindeutig und sukzessiv eingebaut werden kann. Der Effekt von PAH mit Iodid bleibt dabei erhalten, was ein Indiz dafür ist, dass die konformationelle Freiheit des Polymers durch den Einbau von holo-CaM nicht verändert wird. Studien haben eine Korrelation zwischen dem chaotropen Charakter der Ionen des Lösungsmittels und der Schichtdicke der resultierenden Multischicht gezeigt [103]. So bilden Polymere in kosmotropen Lösungsmitteln eher planare Schichten an Grenzflächen aus, wohingegen in chaotropen eine Knäuel-Struktur eingenommen wird, die eine höhere Schichtdicke liefert. Zwar ist der genaue Mechanismus unbekannt, allerdings sind die Effekte konsistent, was zeigt, dass die beobachtete Schichtdickenzunahme aus dem erfolgreichen Ionenaustausch stammt. Auch die Konformationsfreiheit von CaM scheint erhalten zu werden, da dieses weiterhin TFP binden kann. Die Schicht quillt nach der Bindung von TFP durch CaM auf. Vermutlich entstehen durch die Bindung von TFP an CaM freie Ladungen am Polymer, welche intrinsisch nicht kompensiert werden können. Es kommt zur extrinsischen Ladungskompensation durch die Iodidionen, sodass der osmotische Druck innerhalb der Schicht steigt und Lösungsmittel hineinströmen kann. Die Multischicht mit PDDA und CaM hat hingegen keine signifikanten Schichtdickenzunahmen durch die Einbettung des Proteins gezeigt. Auch die Gesamtschichtdicke der resultierenden Schicht ist im Rahmen des Fehlers nicht größer als die Schicht der Vorläufersequenz. Weder Iodid noch TFP haben einen Effekt auf die Struktur der Multischicht. Zwar adsorbiert CaM an der PDDA-Grenzfläche, scheint aber vollständig zu desorbieren, sobald erneut mit PDDA inkubiert wird.

Druckeffekt auf Polyelektrolytmultischichten

Aufgrund der beschränkten Messzeit am DELTA erschien es sinnvoller, nur ein System ausführlich zu messen und zu reproduzieren, als beide zu untersuchen. Da sich bei der Charakterisierung der Systeme die Multischichten mit PAH als vielversprechend herausgestellt haben, wurden lediglich diese für die Hochdruckmessungen verwendet. Insbesondere der Einbau des Calmodulin in die Multischicht mit PDDA konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, weswegen sich dieses System, an dieser Stelle als weniger interessant erwies.

Zunächst wurde nochmals der Effekt von Iodid überprüft. Es hat sich bei den Messungen gegen Luft gezeigt, dass die Multischicht zwar anschwillt, aber keinen signifikanten Unterschied im

Kontrast mit sich bringt. Allerdings ist der Kontrast gegen Luft auch so hoch, dass eine geringe Erhöhung kaum sichtbar ist. Gegen Wasser ist der Kontrast sehr gering, sodass eine kleine Erhöhung der Elektronendichte in der Multischicht bereits einen Effekt zeigen könnte. In Abb. 5-8, links ist der Vergleich der PEM-Reflektivität in NaCl- mit der in NaI-Lösung gezeigt. Die Messung wurde bei 50 bar durchgeführt und doppelt reproduziert. Die erhaltenen Kurven wurden mittels eines gleitenden Durchschnitts geglättet, um das Rauschen zu minimieren. Wie auch zuvor sind eine Verschiebung zu kleineren Wellenvektorüberträgen und eine geringere Oszillationsbreite deutlich erkennbar. Auch bei diesen Messungen konnte keine signifikante Erhöhung des Kontrastes beobachtet werden. Deswegen sind alle weiteren Messungen klassisch in einem 500 mM NaCl-Puffer präpariert und gemessen.

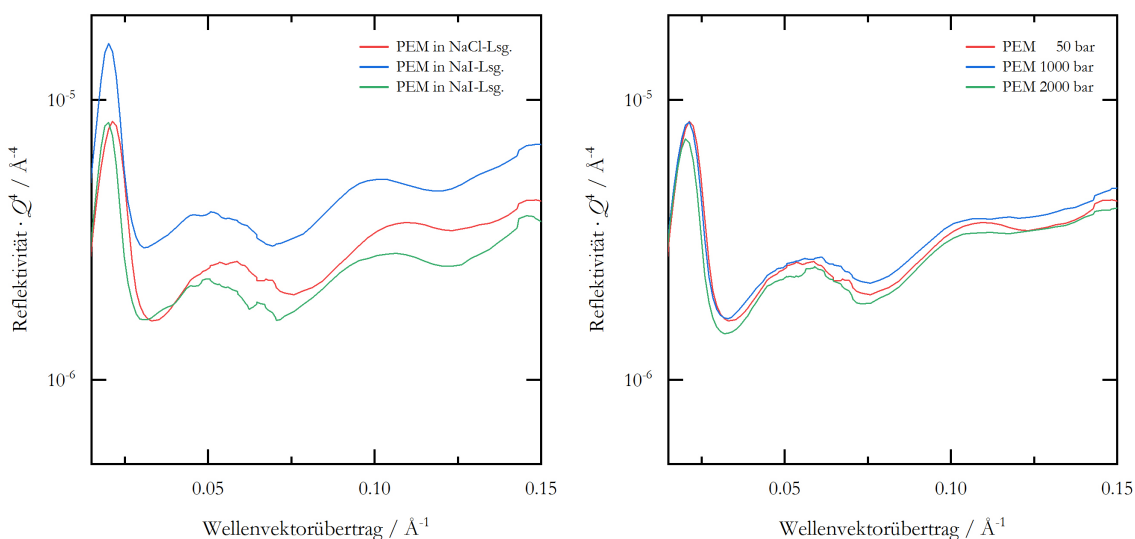


Abb. 5-8 Beispielhafte Darstellung der auf $1/Q^4$ normierten Reflektivitätskurven der PEM mit PAH. Links ist der Vergleich der Reflektivität von PEM in NaCl mit PEM in NaI gezeigt. Rechts ist die Druckabhängigkeit der Multischicht zu sehen.

Nachdem der Effekt von Iodid studiert worden ist, wurde die Druckabhängigkeit untersucht. In Abb. 5-8, rechts sind die druckabhängigen Reflektivitätskurven der Multischicht mit PAH gezeigt. Es wurde in 500 bar-Schritten bis 4000 bar gemessen, wobei übersichtshalber nur eine Auswahl der Messkurven gezeigt ist. Es wurde versucht, die Kurven mit Parratt32 anzupassen, allerdings ist die Amplitude der Oszillationen nicht groß genug, damit der generische Fit diese erfassen kann. Dennoch können aus dem Verlauf der auf $1/Q^4$ normierten Kurven Schlussfolgerungen gezogen werden. Es fällt auf, dass die Struktur der Multischicht sich mit Druck kaum verändert. Die Position und die Breite der ersten Amplitude ($Q = 0.034 - 0.075 \text{ \AA}^{-1}$) bleibt über

den gesamten Druckbereich unverändert. Diese Oszillationsbreite ist konsistent mit der Schichtdicke von 153 \AA und somit in guter Übereinstimmung mit den angepassten Ergebnissen der Messungen bei Umgebungsdruck. Der einzige beobachtbare Unterschied ist das Verschwinden des dritten Minimums ($Q = 0.125 \text{ \AA}^{-1}$) bei hohen Drücken. Dieser Effekt ist reproduziert und reversibel, sodass ein Artefakt der Messung oder der Datenverarbeitung ausgeschlossen werden kann. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten könnte sein, dass zwar die Netto-Schichtdicke gleich bleibt, allerdings kleine *void volumes* in der Schicht mit steigendem Druck gefüllt werden, sodass lokal eine etwas kompaktere Konformation eingenommen wird ein Anstieg der Rauheit beobachtet werden kann.

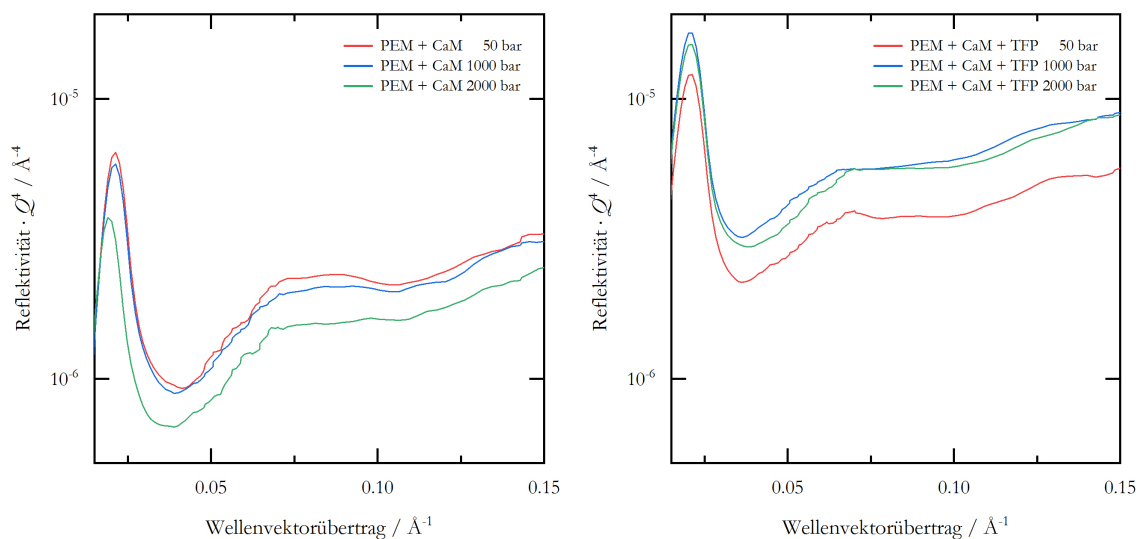


Abb. 5-9 Beispielhafte Darstellung der auf $1/Q^4$ normierten Reflektivitätskurven der PEM mit PAH und eingebettetem CaM. Links ist die Druckabhängigkeit der Multischicht, rechts ist die Druckabhängigkeit der Multischicht mit TFP-haltiger Puffer-Lösung zu sehen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die aufgebaute Multischicht relativ druckstabil ist, wurde die Multischicht mit eingebetteten CaM untersucht (Abb. 5-9). Auch hier wurden druckabhängige Messungen in 500 bar-Schritten bis 4000 bar durchgeführt, wobei der Übersichtlichkeit halber nur eine Auswahl der Reflektivitätskurven dargestellt ist. Wie bereits bei Normaldruck festgestellt wurde, ist die Schichtdicke der aufgebauten Multischicht deutlich kleiner als ohne CaM. Die Oszillationsbreite von ca. 0.06 \AA^{-1} ist konsistent mit der Schichtdicke von 98 \AA . Auch hier sind die Amplituden sehr gering, sodass keine Anpassung möglich war. Aus den Verläufen der Reflektivitätskurven lässt sich keine signifikante Schichtdickenänderung der PEM mit steigendem Druck erkennen. Lediglich das zweite Minimum, welches sich nun bei einem Q -Wert von

ca. 0.11 \AA^{-1} befindet, verschwindet erneut. Vermutlich werden auch hier wieder *void volumes* aufgefüllt, sodass die Rauheit der Oberfläche steigt. Bei genauem Hinsehen kann sogar eine kleine Verschiebung der Oszillation bei 2000 bar zu kleineren Q -Werten vermutet werden. Leider sind die Messdaten nicht von ausreichender Auflösung, um vernünftig angepasst zu werden, was ein eindeutiges Streulängenprofil liefern würde. Somit bleibt dieser beobachtete Effekt ungewiss.

Die Bindung von TFP durch CaM führt dazu, dass die erhaltenen Reflektivitätskurven bei 50 bar bereits dem Verlauf bei 2000 bar ohne TFP ähneln. Das zweite Minimum ist hier von Anfang an nicht ausgeprägt und verändert sich somit auch nicht mit steigendem Druck. Diese Beobachtung spricht dafür, dass nach der Bindung von TFP das System anscheinend in einer kompakten Konformation vorliegt, wo kaum *void volumes* existieren, die durch Druck gefüllt werden könnten. Die Schichtdicken können hier allerdings nicht abgeschätzt werden, weil der Kontrast noch geringer ist als zuvor und die Rauheit höher. Dennoch ist dieser Effekt mit den vorherigen Ergebnissen konsistent.

5.5 Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass die *layer-by-layer*-Methode sich sehr gut eignet, Polyelektrolyt-Multischichten aufzubauen. Es werden stabile Multischichten erhalten, und es ist möglich, ein Protein darin einzubetten. Es wurden zwei Systeme charakterisiert: Multischichten mit PAH als Kation und welche mit PDDA. Bei dem Aufbau der herkömmlichen PEM (ohne Protein) werden mit PDDA signifikant dickere Schichten erhalten. Grund dafür ist vermutlich die permanente Ladung am PDDA, welche eine höhere Wechselwirkung mit dem anionischen PSS eingeht als das PAH. Aus demselben Grund ist der Ionenaustausch von Chlorid gegen Iodid nur für die Multischicht mit PAH erfolgreich. Die Wechselwirkung mit PDDA scheint so stark zu sein, dass dieses komplexiert wird und sich von der Multischicht ablöst. Bei PAH hingegen findet der Ionenaustausch zerstörungsfrei statt, und die Schichtdicke steigt aufgrund des chaotropen Effektes von Iodid. Der Einbau von CaM als Modellprotein ergibt für beide Systeme eine deutlich dünnere Multischicht. Bei PAH ist der Einbau reproduzierbar und sukzessiv, bei PDDA wird das Protein entweder sehr tief im Polymer vergraben, oder gar nicht erst eingebaut. Durch den Einbau von CaM in die PAH-Multischicht wird die konformationelle Freiheit des Systems nicht verändert, da der Ionenaustausch weiterhin stattfindet und die Effekte die gleichen sind. Weiterhin scheint auch das eingebettete Protein weiterhin dynamisch zu sein, denn CaM bindet wie in Lösung TFP, was ebenfalls zur Steigerung der Schichtdicke führt. Druckabhängige Messungen mit dem PAH-System, sowohl als klassische Multischicht, als auch mit dem eingebetteten Protein, haben ergeben, dass die Multischicht bis 4000 bar weitgehend stabil bleibt. Es schienen lediglich kleine *void volumes* gefüllt zu werden, was ein reversibler und zerstörungsfreier Effekt ist. Wird die Umgebung mit TFP gesättigt, so bindet CaM dieses, was zu einer kompakteren und druckstabilen Konformation führt. In diesem Zustand gibt es keinerlei druckbedingte Veränderungen im System. Es ist zu erwähnen, dass der Kontrast der druckabhängigen Messungen unzureichend für eine Anpassung war, sodass die Effekte aus einer Betrachtung der Reflektivitäten abgeleitet worden sind und keine Elektronendichteprofile bestimmbar waren.

6 Projekt „Virale Fusionspeptide“

Dieses Kapitel stellt einen thematischen Exkurs in ein biologisches System dar und baut im Wesentlichen auf einen Teil der Ergebnisse der Dissertation von Christoph Jeworrek [28] auf. Dieser Teil ist einleitend und vergleichend ebenfalls vorgestellt und an der entsprechenden Stelle vermerkt. Die in diesem Kapitel gezeigten Daten, Abbildungen und Diskussionsansätze sind teilweise bereits publiziert worden [28, 104]. Die Rechte zur Nutzung in dieser Arbeit sind eingeholt worden.

Obwohl die hier untersuchte Membranfusion ein essenzieller und allgegenwärtiger biologischer Prozess ist, findet dieser nicht spontan statt. Grund dafür sind die hohe Hydratation der Kopfgruppen der Lipide sowie elektrostatische und sterische Abstoßung zweier Membranen. Beides führt zu großen Energiebarrieren, die überwunden werden müssen. In der Natur wird die Membranfusion unter anderem durch Fusionsproteine vermittelt. Um die Art und Weise, wie Fusionsproteine die Membranfusion steuern, besser verstehen zu können, wurden in dieser Arbeit die Wechselwirkungen zweier Fusionspeptide (FP), HA2-FP und TBEV-FP, und eines Kontrollpeptids L-16 mit Monoolein-Mesophasen als Funktion von Druck im Wasserunterschuss untersucht. Die Fusionspeptide stammen aus dem Influenzavirus *Hemagglutinin*-Fusionsprotein (HA2) und aus dem *Tick-borne encephalitis virus E* (TBEV) des durch Zecken übertragenen Enzephalitis-Virus (FSME). Durch die Verwendung von Synchrotronröntgenbeugung wurden die Änderungen des Monooleinphasenverhaltens beim Binden der Peptide bereits von Christoph Jeworrek bestimmt. In dieser Arbeit werden die begleitenden Sekundärstrukturen der Peptide durch FTIR-Spektroskopie analysiert. Als Hauptergebnis wurde erhalten, dass die Fusionspeptide unterschiedlich mit Monoolein interagieren und das druck- und temperaturabhängige Lipidphasenverhalten in unterschiedlichem Ausmaß verändern. Allerdings destabilisieren beide die flüssige lamellare Phase und begünstigen Phasen mit negativer Krümmung, d.h. inverse bikontinuierliche kubische und inverse hexagonale Phasen. Diese peptidinduzierten Phasenänderungen können durch Anwendung von hohem Druck teilweise rückgängig gemacht werden, was zeigt, dass die Förderung der negativen Krümmung durch eine weniger dichte Packung der Monooleinmembranen durch die Fusionspeptide erreicht wird.



6.1 Einführung

Virus-Zell-Fusion ist die Art und Weise, mit der alle umhüllten Viren, einschließlich humaner Pathogene wie dem *human immunodeficiency viruses* (HIV) und dem Ebola-Virus, in Zellen eindringen und krankheitsverursachende Replikationszyklen einleiten. In allen Fällen wird die Membran-Fusion von einem oder mehreren viralen Oberflächenglykoproteinen eingeleitet, welche allgemein als Fusionsproteine bezeichnet werden. Des Weiteren können einige der Fusionsproteine infolge einer Infektion auf der Zelloberfläche exprimiert werden und somit über die Zell-Zell-Fusion zu vielen ungünstigen Konsequenzen beitragen. Da die viralen Fusionsproteine also den ersten Schritt bei der Infektion und einen wesentlichen bei der Ausbreitung darstellen, ist es sinnvoll, die Wechselwirkung zwischen diesen Proteinen und einer Wirtsmembran zu studieren und genau zu verstehen, um vielversprechende Medikamente entwickeln zu können.

Virale Membranfusion

Wenn Wirtszellen von umhüllten Viren angegriffen werden, stellt die Membranfusion einen essentiellen Schritt dar, welcher durch so genannte Fusionsproteine vermittelt wird [105, 106]. Der Vorgang der fusionsproteinvermittelten, viralen Membranfusion ist in Abb. 6-1 schematisch dargestellt.

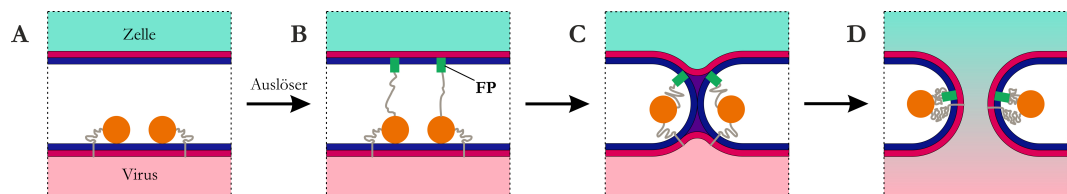


Abb. 6-1 Schematische Darstellung der durch virale Fusionsproteine vermittelten Membranfusion. Fusionsproteine werden aktiviert (A), Fusionspeptide (FP) werden in die Zielmembran eingeführt (B) und ein *hemifusion stalk* entsteht (C) bevor eine Fusionsspore gebildet wird (D). Die Abbildung wurde aus [104] entnommen.

Im ersten Schritt werden die zunächst inaktiven Fusionsproteine (Abb. 6-1, A) mithilfe eines *Triggers* aktiviert. Dieser Prozess kann, je nach Protein, sowohl durch einen Rezeptor, als auch durch eine pH-Wert-Änderung oder in einem zweistufigen Prozess durch beides ausgelöst werden. Infolgedessen wird ein kurzes hydrophobes Segment freigelegt, welches als Fusionspeptid (FP) oder Fusions Schleife bekannt ist. Dieses wird in die Wirtszellmembran eingeführt, wodurch ein Brückenintermediat gebildet wird (Abb. 6-1, B). Im anschließenden Fusionsprozess faltet sich das Fusionsprotein wieder zusammen und zieht beide Membranen aneinander. Wenn

die gegenüberliegenden (cis-) Lipidmonoschichten bereits miteinander verbunden sind, die distalen (trans-) Lipidmonoschichten jedoch noch voneinander getrennt sind, bildet sich ein *hemifusion stalk* (Abb. 6-1, C). Wenn anschließend auch die distalen Lipidmonoschichten miteinander verbunden sind, kommt es zur Fusionspore (Abb. 6-1, D), wodurch auch die beiden Zytoplasmen verbunden sind und die Erbinformation des Virus in die Zelle gelangen kann.

Sowohl die ausgebildeten Verbindungen zwischen den fusionierenden Membranen (*hemifusion stalk*) als auch die Fusionsporen sind charakteristische Strukturen für die Membranfusion und zeichnen sich durch eine hohe Krümmung der Membranmonoschicht aus. In der Taille ist die Monoschicht wie eine Satteloberfläche gekrümmt, und die beiden Hauptkrümmungen c_1 und c_2 haben entgegengesetzte Vorzeichen. Dies führt dazu, dass die mittlere Krümmung H klein und die GAUßSCHE Krümmung K groß und negativ ist:

$$H = \frac{(c_1 + c_2)}{2}, \quad K = c_1 \cdot c_2. \quad (6-1)$$

Lipidmesophasen mit diesen Eigenschaften sind inverse bikontinuierliche kubische Phasen, Q_{II} [107]. In der Tat können Q_{II} -Phasen als geordnete *Arrays* von *Hemifusion*-Intermediaten angesehen werden. In der Literatur wird die strukturelle Analogie zwischen der Bildung der Q_{II} -Phase und dem Fusionsweg sogar für die Abschätzung der der Fusionsporenbildung zugrunde liegenden Energetik herangezogen [108, 109]. Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Studien, bei denen inverse kubische Phasen und Membrankrümmung durch die Zugabe von Fusionspeptiden zu Lipidmembranen induziert werden konnten [110, 111]. In diesen Studien wurde nur das Fusionspeptid, der kurze, exponierte, hydrophobe Abschnitt des Fusionsproteins (Abb. 6-1, grün), verwendet. Es wird vorgeschlagen, dass eine verminderte freie Aktivierungsenergie der inversen kubischen Phasen zu einer erhöhten Geschwindigkeit der Hemifusion und Fusionsporenbildung führt. Daher ist die Störung von Lipidmembranen durch Fusionspeptide zwar wahrscheinlich erforderlich, um die virale Membranfusion einzuleiten, ist aber für diesen Prozess vermutlich nicht ausreichend [112, 113].

Monoolein

Als Lipid zum Aufbau der Modellmembran wurde in dieser Studie Monoolein (1-(cis-9-octadecenoyl)-rac-glycerol, MO) verwendet. Dieses eignet sich sehr gut für die hier gewählten Experimente, da es eine hohe strukturelle Vielfalt aufweist. Im Wasser bildet es praktisch alle Arten von Lipidphasen: lamellare Phasen, wie L_α , inverse kubische Q_{II} -Phasen mit den Raumgruppen $Ia3d$ und $Pn3m$ und die inverse hexagonale H_{II} -Phase. Das MO-Wasser-Phasendiagramm wurde

bereits in Abhängigkeit von Wasseranteil, Temperatur und Druck bestimmt. Dabei wurde die Abhängigkeit vom Wassergehalt im Wesentlichen durch Martin Caffrey studiert [114, 115] (Abb. 6-2). Bei dem in dieser Arbeit gewählten Wassergehalt von 17 Gew.-% kann mit steigender Temperatur die allgemeine Phasenfolge $L_{\alpha} \rightarrow Q_{II} \rightarrow H_{II}$ beobachtet werden. Mit zunehmendem Druck wird die umgekehrte Reihenfolge erwartet, da Hochdruck diejenigen Strukturen bevorzugt, die eine hohe Packungsdichte aufweisen [116, 117].

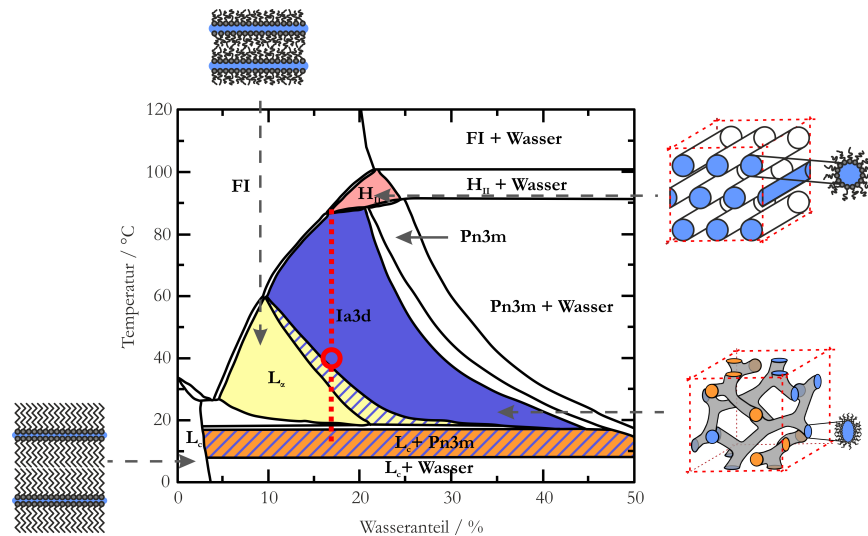


Abb. 6-2 Temperaturabhängiges Phasendiagramm des MO-Wasser-Systems. Erstellt nach dem Vorbild von [115]. Eingefärbt wurden nur die für diese Arbeit relevanten Phasen. Die rote Linie kennzeichnet den untersuchten Bereich für die T,p -Experimente [28], und der rote Kreis gibt den Ausgangspunkt für die Druckscans zur Strukturuntersuchung an.

Obwohl MO in biologischen Membranen nicht gefunden wird, hat es den Vorteil eines reichhaltigen Phasenverhaltens. Da alle Lipide, einschließlich MO, die allgemeine Phasenfolge als Funktion von Temperatur und Druck teilen, sind die Ergebnisse dieser Studie auch für biologische Membranen relevant. Somit können die in dieser Studie durchgeführten Hochdruckexperimente den Beitrag von Packungseffekten zur Lipidphasensteuerung von Fusionspeptiden aufzeigen.

Fusionsproteine

Die Informationen für diesen Abschnitt wurden hauptsächlich aus [106] entnommen. Studien haben gezeigt, dass die Membranfusionsproteine in drei Klassen unterteilt werden können, die sich im Wesentlichen anhand struktureller Kriterien unterscheiden. Darüber hinaus gibt es mindestens vier verschiedene Mechanismen, durch die virale Fusionsproteine aktiviert werden kön-

nen, um fusionsinduzierende Konformationsänderungen zu durchlaufen. Virale Fusionsproteine enthalten auch verschiedene Arten von Fusionspeptiden und variieren in ihrer Abhängigkeit von anderen Proteinen. Diese unterschiedlichen Merkmale ergeben eine reiche Vielfalt an Fusionsproteinen. Trotz diverser Unterschiede haben die Fusionsproteine auch einiges gemeinsam. So wandeln sich alle charakterisierten viralen Fusionsproteine aus einem komprimierten Zustand (je nach Klasse: Dimer oder Trimer) zu einem in die Membran eingebetteten um. Dieser hat meistens die Form einer Haarnadelstruktur, wodurch die Vereinigung von Virus- und Zielmembranen erleichtert wird. Während dieser Konformationsumwandlungen veranlassen die Fusionsproteine Membranen, sich durch Stadien der engen Apposition, Hemifusion und dann der Bildung kleiner und schließlich großer Fusionsporen zu bewegen. Es ist erstaunlich, dass stark voneinander abweichende Proteine die gleiche Gesamtstrategie zur Vermittlung der Fusion entwickelt haben, welche einen wesentlichen Schritt im Lebenszyklus jedes umhüllten Virus darstellt.



Abb. 6-3 Struktur des Klasse I Fusionsproteins Hämagglutinin in seiner prä- (links, PDB: 2HMG) und post-fusionogenen (rechts, PDB: 1QU1) Form. Die Strukturen sind so ausgerichtet, dass die im Virus verankerte Domäne unten ist. Das Protein ist ein Trimer (nur das Monomer ist gezeigt) und besteht aus zwei Domänen (nur die HA2-Domäne ist gezeigt). Die Sekundärstrukturen sind folgendermaßen eingefärbt: α -Helix – orangerot, β -Faltblatt – blau, unbestimmt – grau, die untersuchte Fusionspeptidsequenz (FP) – grün. Bei der postfusionogenen Form ist das FP nicht zu sehen, es grenzt an den violett markierten Bereich. Die Abbildungen sind mit der Software Chimera 1.10.2 angefertigt.

In dieser Arbeit wurden Fusionspeptide aus viralen Fusionsproteinen der Klasse I und Klasse II ausgewählt. Zusätzlich wurde ein Kontrollpeptid untersucht, welches als Referenz gelten sollte, da für dieses keine fusiogene Wirkung bekannt ist. Das verwendete Fusionspeptid aus dem Influenzavirus Hämagglutinin-Fusionsprotein (Klasse I) (Abb. 6-3), bezeichnet als HA2-FP, weist die Sequenz GLFGAIAGFIENGWEGMIDG [118] auf. Zu dieser Klasse gehörende Proteine weisen eine hohe Anzahl an α -helicalen Strukturen auf, und die Fusionspeptidsequenz

befindet sich am N-terminalen Ende des Proteins (Abb. 6-3). Die verwendete Fusionsschleife des Hüllglycoproteins E (Klasse II) (Abb. 6-4), die als TBEV-FP bezeichnet wird, hat die Sequenz DRGWGNHCGLFGKG [119]. Diese Klasse weist eine hohe Anzahl von β -Faltblatt Strukturen auf und das Fusionspeptid befindet sich innerhalb einer Schleife zwischen zwei Faltblättern (Abb. 6-4). Als Kontrollpeptid wurde eine Sequenz aus 16 Leucin-Aminosäuren (L-16) verwendet, da es dafür bekannt ist keine Membranfusion einzuleiten [120]. In allen Fällen wurde der Peptidsequenz die Sequenz GCGKKK hinzugefügt um die Löslichkeit der ansonsten hydrophoben Sequenzen zu erhöhen [118, 121]. Alle Fusionspeptide wurden bei $\text{pH} = 5$ analysiert, da sie von Viren stammen, die durch Endozytose in die Zellen gelangen; das heißt, sie induzieren die Fusion in der Endosomen-Umgebung mit niedrigem pH-Wert.



Abb. 6-4 Struktur des Klasse II Fusionsproteins Hüllglycoprotein E in seiner prä- (links, PDB: 1SVB) und post-fusionogenen (rechts, PDB: 1URZ) Form. Die Strukturen sind so ausgerichtet, dass die im Virus verankerte Domäne unten ist. Das Protein ist ein Trimer (nur das Monomer ist gezeigt). Die Sekundärstrukturen sind folgendermaßen eingefärbt: α -Helix – orangerot, β -Faltblatt – blau, unbestimmt – grau, die untersuchte Fusionspeptidsequenz (FP) – grün. Die Abbildungen sind mit der Software Chimera 1.10.2 angefertigt.

Das Modell

In dieser Studie werden die Phasendiagramme von MO-Wasser in Abwesenheit und Anwesenheit von HA2-FP, TBEV-FP und L-16, die unter Verwendung der Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) als Funktion von Temperatur und Druck bei begrenzter Hydratation (17 Gew.-%) [28, 104] erhalten wurden, als Ausgangspunkt verwendet. Mithilfe von SAXS kann die Lipidphasenidentität durch charakteristische Muster der Bragg-Reflexe offenbart werden. Entsprechende Messungen wurden von Christoph Jeworrek während seiner Promotion durchgeführt [28]. Aus zahlreichen Druckmessungen bei bestimmten Temperaturen wurden die Druck-Temperatur-

Phasendiagramme von MO bei limitierter Hydratation in Abwesenheit und Gegenwart der beiden Fusionspeptide, sowie L-16 erstellt (Abb. 6-5). Die hier gezeigten Diagramme sind eine vereinfachte graphische Zusammenfassung der von Christoph Jeworrek durchgeführten Messungen [28].

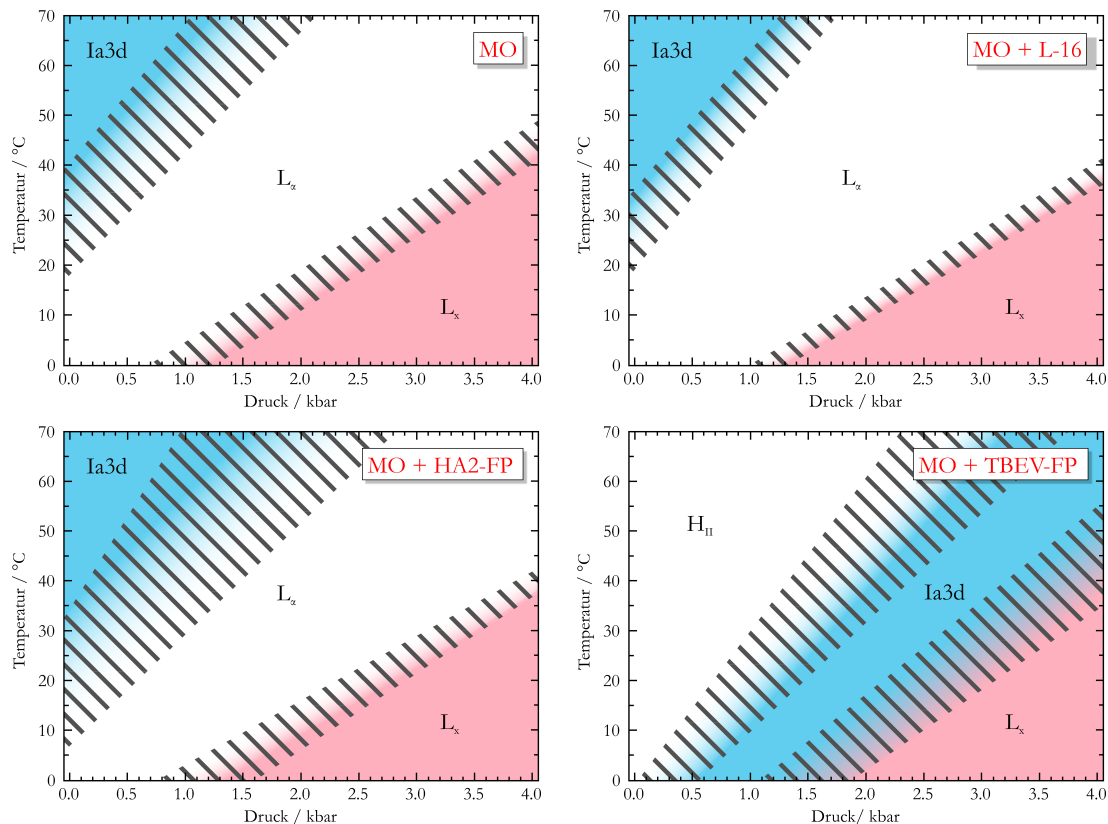


Abb. 6-5 Phasendiagramme von MO, MO + L-16, MO + HA2-FP und MO + TBEV-FP bei limitierter Hydratation (17 Gew.-%) als Funktion von Temperatur T und Druck p . Die Peptide wurden jeweils in der Menge von 2 Gew.-% hinzugegeben. Die schraffierten Bereiche deuten die beobachtete Phasenkoexistenz an. Die Abbildung wurde aus [104] entnommen.

Für MO ohne Fusionspeptide wird die inverse kubische Phase bei hohen Temperaturen und niedrigen Drücken beobachtet. Die Lipidketten haben hier ein großes Volumen, und eine negative Krümmung der MO-Monoschicht wird induziert. Bei höheren Drücken und niedrigeren Temperaturen wird die L_α -Phase induziert, wobei die Lipidketten ein kleineres Volumen einnehmen, welches für eine Null-Krümmung geeignet ist. Eine weitere, als L_x bezeichnete lamellare Phase bildet sich bei noch höheren Drücken und niedrigeren Temperaturen. Diese stellt eine nicht genauer definierte lamellare Phase dar, die sich von der L_α -Phase unterscheidet. Die Zugabe von 2 Gew.-% des Kontrollpeptids, ändert nichts am Phasenverhalten des Lipids. Zwar erscheinen die Koexistenz-Bereiche in den Phasendiagrammen etwas schmaler, doch liegt die Veränderung im Rahmen des statistischen Fehlers der verwendeten Methoden. Nach Zugabe

von 2 Gew.-% des Fusionspeptids HA2-FP ändert sich das Phasenverhalten von MO nur geringfügig. Die Phasen Q_{II} (Ia3d), L_{α} und L_x sind bei nahezu gleichen Temperaturen und Drücken zu finden. Es kann jedoch eine Verbreiterung des Q_{II} (Ia3d) – L_{α} -Koexistenz-Bereichs zu höheren Drücken und niedrigeren Temperaturen beobachtet werden. Dies deutet auf eine Stabilisierung der Q_{II} -Phase hin, welche eine negative GAUßSCHE Krümmung aufweist. Im Gegensatz dazu ist das Phasendiagramm von MO bei limitierter Hydratation nach Zugabe von 2 Gew.-% TBEV-FP sehr verändert. Es kann die H_{II} -Phase mit einer relativ großen negativen Krümmung, die sonst nur bei sehr hohen Temperaturen auftaucht, beobachtet werden. Mit steigendem Druck kommt es zur Bildung der Q_{II} -Phase, welche eine mittelgroße negative Krümmung zeigt, und schließlich der L_x -Phase, in der sich die Ketten in *all-trans*-Konformation befinden und dicht gepackt sind. Die L_{α} -Phase entfällt zwar, dennoch kann die allgemeine Phasenfolge der Lipide mit steigendem Druck: $H_{II} \rightarrow Q_{II} \rightarrow L_{\alpha} \rightarrow L_x$ beobachtet werden. Die Zugabe von Fusionspeptiden bewirkt also eine Verschiebung der Phasenübergänge zu höheren Drücken und niedrigeren Temperaturen.

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit der es möglich war, FTIR-Messungen am bereits charakterisierten System durchzuführen. Die begleitenden Sekundärstrukturen der in die MO-Membranen eingebauten Fusionspeptide wurden durch Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) unter Verwendung der Diamant-Stempel-Technik bestimmt, und die erhaltenen Ergebnisse werden ausführlich diskutiert.



6.2 Präparation

Die Fusionspeptide HA2-FP und TBEV-FP, sowie das Kontrollpeptid L-16 wurden vom Deutschen Krebsforschungszentrum und von Centic Biotec, Heidelberg, Deutschland, erhalten. Sie wurden mit einem freien C-Terminus und einem ungeschützten N-Terminus synthetisiert. Die Peptidreinheiten wurden massenspektrometrisch überprüft und waren für alle Proben $\geq 90\%$. Sie sind laut Hersteller frei von TFA. Monoolein (MO, 1-Oleoyl-rac-glycerol, Kat.-Nr. M7765) und D_2O wurden von Sigma-Aldrich erhalten. Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) und Chloroform wurden von Merck Millipore erhalten.

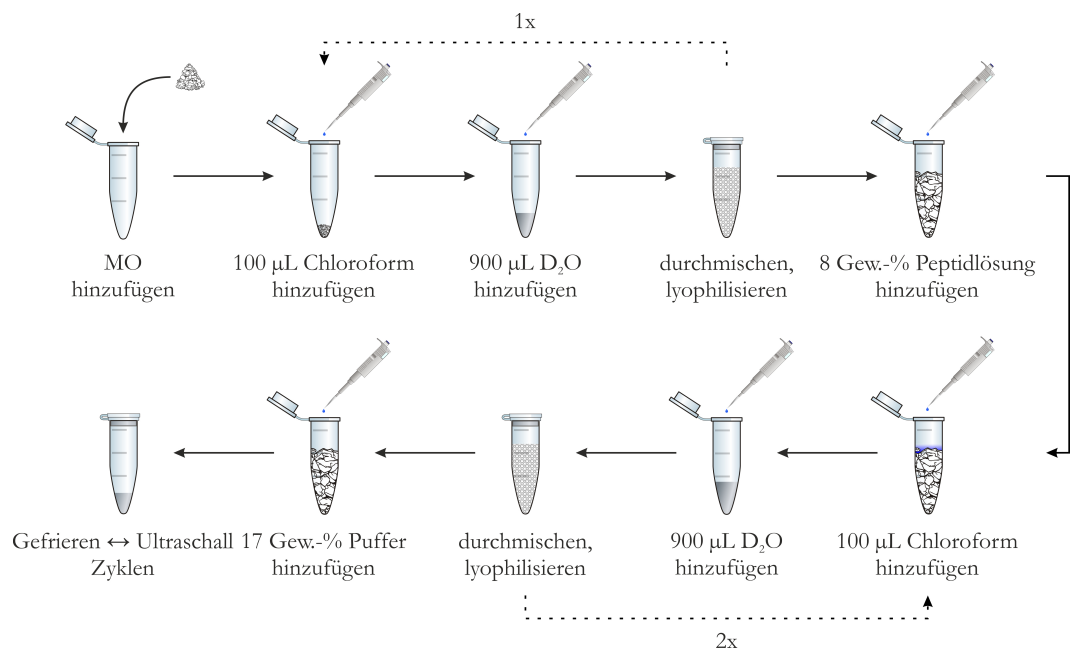


Abb. 6-6 Finales Präparationsschema zur Vorbereitung der Proben für die FTIR-Messungen.

Die Handhabung der MO-Proben bei limitiertem D_2O -Gehalt ist sehr schwierig. Die größten Herausforderungen sind dabei die Herstellung einer homogenen Probe und die Stabilität des D_2O -Gehaltes während der Messung. Es musste also zunächst ein Präparationszyklus (Abb. 6-6) entwickelt werden, der die Reproduzierbarkeit der Messungen gewährleistet. Zusätzlich wurde ein H/D-Austausch eingebunden, der für die Verwendung der Proben für FTIR notwendig ist. Zunächst wurden ca. 20 mg von MO eingewogen und in 100 μ L Chloroform gelöst. Anschließend wurden 900 μ L D_2O hinzugegeben und gut durchgemischt, sodass eine Suspension entstanden ist. Diese Mischung wurde verschlossen und für 30 min bei 40 $^{\circ}$ C im Ultraschallbad gelassen. Anschließend wurde wieder gut durchgemischt und über Nacht gefriergetrocknet (lyophilisiert). Dabei wird eine in flüssigem Stickstoff gefrorene Probe bei -4 $^{\circ}$ C und Vakuum gelagert, sodass

das Lösungsmittel komplett sublimiert und nur noch MO übrig bleibt. Dieser Vorgang wurde wiederholt um einen höheren Grad des H/D-Austausches zu erreichen. Zu dem lyophilisierten MO wurde die entsprechende Peptidlösung hinzugegeben. Die Menge wurde volumetrisch angepasst, sodass am Ende 8 Gew.-% der eingewogenen MO-Menge im Eppendorfgeläß waren. Die Probe wurde wiederum in 100 μL Chloroform aufgenommen und mit 900 μL D_2O verdünnt. Eine gute Durchmischung sollte anschließend sicherstellen, dass das Peptid möglichst gut in der Probe verteilt wird. Die erhaltene Emulsion wurde über Nacht gefriergetrocknet. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Am Ende wurde ein Feststoff aus MO und Peptid erhalten, welcher ein großes Volumen und eine gute Durchmischung aufwies. Abschließend wurden zu der Probe 17 Gew.-% Puffer (bezogen auf MO und Peptid) hinzugegeben und zahlreiche Gefrier-Ultraschall-Zyklen von je 45 min durchgeführt. Mit diesem Vorgehen konnte sichergestellt werden, dass das Peptid und der Puffer möglichst gut im MO verteilt werden, was eine homogene gelartige Probe liefert.

Die Peptid-Lösungen wurden als eine 0.025 mg mL^{-1} -DMSO-Lösung angesetzt, da aufgrund der hohen Hydrophobizität die Löslichkeit der Peptide in D_2O unzureichend gewesen ist. Dabei ist anzumerken, dass vor allem L-16 sich in D_2O sehr schlecht und selbst in DMSO nur schwer lösen lies.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

Während sich viele Studien mit dem Phasenverhalten von Lipiden mit hinzugefügten Fusionspeptiden befassen, ist über die Begleitstrukturen der Peptide wenig bekannt. Insbesondere ist es unklar, ob sich die Strukturen beim Durchlaufen von Lipidphasenübergängen ändern, beispielsweise dem lamellar-kubischen Übergang. Darüber hinaus ist der molekulare Ursprung der Förderung der Lipidmembrankrümmung durch Fusionspeptide nicht vollständig verstanden. Um diese Probleme zu lösen, wurde hier das temperatur- und druckabhängige Phasenverhalten von Monoolein (MO) bei begrenzter Hydratation in Abwesenheit und dem Vorhandensein von zwei verschiedenen Fusionspeptiden untersucht.

Charakterisierung von Monoolein

Nachdem ein Präparationszyklus erfolgreich entwickelt werden konnte, welcher reproduzierbare Ergebnisse lieferte, galt es nun die Stabilität des D₂O-Gehaltes in den MO-Proben zu überprüfen. Hierfür wurden Proben mit vier D₂O-Gehalten (0, 17, 27, 37 Gew.-%) angesetzt und in der Transmissionszelle (Abb. 2-16) temperaturabhängig vermessen. Hierbei ergab sich eine neue Herausforderung bei der Handhabung von Lipidproben bei limitierter Hydratation.

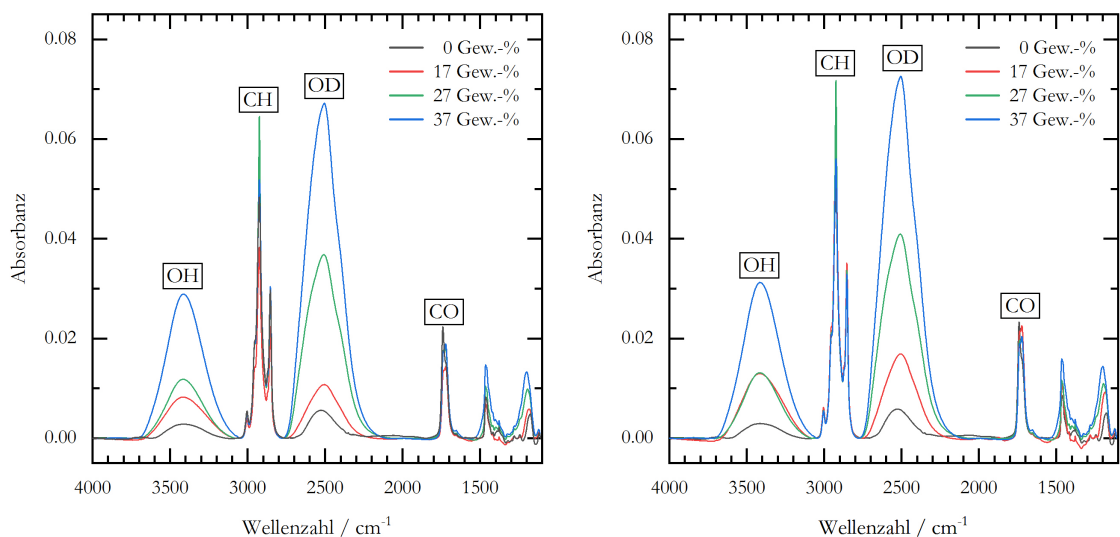


Abb. 6-7 Beispielhafte Darstellung der prozessierten FTIR-Spektren bei 25 °C und verschiedenen D₂O-Gehalten. Es wurde eine benutzerdefinierte Basislinie gezogen, indem linear zwischen den Peaks interpoliert wurde. In der rechten Abbildung wurden die Spektren außerdem auf die Fläche der C=O-Streckschwingung bei 1700 cm⁻¹ normiert.

Aufgrund der hohen Konzentration des Lipids, bei nur 17 Gew.-% D₂O-Anteil, ist die Transmission der Probe so niedrig, dass kein auswertbares Signal bei Verwendung der herkömmlichen Zelle am Detektor ankommt. Viele Ansätze wurden getestet, und als Methode der Wahl hat sich folgende behauptet: Die Probe muss direkt auf die Quarz-Fenster aufgebracht und ohne eine Abstandsfolie vorsichtig zwischen den Fenstern gespreitet werden, indem diese gegeneinander geschraubt werden. Zwar werden so akzeptable Intensitäten erhalten, doch sind nun die Schichtdicken nicht zwangsläufig konstant, was eine Normierung erfordert. Da die Proben allerdings homogen sind und die C=O-Streckschwingungen (1741 und 1730 cm⁻¹) ausschließlich vom MO stammen, wurde das gesamte Spektrum auf dessen Flächen normiert.

Auffällig ist, dass nach der Normierung die C-H-Streckschwingungen von MO (ca. 2900 cm⁻¹) für alle Messungen ebenfalls nahezu Deckungsgleich sind. Die O-D-Streckschwingungsbande (2500 cm⁻¹) steigt mit zunehmendem D₂O-Gehalt. Die O-H-Streckschwingungsbande der reinen MO-Messung gibt den Anteil der nicht ausgetauschten H-Atome an und ist für 17 und 27 Gew.-% gleich groß. Dies spricht dafür, dass der Präparationszyklus sehr gut geeignet ist, da anscheinend der maximal mögliche Anteil an H-Atomen gegen D-Atome ausgetauscht wird und die Probe homogen ist. Bei 37 Gew.-% D₂O-Gehalt steigt die O-H-Bande an, was zu erwarten war, da bei einem so hohen D₂O-Gehalt das System im D₂O-Überschuss (Abb. 6-2) vorliegt. Die objektive Betrachtung der Messkurven macht deutlich, dass sowohl die Präparation als auch die Prozessierung der erhaltenen Daten sinnvoll ist und keine Widersprüche liefert. Dennoch ist es so, dass aufgrund der fehlenden Abstandsfolie ein quasi offenes System vermessen wird, was sowohl dazu führen kann, dass die Probe austrocknet als auch, dass sie Luftfeuchtigkeit aufnehmen kann. Beide Prozesse sind sowohl zeit- als auch temperaturabhängig. Auf die explizite Messung der Zeitabhängigkeit wurde verzichtet, da eine Temperaturmessreihe ca. drei Stunden dauert. Somit sollte ein zeitabhängiger Effekt, falls vorhanden, auch in der Temperaturmessung sichtbar sein.

Da während der Präparation und Messung ein H/D-Austausch stattfindet und ein Teil der O-H- und O-D-Schwingungsbanden zum MO und nicht zum Lösungsmittel gehören, ist es nicht möglich, aus den FTIR-Spektren direkt den Wassergehalt abzulesen. Zu diesem Zweck wurde ein Hydratationsfaktor eingeführt, welcher ein Maß für den Wassergehalt ist und die Spektren der verschiedenen *T*- und *p*-abhängigen Messreihen in Relation setzt. Zusätzlich ist es bei FTIR-Messungen möglich, dass der Detektor aufheizt und eine andere Intensität liefert. Auch kann sich die Schichtdicke der Probe während der Messung ändern, da keine Abstandsfolie verwendet wurde. Alle diese Beiträge werden im Hydratationsfaktor berücksichtigt:

$$\text{Hydratationsfaktor} = \frac{(A_{\text{OH}} + A_{\text{OD}}) \cdot \chi_{\text{Puffer}}}{A_{\text{CH}}} \quad (6-2)$$

Dabei ist A_i die Fläche der korrespondierenden Bande i mit der Nomenklatur wie in Abb. 6-7 gekennzeichnet und χ_{Puffer} der angesetzte Pufferanteil in der entsprechenden Probe. Es wird also der Anteil des Lösungsmittels an den beiden Schwingungsbanden O-H und O-D berechnet und auf die Schwingungsbanden von MO normiert, um alle Artefakte der Apparatur zu eliminieren. Jeweils fünf Messreihen wurden durchgeführt, indem von 20 °C auf 65 °C geheizt worden ist, und der Hydratationsfaktor wurde gegen die Temperatur aufgetragen (Abb. 6-8).

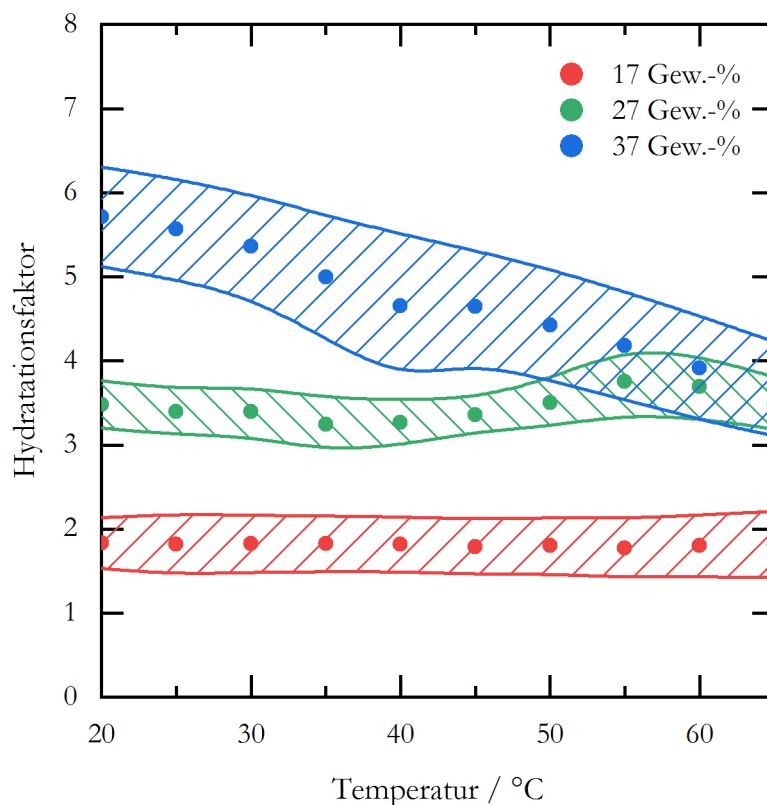


Abb. 6-8 Verlauf des Hydratationsfaktors der vermessenen MO-Proben mit steigender Temperatur. Die schraffierten Bereiche geben den Fehlerbereich an, welcher aus 5 Messreihen bestimmt worden ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Präparation trotz der schwierigen Handhabung der Proben reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse liefert, wobei der Lösungsmittelgehalt auf ± 2 Gew.-% genau eingestellt werden kann. Die erhaltenen Proben sind homogen und der Lösungsmittelgehalt ist bei 17 Gew.-% bis 65 °C stabil. Da im Folgenden hauptsächlich Druckmessungen durchgeführt werden und zusätzlich Peptide eingelagert werden, wurden auch diese beiden Faktoren untersucht. Als Testpeptid wurde Lysozym verwendet, da es verhältnismäßig

klein ist, eine bekannte Struktur besitzt und nicht dafür bekannt ist einen Einfluss auf Membranen zu haben. Zur Druckbestimmung wurde in dieser Arbeit α -Quarz verwendet [27]. Dabei kann der Druck direkt aus der Position einer charakteristischen Bande abgelesen werden als

$$p / \text{kbar} = 1.2062 \cdot (\Delta\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}) + 0.015054 \cdot (\Delta\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1})^2. \quad (6-3)$$

Zwar eignet sich das üblicherweise verwendete BaSO_4 besser, um Drücke bei FTIR-Messungen zu bestimmen, doch hat es hygroskopische Eigenschaften, was es bei einem System mit limitiertem Wassergehalt unbrauchbar macht. Wie in Abbildung Abb. 6-9 zu sehen, ändert sich die Form der C=O-Bande und somit die Hydratisierung der Kopfgruppen und die Phase, in der sich das Lipid befindet, zwar bei Hinzugabe des Lösungsmittels, allerdings nicht bei Hinzugabe des Proteins und α -Quarz. Auffällig sind die beiden kleinen Banden die im untersuchten Bereich auftauchen: die C=C-Streckschwingung von MO bei ca. 1655 cm^{-1} und eine α -Quarz-Schwingung bei ca. 1580 cm^{-1} . Auf deren Bedeutung und Behandlung wird zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen werden.

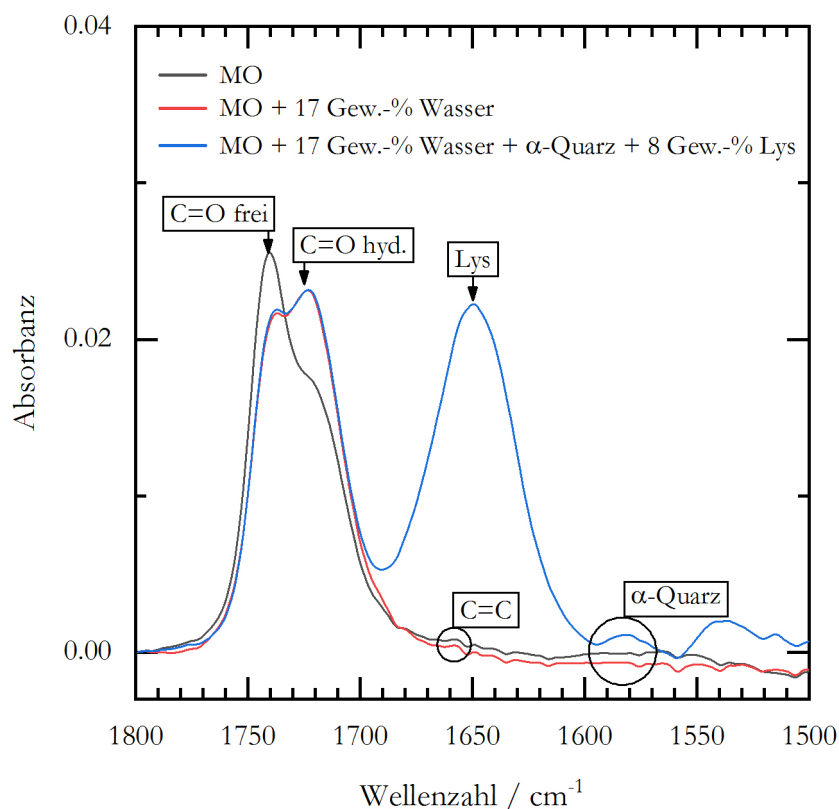


Abb. 6-9 Darstellung der auf die C=O-Schwingung normierten FTIR-Spektren im Bereich 1800 – 1500 cm^{-1} . Die später relevanten Banden sind markiert.

Prozessierung der Spektren

Im Gegensatz zur herkömmlichen Transmissionszelle (Abb. 2-16) wo im Strahlendurchgang sich lediglich die Probe und die Quarzfenster befinden, ist der Aufbau der Diamantstempel-Zelle (Abb. 2-17) komplizierter. Wird das System in der Diamantstempel-Zelle vermessen, so taucht eine große Bande bei 2100 cm^{-1} auf (Abb. 6-10, links). Somit befindet sich die C=O-Streckschwingung und der Amid I'-Bereich auf deren Flanke. Dies erschwert die Interpretation und Auswertung der Daten erheblich. Um diesen Untergrund möglichst vollständig entfernen zu können, wurde eine individuelle Polynomfunktion fünften Grades für jedes einzelne Spektrum berechnet, mit Fixpunkten bei 1925 , 1800 , 1600 und 1500 cm^{-1} (Abb. 6-10, mittig). Nach der Subtraktion wurde eine aufgereinigte C=O-Streckschwingungsbande mit einem relativ sauberen Amid I'-Bereich erhalten (Abb. 6-10, rechts). Trotz einer sorgfältigen und sehr aufwendigen Behandlung der Daten ist es nicht möglich, den Untergrund vollständig zu subtrahieren, was stets im Hinterkopf behalten werden sollte. Dies führt zum einen dazu, dass eine erhöhte Konzentration von 8 Gew.-% an Peptid verwendet werden musste, und zum anderen, dass eine quantitative Sekundärstrukturanalyse mithilfe der FTIR-Methode nicht mehr möglich ist, da jedes Spektrum vom übrigbleibenden Untergrund verzerrt wird.

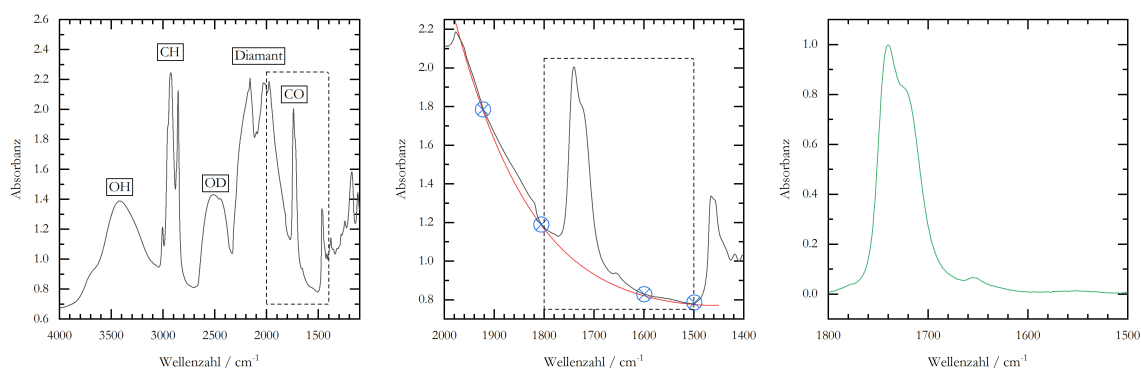


Abb. 6-10 Beispielhafte Darstellung der Vorgehensweise der Untergrundsubtraktion. *Links:* Das rohe unprozessierte Spektrum von MO + 17 Gew.-% D_2O . Im Vergleich dazu ist das Spektrum der Transmissionszelle in Abb. 6-7 zu sehen. *Mitte:* Ausschnitt der auf der Diamant-Flanke liegenden C=O-Streckschwingung mit der verwendeten Polynom-Anpassung und den Fixierungspunkten. *Rechts:* Ausschnitt der C=O Streckschwingung und des Amid I'-Bereichs nach Untergrundsubtraktion.

Monolein als Referenz

Nachdem das System charakterisiert worden ist, wurden druckabhängige FTIR-Messungen von MO bei zwei Temperaturen (25 und $40\text{ }^\circ\text{C}$) durchgeführt. In Abb. 6-11 sind die druckabhängigen FTIR-Spektren von MO bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ gezeigt. Die Spektren der linken Abbildung wurden, wie

zuvor beschrieben, erhalten und zeigen die C=O-Streckschwingungen (1750 cm^{-1}) von MO, den übrig gebliebenen Untergrund ($1700 - 1500\text{ cm}^{-1}$) und die C=C-Streckschwingung (1655 cm^{-1}) von MO. Die C=O-Streckschwingung von MO hat zwei Komponenten: die nicht hydratisierten C=O-Gruppen liefern die Bande bei höherer Wellenzahl (ca. 1741 cm^{-1}) und die hydratisierten die Bande bei niedrigerer Wellenzahl (1721 cm^{-1}) [122]. Bei Erhöhung des Drucks kann ein Phasenübergang zwischen 800 und 1800 bar beobachtet werden. Dieser zeigt sich vor allem dadurch, dass die Halbwertsbreite der C=O Streckschwingung drastisch sinkt (Abb. 6-11, links). Simultan verschiebt sich auch die Position der C=C- (Abb. 6-11, rechts) und der hydratisierten C=O-Streckschwingung (Abb. 6-11, links) zu größeren Wellenzahlen. Der Übergang breiter Banden zu scharfen Peaks resultiert aus der Korrelationsfeldaufspaltung [122] und ist ein eindeutiges Zeichen für die Bildung von kristallinen Strukturen. Da die C=O-Bande weit in den Amid I'-Bereich ($1700 - 1600\text{ cm}^{-1}$) hineinragt und bei zukünftigen Messungen die Interpretation der Peptidstrukturen erschwert, wurde diese mit zwei Voigt-Funktionen angepasst und subtrahiert (Abb. 9-5). Trotz einer aufwendigen Behandlung der Daten bleibt auch hier weiterhin ein ungleichmäßiger Untergrund übrig (Abb. 6-11, mittig), was bei der Interpretation weiterer Messungen berücksichtigt werden sollte.

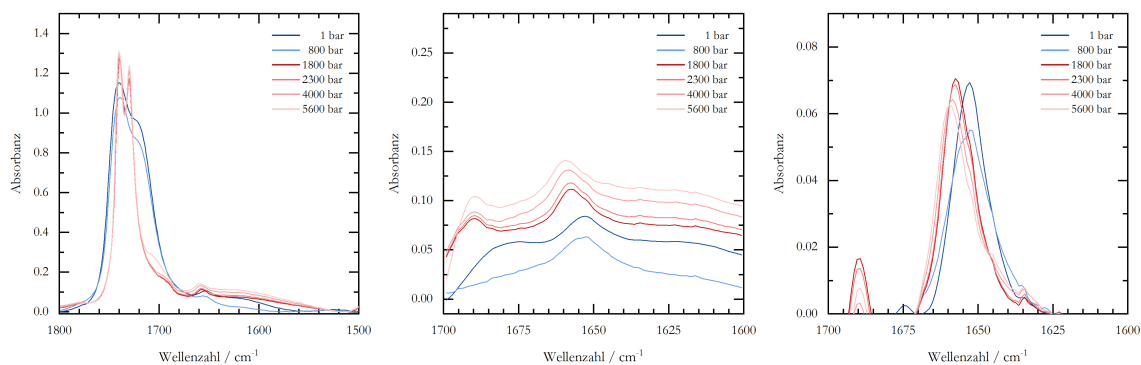


Abb. 6-11 Beispielhafte druckabhängige FTIR-Spektren von MO bei 25 °C mit den zwei weiteren Prozessierungsschritten, um den Amid I'-Bereich zu erhalten. *Links*: prozessierte Spektren von MO, der Untergrund der Zelle wurde abgezogen; *Mitte*: übrig gebliebener Amid I'-Bereich nach der Subtraktion der C=O-Streckschwingungen, wie in Abb. 9-5 gezeigt; *Rechts*: C=C-Streckschwingung nach Basislinienkorrektur und Normierung der Fläche.

Es wurde schnell festgestellt, dass Messreihen bei 25 °C nicht besonders sinnvoll sind. Zum einen scheint der Bereich der L_{α}/Q_{II} -Phasenkoexistenz hier breiter zu sein, als in Abb. 6-2 dargestellt, was dazu führt, dass die Proben mal in der Q_{II} -Phase, mal in der L_{α} -Phase oder in einer Mischphase bei 25 °C und 1 bar vorliegen. Dies führt dazu, dass ein Großteil der Messungen,

wie in Abb. 6-11 gezeigt, lediglich einen Übergang von L_α nach L_c zeigen. Dieser ist aber weder für das Modell der Membranfusion, noch biologisch relevant.

Die Messungen bei 40 °C haben hingegen vielversprechendere Ergebnisse geliefert, weswegen die restlichen Messreihen mit eingebautem Peptid ausschließlich bei 40 °C durchgeführt worden sind. Die entsprechenden FTIR-Spektren von MO bei limitierter Hydratation und 40 °C als Funktion des Drucks sind in Abb. 6-12 zu sehen. Mit Erhöhung des Drucks wird ein starker Abfall der Intensität der C=O-Streckschwingung bei ca. 3000 bar beobachtet (Abb. 6-12, links). Diese Änderung ist konsistent mit den Ergebnissen der SAXS-Messungen (Abb. 6-5) und entspricht dem $L_\alpha \rightarrow L_x$ Phasenübergang, wo die ungeordneten Kohlenwasserstoffketten von MO eine geordnete Konformation annehmen und die Packung der Lipidkopfgruppen erhöht ist. Die Korrelationsfeldaufspaltung der C=O-Bande, wie bei 25 °C beobachtet, konnte hier bis 10 000 bar nicht beobachtet werden, womit die Bildung einer L_c -Phase ausgeschlossen werden kann. Darüber hinaus zeigt auch die Verschiebung der C=C-Streckschwingung (Abb. 6-12, rechts) zu kleineren Wellenzahlen den Phasenübergang an. Bemerkenswerterweise zeigt weder die C=O-, noch die C=C-Streckschwingung eine Änderung beim Durchlaufen des Phasenübergangs $Q_{II} \rightarrow L_\alpha$, welcher bei 40 °C und 500 bar beobachtet wurde (Abb. 6-5). Dies kann dadurch erklärt werden, dass das Durchlaufen solcher fluid-fluid-Phasenübergänge nur geringe Konformationsänderungen der Lipide beinhaltet und somit durch FTIR-Spektroskopie kaum nachweisbar ist [122].

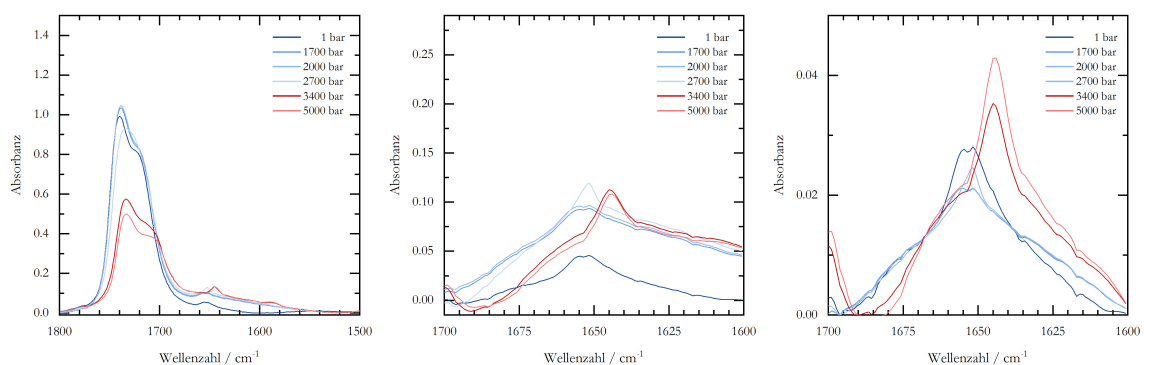


Abb. 6-12 Beispielhafte druckabhängige FTIR-Spektren von MO bei 40 °C mit den zwei weiteren Prozessierungsschritten, um den Amid I'-Bereich zu erhalten. *Links*: prozessierte Spektren von MO, der Untergrund der Zelle wurde abgezogen; *Mitte*: übrig gebliebener Amid I'-Bereich nach der Subtraktion der C=O-Streckschwingungen, wie in Abb. 9-5 gezeigt; *Rechts*: C=C-Streckschwingung nach Basislinienkorrektur und Normierung der Fläche.

Charakterisierung der Fusionspeptide

Bevor die untersuchten Peptide in die Monoolein-Modellmembran eingebaut worden sind, wurde zunächst eine Charakterisierung dieser in Lösung durchgeführt, um eine Referenz zu erhalten. Es wurden die drei folgenden Peptidsequenzen untersucht:

- L-16 LLLLLLLLLLLLLLLLLLW GCGKKKK (Kontrolle)
- HA-FP GLFGAIAGFIENGWEGMIDG GCGKKKK (Klasse I)
- TBEV-FP DRGWGNHCGLFGKG GCGKKKK (Klasse II)

Im ersten Schritt wurde eine *de novo*-Peptidstrukturvorhersage durchgeführt. Hierfür wurde das Onlineprogramm „PEP-FOLD 3.5“ von RPBS der Universität Paris verwendet [123, 124]. Dieses basiert auf dem Konzept des strukturellen Alphabets [125], d.h. einem Ensemble elementarer Prototyp-Konformationen, die die gesamte Vielfalt der Proteinstrukturen beschreiben können. Die SA-HMM (*hidden Markov model structural alphabet*) Buchstaben werden durch einen verbesserten GREEDY-Algorithmus [126] zusammengestellt. In PEP-FOLD 3 wurde dieser Algorithmus durch einen HMM-Suboptimierungsalgorithmus, wie den Vorwärts-Rückverfolgungsalgorithmus oder einen Tabu-Sampling-Algorithmus, abgelöst [127]. Die Energien werden dabei mithilfe eines optimierten Potenzials für eine effiziente Strukturvorhersage (OPEP) berechnet [128]. In der Praxis funktioniert es so, dass die Primärstruktur eines Peptids vorgegeben wird, und das Programm liefert eine Auswahl an wahrscheinlichsten Strukturen (Abb. 6-13), sowie eine komplette Wahrscheinlichkeitsmatrix (Abb. 9-6). Die Berechnungen wurden vom Programm auf der Grundlage einer pH-neutralen wässrigen Lösung durchgeführt.

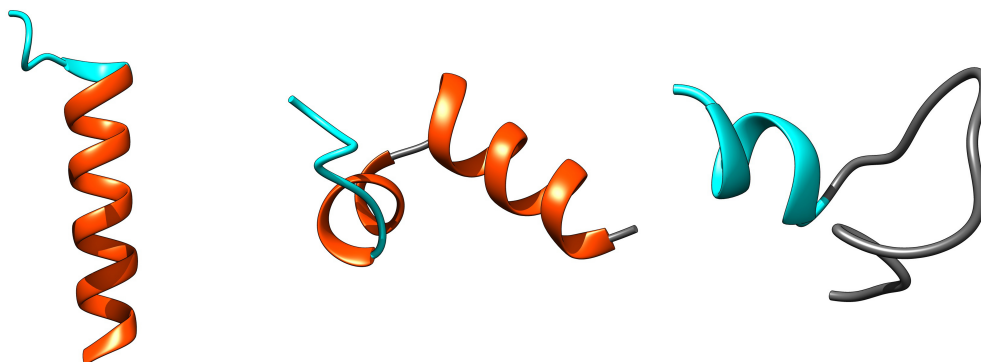


Abb. 6-13 Die von PEP-FOLD als am wahrscheinlichsten berechneten Strukturen der verwendeten Peptidsequenzen. *Links:* L-16, *Mitte:* HA2-FP, *Rechts:* TBEV-FP. Die Sekundärstrukturen sind folgendermaßen eingefärbt: α -Helix – orangerot, unbestimmt – grau, die hinzugefügte Sequenz GCGKKKK wurde unabhängig von der Struktur in cyan eingefärbt. Die Abbildungen sind mit der Software Chimera 1.10.2 angefertigt.

Im zweiten Schritt wurden FTIR-Messungen der reinen Peptid-Lösungen bei pH 5 durchgeführt, weil diese Bedingungen den späteren Messungen entsprechen. Es wurde auch eine Messung in DMSO vorgenommen, weil die Peptide während der Präparation in DMSO gelöst worden sind. Die untergrundkorrigierten Amid I'-Banden sind in Abb. 6-14 zu sehen. Auffällig ist, dass die Spektren in DMSO zu höheren Wellenzahlen verschoben sind. Dies liegt daran, dass das Dipolmoment von DMSO sich signifikant von dem des D₂O unterscheidet. Eine Abschätzung diesbezüglich ist jedoch sehr schwierig, weil es keine Referenzen zu FTIR-Messungen in DMSO gibt. Des Weiteren nehmen die Peptide in DMSO eine andere Struktur ein als in Puffer, was zeigt, dass diese eindeutig in der Lage sind, eine Konformationsänderung einzugehen, wenn sich die Umgebung verändert. Die Intensitäten der Banden sind in DMSO viel höher, was zum Teil am Dipolmoment des Lösungsmittels liegen kann. Den größeren Beitrag stellt aber vermutlich die bessere Löslichkeit der vorwiegend hydrophoben Peptide in DMSO dar. Insbesondere bei L-16 wurde trotz der hinzugefügten Sequenz eine sehr schlechte Löslichkeit in wässriger Lösung beobachtet.

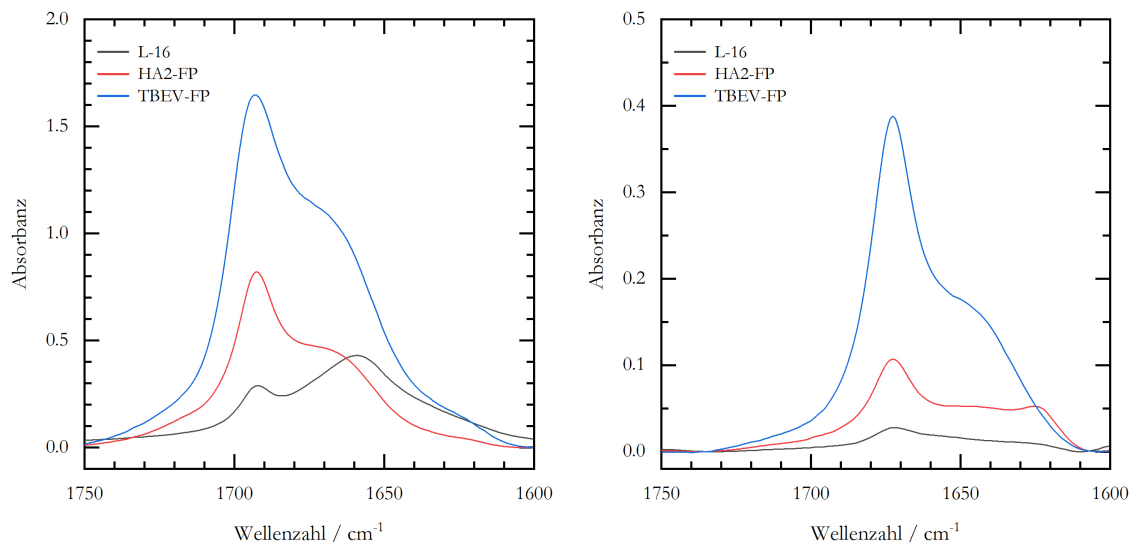


Abb. 6-14 Untergrundkorrigierte Amid I'-Banden der verwendeten Peptide. Es wurden ausschließlich die Peptide ohne Lipid in der Transmissionszelle (Abb. 2-16) vermessen. *Links:* in DMSO, *Rechts:* in Puffer bei pH 5.

Während der Promotion wurde die Bachelorarbeit von Rebekka Vollmers betreut [11]. In dieser wurde eine ausführliche Charakterisierung der verwendeten Fusionspeptide in wässriger Lösung durchgeführt. Die Charakterisierung erfolgte in Abhängigkeit der Temperatur, des Drucks und des pH-Wertes. Auch hier konnte keine gute Löslichkeit von L-16 beobachtet werden, weswegen die Sekundärstrukturanalyse nur für die Fusionspeptide durchgeführt worden

ist. Neben der FTIR-Spektroskopie (Abb. 6-15) wurde ebenfalls die CD-Spektroskopie (Abb. 9-7) verwendet. Die CD-Spektroskopie wurde hierbei lediglich qualitativ ausgewertet, um die bei den FTIR-Messungen gefundene Banden besser zuordnen zu können. Die Bande bei 1673 cm^{-1} wurde TFA zugeordnet und bei der Bestimmung der Sekundärstruktur abgezogen. Obwohl die Peptide vom Hersteller als TFA-frei deklariert worden sind, scheint ein Rest an TFA dennoch vorhanden zu sein. Aus den FTIR-Spektren konnte so die Sekundärstruktur der beiden Fusionspeptide bestimmt werden (Tabelle 6-1). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Struktur der Fusionspeptide in Abhängigkeit der Temperatur (Bereich: $15 - 70\text{ °C}$), des Drucks (Bereich: $1 - 10\ 000\text{ bar}$) und des pH-Wertes (Bereich: $5 - 7$) kaum verändert [11]. Die Ergebnisse der Sekundärstrukturbestimmung sind für alle verwendeten Methoden (FTIR, CD, *de novo* Vorhersage) in guter Übereinstimmung und zeigen, dass die Struktur von HA2-FP durch α -Helices und die von TBEV-FP durch ungeordnete Strukturen dominiert ist.

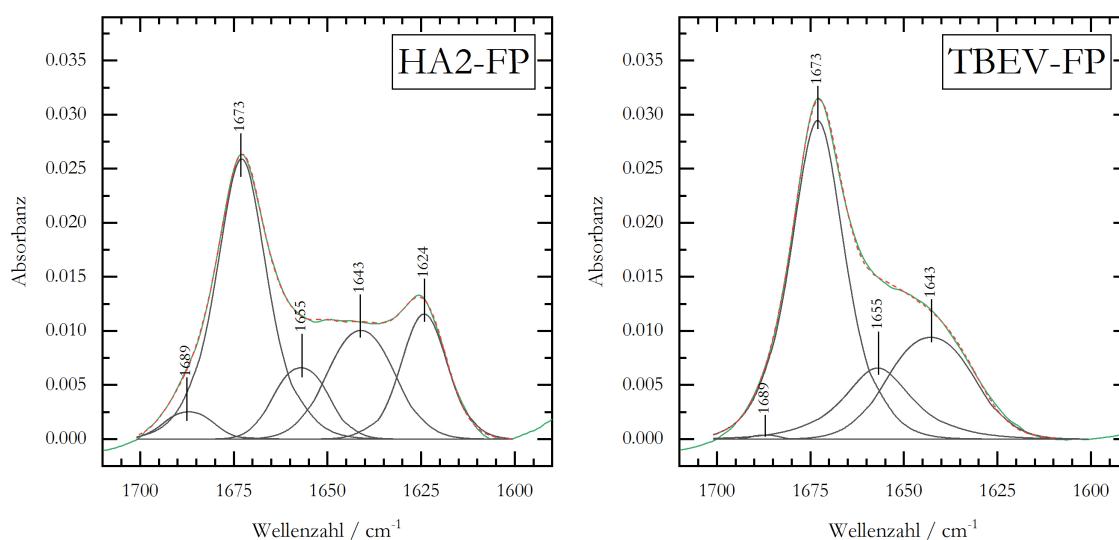


Abb. 6-15 Ausgewählte, prozessierte Spektren der Fusionspeptide bei 25 °C in wässriger Lösung mit den angepassten Subbanden zur Sekundärstrukturbestimmung. Die Messdaten wurden aus der Bachelorarbeit von Rebeka Vollmers [11] entnommen und neu angepasst. Die Bande bei 1673 cm^{-1} wurde für alle Peptide und alle Messungen beobachtet und wurde somit verbliebenem TFA zugeordnet.

Tabelle 6-1 Aus den FTIR-Messungen erhaltene Sekundärstrukturanteile der Fusionspeptide in %.

| Struktur | Schleife 1689 cm^{-1} | α -Helix 1655 cm^{-1} | α -Helix* / Ungeordnet 1643 cm^{-1} | β -Faltblatt 1624 cm^{-1} |
|----------|-----------------------------------|--|--|---|
| HA2-FP | 7 | 21 | 40 | 32 |
| TBEV-FP | 1 | 39 | 61 | 0 |

* Die Bande bei 1643 cm^{-1} wurde, im Einklang mit den CD-Daten, für HA2-FP als exponierte α -Helix interpretiert und für TBEV als ungeordnete Struktur.

Fusionspeptide in Monoolein eingebaut

Wenn L-16 zu MO hinzugefügt wird, ändert sich das Phasenverhalten nicht (Abb. 6-5). Ebenso sind die korrespondierenden FTIR-Spektren identisch (Abb. 6-12 und Abb. 6-16, links). Weder an der Form der C=O-Schwingungsbande, noch im Amid I'-Bereich ist ein signifikanter Unterschied zu beobachten. Auch der Phasenübergang $L_{\alpha} \rightarrow L_{\alpha}$ bei 40 °C findet mit 2500 bar bei einem sehr ähnlichem Druck statt. Im Amid I'-Bereich ist lediglich die C=C-Streckschwingung zu sehen, die, wie bei reinem MO, mit dem Phasenübergang zu kleineren Wellenzahlen verschoben wird. Der fluid-fluid-Übergang $Q_{II}(Ia3d) \rightarrow L_{\alpha}$, kann wie bereits bei reinem MO nicht beobachtet werden.

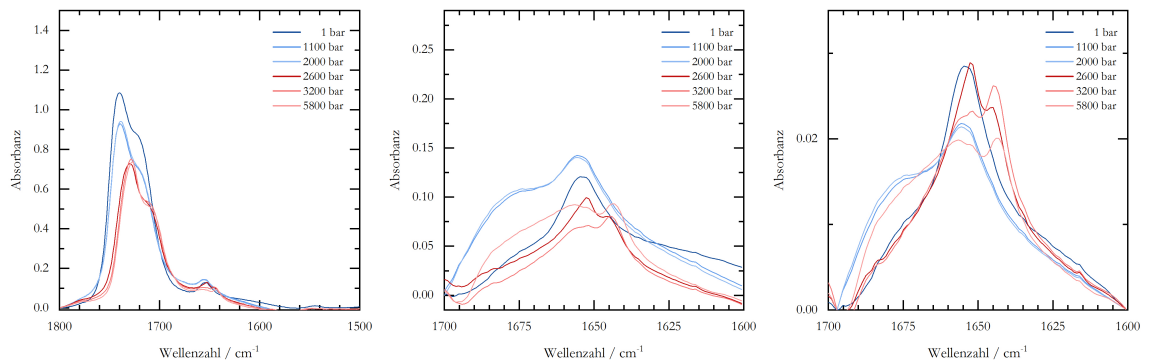


Abb. 6-16 Beispielhafte druckabhängige FTIR-Spektren von MO + L-16 bei 40 °C mit den zwei weiteren Prozessierungsschritten, um den Amid I'-Bereich zu erhalten. *Links:* prozessierte Spektren von MO, der Untergrund der Zelle wurde abgezogen; *Mitte:* übrig gebliebener Amid I'-Bereich nach der Subtraktion der C=O-Streckschwingungen, wie in Abb. 9-5 gezeigt; *Rechts:* Amid I'-Bereich nach Basislinienkorrektur und Normierung der Fläche.

Wenn HA2-FP bei limitierter Hydratation (17 Gew.-% D₂O) zu MO hinzugefügt wird, ändert sich das druck- und temperaturabhängige Phasenverhalten nur geringfügig (Abb. 6-5). Ebenso sind die FTIR-Spektren von MO mit HA2-FP (Abb. 6-17, links) denen von reinem MO (Abb. 6-12, links) sehr ähnlich. Es kann der Phasenübergang $L_{\alpha} \rightarrow L_{\alpha}$ bei 40 °C und ca. 3700 bar durch einen starken Abfall der Intensität der C=O-Bande und eine Verschiebung der Wellenzahl der C=C-Bande beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit dem Phasenübergang im Phasendiagramm von MO + HA2-FP, wie es aus SAXS-Messungen abgeleitet wurde (Abb. 6-5). Eine erhöhte Absorption im Bereich von 1700 cm⁻¹ - 1600 cm⁻¹ im Vergleich zu reinem MO zeigt die Amid I'-Bande von HA2-FP (Abb. 6-17). Im Amid I'-Bereich erscheinen bei 1675 und 1625 cm⁻¹ zwei Peaks, die denen von HA2-FP in wässriger Lösung sehr ähnlich sind (Abb. 6-15). Wie für das reine Lipid bereits beobachtet, ändert sich das die C=O-Bande von MO + HA2-FP beim Durchlaufen des Phasenübergangs $Q_{II}(Ia3d) \rightarrow L_{\alpha}$ nicht, bei dem die

Monoschichtkrümmung stark reduziert wird, aber der fluide Zustand der Lipidmoleküle erhalten bleibt.

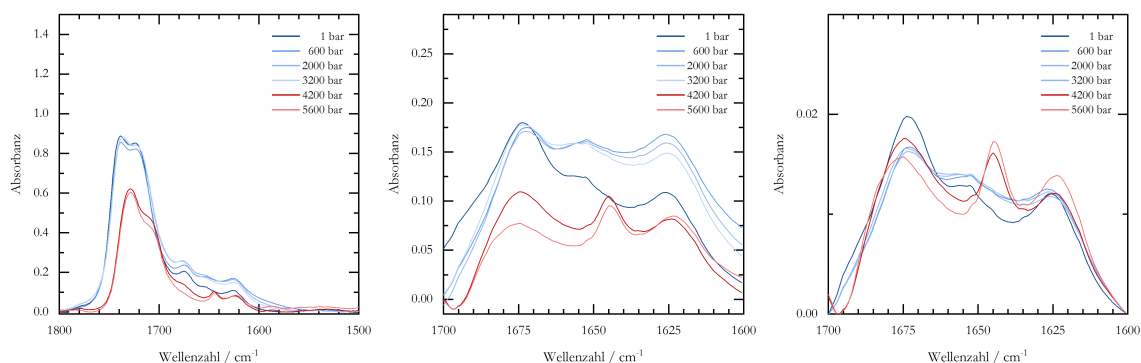


Abb. 6-17 Beispielhafte druckabhängige FTIR-Spektren von MO + HA2-FP bei 40 °C mit den zwei weiteren Prozessierungsschritten, um den Amid I'-Bereich zu erhalten. *Links*: prozessierte Spektren von MO, der Untergrund der Zelle wurde abgezogen; *Mitte*: übrig gebliebener Amid I'-Bereich nach der Subtraktion der C=O-Streckschwingungen, wie in Abb. 9-5 gezeigt; *Rechts*: Amid I'-Bereich nach Basislinienkorrektur und Normierung der Fläche.

Wenn TBEV-FP zu MO hinzugefügt wird, unterscheiden sich die FTIR-Spektren sehr von denen des reinen MO (Abb. 6-12, links und Abb. 6-18), was mit dem großen Unterschied der entsprechenden Phasendiagramme übereinstimmt (Abb. 6-5). Von 1 bis 1500 bar sinkt die Intensität der C=O-Streckschwingungsbande von MO, während bei 2100 bar ein Intensitätsgewinn beobachtet wird, der einen Phasenübergang bei etwa 1800 bar und 40 °C nahelegt (Abb. 6-18, links). Diese Änderung ist in sehr guter Übereinstimmung mit dem in den SAXS-Messungen beobachteten $H_{II} \rightarrow Q_{II}(Ia3d)$ -Übergang (Abb. 6-5).

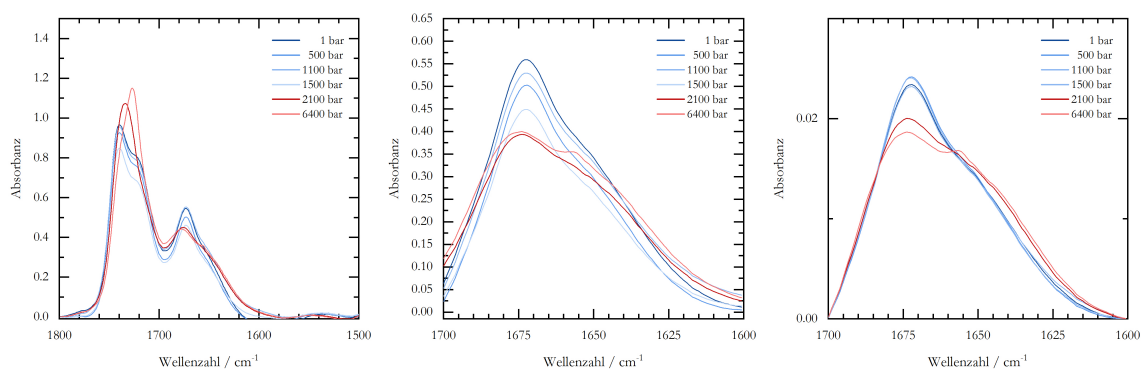


Abb. 6-18 Beispielhafte druckabhängige FTIR-Spektren von MO + TBEV-FP bei 40 °C mit den zwei weiteren Prozessierungsschritten, um den Amid I'-Bereich zu erhalten. *Links*: prozessierte Spektren von MO, der Untergrund der Zelle wurde abgezogen; *Mitte*: übrig gebliebener Amid I'-Bereich nach der Subtraktion der C=O-Streckschwingungen, wie in Abb. 9-5 gezeigt; *Rechts*: Amid I'-Bereich nach Basislinienkorrektur und Normierung der Fläche.

Darüber hinaus steigt die Intensität der Komponente der C=O Streckschwingungsbande bei 1720 cm^{-1} ab 2100 bar an (Abb. 6-18, links), was auf eine höhere Hydratation der MO-Kopfgruppen hinweist. Diese resultiert aus der weniger negativen Monoschichtkrümmung in der $Q_{II}(Ia3d)$ -Phase gegenüber der H_{II} -Phase und somit aus einem größeren Kopfgruppenbereich. Über den gesamten untersuchten Druckbereich bei 40 °C kann eine ausgeprägte Amid I'-Bande mit einem Peak bei 1673 cm^{-1} beobachtet werden (Abb. 6-18). Hier sinkt auch die Intensität bis 1500 bar, aber dieser Rückgang wird wahrscheinlich dadurch verursacht, dass sich die benachbarte C=O-Bande auf die gleiche Weise ändert. Ab 2100 bar ist eine eher konstante Intensität zu beobachten, ansonsten ist jedoch keine deutliche Veränderung des Amid I'-Bereichs erkennbar.

Um die Sekundärstruktur der Fusionspeptide, die mit MO interagieren, weiter zu untersuchen, wurde die C=O-Schwingungsbande, wie zuvor beschreiben subtrahiert (Abb. 9-5). Die erhaltenen Amid I' Banden von L-16, HA2-FP und TBEV-FP sind in den Abb. 6-16, Abb. 6-17 und Abb. 6-18 jeweils mittig dargestellt. In allen Spektren wird ein Peak bei 1673 cm^{-1} beobachtet, der auf eine TFA-Verunreinigung hindeuten könnte (obwohl die Peptide vom Hersteller als TFA-frei markiert wurden), aber es kann auch den Schleifen-Strukturen der Fusionspeptide zugeordnet werden [86]. Darüber hinaus ist die C=C Streckschwingungsbande von MO bei 1655 bzw. 1645 cm^{-1} in allen Spektren sichtbar. Da die Spektren in dieser Form noch schlecht evaluierbar sind, wurde eine weitere Basislinienkorrektur zwischen 1700 und 1600 cm^{-1} vorgenommen und die Flächen in diesem Bereich normiert (jeweils rechts in den Abbildungen). Wie deutlich zu sehen ist, ändert sich jedoch bei L-16 und den beiden Fusionspeptiden die Bandenform des Amids I'-Bereiches, abgesehen von der C=C-Banden-Verschiebung, welche nicht zur Peptidstruktur gehört, mit steigendem Druck kaum. Im Vergleich zu den Fusionspeptiden ist bei L-16 (Abb. 6-16, rechts) auch kein signifikanter Unterschied zu der Bandenform des reinen MO (Abb. 6-12, rechts) zu sehen. Dies kann daran liegen, dass zum einen die erwartete Bande für α -Helices ($1655\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$) sich mit der C=C-Streckschwingung ($1655, 1645\text{ cm}^{-1}$) überlappt, zum anderen wurde bereits bei der Präparation und bei den Transmissionsmessungen des reinen L-16 eine schlechte Löslichkeit beobachtet. Es liegt also die Vermutung nahe, dass bei den Messungen entweder nur sehr wenig L-16 vorhanden ist, oder dieses nicht in die MO-Membran eingebaut werden konnte. Bei den Fusionspeptiden sind deutliche Amid I'-Banden sichtbar, die sich stark vom reinen MO-Spektrum abheben. Auch stimmen die Bandenformen im Wesentlichen mit denen in Lösung (Abb. 6-15) überein. Aus den druckabhängigen Verläufen der Banden lässt sich schließen, dass HA2-FP und TBEV-FP, die MO bei limitierter Hydratation zugesetzt werden, ihre Sekundärstrukturen weder beim Einbau noch beim Durchlaufen der verschiedenen

Lipidphasen wesentlich verändern. Dabei sollte im Hinterkopf behalten werden, dass in den gezeigten Amid I'-Spektren weiterhin die TFA-Bande und die C=C-Bande vorhanden sind, was die geringen Fluktuationen aller Spektren teilweise erklären kann.

6.4 Zusammenfassung

Die Auswirkungen zweier verschiedener Fusionspeptide, HA2-FP und TBEV-FP, auf das Phasenverhalten von MO bei limitierter Hydratation wurden untersucht. Die erzielten Ergebnisse zeigen deutlich, dass beide Peptide sehr unterschiedlich in ihrem Potenzial sind, MO-Membranen zu beeinflussen. Bei Zugabe von HA2-FP zu MO-Membranen ändert sich das Phasenverhalten kaum. Im Gegensatz dazu induziert die Interaktion von TBEV-FP mit MO die inverse hexagonale Phase bei Umgebungsdruck und destabilisiert die lamellare Phase weitgehend. Diese Ergebnisse bestätigen die Ansicht, dass Fusionspeptide bei der Bildung von *hemifusion stalks* und Fusionsporen helfen können, aber sie reichen im Allgemeinen nicht aus, um diesen Prozess alleine voranzutreiben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Phasen mit negativer Monoschichtkrümmung durch die Fusionspeptide mit einer geringeren Packungsdichte in den MO-Membranen verbunden ist, da dieser Effekt durch die Anwendung von hohem Druck zumindest teilweise umgekehrt werden kann. Dies könnte Auswirkungen auf die Membranfusion bei Organismen haben, die unter extremen Druckbedingungen leben, wie beispielsweise in der Tiefsee, wo Drücke bis zu 1 kbar auftreten. Die Existenz von Leben unter extremen Belastungen deutet darauf hin, dass die Natur Membranfusionsmechanismen gefunden hat, die den abnehmenden Effekt des Drucks auf die negative Monoschichtkrümmung überwinden. Allerdings kann die Membranfusion unter noch höheren Drücken unterdrückt werden, auch wenn diese biologisch nicht relevant sind. Darüber hinaus scheinen die Sekundärstrukturen der Fusionspeptide von der Wechselwirkung mit den MO-Membranen unbeeinflusst zu sein und verändern sich auch bei Lipidphasenübergängen nicht, obwohl die Peptide in der Lage sind, Konformationsänderung einzugehen. Also sind die Fusionspeptide die strukturgebende Komponente im untersuchten System und steuern bei der Interaktion mit Lipidmembranen die Struktur dieser und nicht umgekehrt.

7 Zusammenfassung

Alle Proteinfunktionen basieren auf Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung. Proteine können an vielen Prozessen beteiligt sein. Sie binden Moleküle für den Transport, die katalytische Umwandlung oder zur Signalübertragung. Sie können assoziieren oder an Grenzflächen wie Lipidmembranen oder Materialoberflächen adsorbieren. Damit diese Proteinsysteme in der Biotechnologie oder Biomedizin genutzt werden können, müssen die zugrunde liegenden Mechanismen verstanden werden, wofür eine experimentelle Charakterisierung erforderlich ist. In dieser Arbeit wurden Proteinwechselwirkungen mit Polyelektrolyt-beschichteten Grenzflächen und Lipidmembranen unter hohem Druck untersucht, um Volumenänderungen zu messen, die direkt die räumlichen Beiträge zu diesen Wechselwirkungen liefern. Darüber hinaus kann auch die Stärke von Proteinwechselwirkungen mit Liganden oder Grenzflächen durch Druckmodulation bestimmt werden. Dies wiederum kann beim Design von Wirkstoffen und bioresponsiven Grenzflächen verwendet werden.

Verschiedene spektroskopische und Streutechniken wurden in dieser Arbeit angewendet, um Proteinwechselwirkungen unter hohem Druck zu studieren. Es wurden vier Systeme untersucht:

- Die Proteinadsorption an einer planaren Polyelektrolytbürste, zur Aufklärung des Adsorptionsmechanismus.
- Die Enzymaktivität an unterschiedlichen magnetischen Nanopartikeln, um deren Eignung als recyclebare Grenzfläche aufzuzeigen.
- Der Aufbau einer proteinbeladenen Polyelektrolyt-Multischicht, um deren bioresponsiven Eigenschaften zu testen.
- Die Wechselwirkung von Fusionspeptiden mit Modellbiomembranen, um den Mechanismus der Porenbildung besser zu verstehen.

Die vorgestellten Studien zeigen, dass die Anwendung von Hochdruck sich hervorragend dazu eignet, neue und grundlegende Erkenntnisse über die genannten Systeme und deren Wechselwirkungen zu liefern, da diese fast immer mit Volumenänderungen verbunden sind.

Im ersten Fall wurden Protein-Wechselwirkungen mit einer planaren Polyelektrolyt-Bürste studiert. Mit Hilfe von Druck konnten hier elektrostatische Wechselwirkungen aufgedeckt und theoretisch aufgestellte Wechselwirkungsmechanismen geklärt und experimentell belegt werden. Die in der Literatur postulierten Proteinadsorptionsmechanismen sind nämlich immer mit einer Volumenänderung verbunden, da die Bildung oder der Bruch von Ionenbindungen in den Mechanismen auftreten. In Abhängigkeit von der Größe und dem Vorzeichen dieser Volumenänderung kann dann ein bestimmter Druckeffekt auf den Grad der Proteinadsorption

erwartet und mit experimentellen Daten verglichen werden. Es konnte gezeigt werden, dass negativ und positiv geladene Proteine unterschiedlichen Adsorptionsmechanismen folgen, da sie ein unterschiedliches Druckverhalten zeigen. Die in der Literatur theoretisch postulierten Mechanismen der Protein-Polyelektrolyt-Komplexierung, der Ladungsregulierung und der „Gegenionenverdampfung“ konnten experimentell bestätigt werden. Die druckabhängigen Daten deuten darauf hin, dass die Proteinadsorption an einer Polyelektrolytbürste unter starker elektrostatischer Abstoßung dennoch erfolgen kann, wenn „kondensierte“ Gegenionen bei der Proteinadsorption aus der Bürste freigesetzt werden.

Im zweiten Fall wurde die Enzymaktivität an kolloidalen magnetischen Polyelektrolyt-Bürsten untersucht. Hier konnte ein vielversprechendes System bezüglich der Biokompatibilität charakterisiert werden. Es hat sich gezeigt, dass die Aktivität der nahezu vollständig adsorbierenden Alkoholdehydrogenase teilweise erhalten bleibt, wobei die magnetischen Nanopartikel sich hervorragend aus der Messlösung abtrennen lassen. Mit Hilfe von Druck konnte dann das Volumenprofil der Enzym-Reaktion untersucht werden, welches das Aktivierungsvolumen für den Übergangszustand liefert. Ein Vergleich der Aktivierungsvolumina der unterschiedlichen Systeme gibt Aufschluss darüber, ob die Wechselzahl und somit der Reaktionsmechanismus dieselben sind oder nicht. Es konnte gezeigt werden, dass auf den untersuchten MNP die Wechselzahl erhalten bleibt, aber ein Teil des Enzyms in der Polyelektrolyt-Bürste „vergraben“ wird. Das Spektrum der Anwendbarkeit der PEI-MNP konnte durch eine Methylierung ausgeweitet werden, wodurch die Ladung der Bürstenteilchen partiell fixiert wird, was für die Immobilisierung verschiedener Enzyme von Vorteil sein kann.

Im dritten Fall wurde Druck für die Entwicklung von bio-responsiven Grenzflächen verwendet. Wenn CaM in einer Polyelektrolytmultischicht eingebettet ist, kann eine Ligandenbindung des CaM zu einer großen Konformationsänderung führen, die die Struktur der gesamten Multischicht beeinflusst. Da unter Druck die Wechselwirkungen zwischen CaM und den Polyelektrolytketten voraussichtlich geschwächt werden, könnte die benötigte konformelle Freiheit des CaM begünstigt werden. Auch wenn wertvolle Einblicke in den Aufbau und die Funktionalität solcher CaM-Polyelektrolytmultischichten im Rahmen dieser Arbeit gewonnen werden konnten, muss auch festgestellt werden, dass Druck nur einen kleinen Effekt auf die Struktur der Multischicht ausübt. Offenbar sind diese Grenzflächensysteme dicht gepackt und weisen, entgegen der Erwartung, kaum direkte Ionenbindungen auf, die für eine Drucksensibilität vorliegen müssten.

Im letzten Fall wurde Druck verwendet, um ein biologisches System zu studieren. Die Änderung der molekularen Packungsdichte, die mit der Wechselwirkung von Fusionspeptiden mit

Lipidmembranen zusammenhängt, konnte nachgewiesen werden. Diese Änderung ist wahrscheinlich mit der *hemifusion stalk*-Bildung während der Membranfusion verknüpft. Der Einbau von zwei viralen Fusionspeptiden in eine Monoolein-Modellmembran hat gezeigt, dass die Peptide einen wesentlichen Beitrag zu diesem Prozess liefern: Selbst ohne die entsprechenden Fusionsproteine wurden kubische Phasen mit negativen GAUßSCHEN-Krümmungen induziert, welche die Porenbildung während einer Membranfusion simulieren. Interessanterweise sind die kurzen Peptidsequenzen bei diesem Prozess die strukturgebende Komponente im System und beeinflussen den Verlauf maßgeblich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit Druck als thermodynamischer Parameter verwendet worden ist, um die Mechanismen und Beiträge der Wechselwirkung von Proteinen mit Grenzflächen aufdecken und zuordnen zu können. Die Nützlichkeit von Druck wurde beleuchtet und dazu verwendet, um das Verständnis der Proteinadsorption und Enzymaktivität an diversen Grenzflächen voranzutreiben.



8 Summary

All protein functions are based on interactions with the environment. Proteins can be involved in many processes. They bind molecules for transport, catalytic conversion or signal transduction. They may associate or adsorb to interfaces such as lipid membranes or material surfaces. For these protein systems to be used in biotechnology or biomedicine, the underlying mechanisms need to be understood, which requires experimental characterization. In this work, protein interactions with polyelectrolyte-coated interfaces and lipid membranes under high pressure were studied in order to measure volume changes that directly provide the spatial contributions to these interactions. In addition, the strength of protein interactions with ligands or interfaces can be determined by pressure modulation. This in turn can be used in the design of drugs and bio-responsive interfaces.

Various spectroscopic and scattering techniques have been used in this work to study protein interactions under high pressure. Four systems were investigated:

- Protein adsorption on a planar polyelectrolyte brush to elucidate the adsorption mechanism.
- The enzyme activity on different magnetic nanoparticles to show their suitability as a recyclable interface.
- The construction of a protein-loaded polyelectrolyte multilayer in order to test its bio-responsive properties.
- The interaction of fusion peptides with model biomembranes to better understand the mechanism of pore formation.

The presented studies show that the use of high pressure is excellently suited to provide new and fundamental knowledge about the mentioned systems and their interactions, since these are almost always associated with volume changes.

In the first case, protein interactions were studied with a planar polyelectrolyte brush. With the help of pressure, electrostatic interactions could be uncovered and theoretically established interaction mechanisms clarified and experimentally proven. The protein adsorption mechanisms postulated in the literature are always associated with a change in volume, since the formation or breakage of ionic bonds occurs in the mechanisms. Depending on the size and the sign of this volume change, a specific pressure effect on the degree of protein adsorption can then be expected and compared with experimental data. It could be shown that negatively and positively charged proteins follow different adsorption mechanisms, because they show a different pressure behavior. The theoretically postulated mechanisms of protein-polyelectrolyte

complexation, charge regulation, and "counter-ion evaporation" have been experimentally confirmed. The pressure-dependent data suggest that protein adsorption on a polyelectrolyte brush under high electrostatic repulsion may still occur when "condensed" counter-ions are released from the brush during protein adsorption.

In the second case, the enzyme activity on colloidal magnetic polyelectrolyte brushes was examined. Here, a promising system with respect to biocompatibility could be characterized. It has been shown that the activity of the almost completely adsorbing alcohol dehydrogenase is partially retained, and the magnetic nanoparticles can be excellently separated from the measurement solution. By means of pressure, the volume profile of the enzyme reaction could then be investigated, which provides the activation volume for the transition state. A comparison of the activation volumes of the different systems provides information on whether the reaction mechanism is the same or not. It could be shown that the turnover number is retained on the investigated MNP, but a part of the enzyme is "buried" in the polyelectrolyte brush. The spectrum of applicability of the PEI-MNP could be widened by methylation, whereby the charge of the brush particles is partially fixed, which may be advantageous for the immobilization of various enzymes.

In the third case, pressure was used for the development of bio-responsive interfaces. When CaM is embedded in a polyelectrolyte multilayer, ligand binding of the CaM can lead to a large conformational change that does affect the structure of the entire multilayer. Since the interactions between CaM and the polyelectrolyte chains are likely to be weakened under pressure, the required conformational freedom of the CaM could be promoted. Although valuable insights into the structure and functionality of such CaM polyelectrolyte multilayers could be gained in this work, it must also be noted that pressure exerts only a small effect on the structure of the multilayers. Apparently, these interfacial systems are densely packed and, contrary to expectation, have hardly any direct ionic bonds which would show pressure sensitivity.

In the last case, pressure was used to study a biological system. The change in the molecular packing density associated with the interaction of fusion peptides with lipid membranes has been demonstrated. This change is probably linked to hemifusion stalk formation during membrane fusion. The incorporation of two viral fusion peptides into a monoolein model membrane has shown that the peptides make a significant contribution to this process: even without the corresponding fusion proteins, cubic phases with negative Gaussian curves were induced, which led to the formation of pores simulating a membrane fusion. Interestingly, the short peptide

sequences in this process are the structuring component in the system and significantly influence the course.

In summary, in the present work, pressure has been used as a thermodynamic parameter in order to be able to detect and assign the mechanisms and volume contributions to the interaction of proteins with interfaces. The utility of pressure has been elucidated and used to advance the understanding of protein adsorption and enzyme activity at various interfaces.

9 Anhang

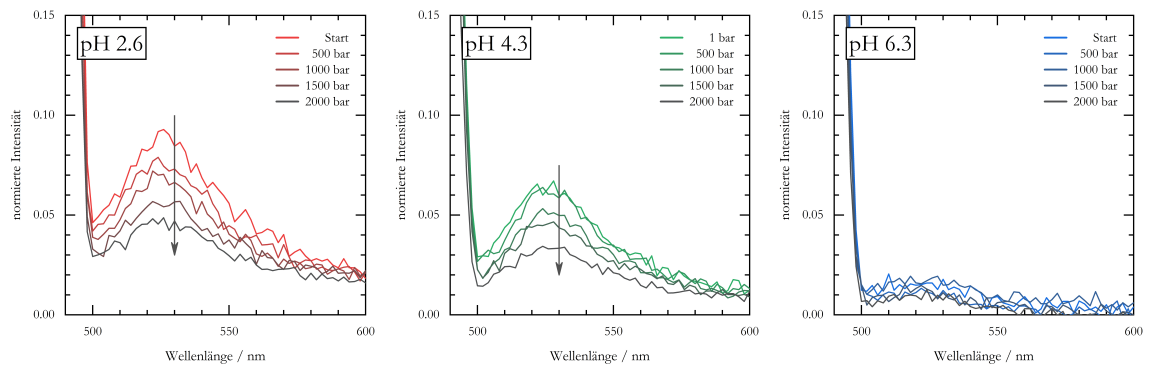


Abb. 9-1 Typische TIRF-Spektren von holo-CaM · 4 TFP, markiert mit Alexa-488, an der Puffer-Lösung / PAA-Bürste / Quarz-Grenzfläche. Es sind Spektren bei drei unterschiedlichen pH-Werten gezeigt. Alle Messungen wurden 3 mal reproduziert und sind bereits auf das Anregungslicht normiert.

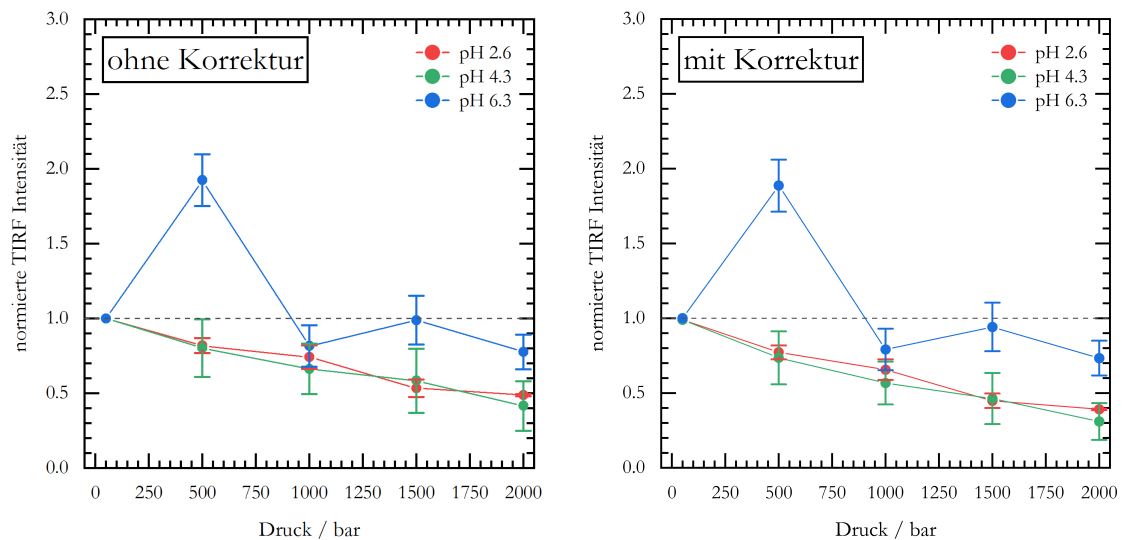


Abb. 9-2 Die relative Menge des an der PAA-Bürste adsorbierten holo-CaM · 4 TFP als Funktion des Druckes unter pH-Variation. *Links*: integrale Flächen der Alexa-Bande (s. Abb. 9-1), auf den ersten Druck-Punkt (50 bar) normiert; *Rechts*: integrale Flächen der Alexa-Bande (s. Abb. 9-1), auf den ersten Druck-Punkt (50 bar) normiert und auf die Quantenausbeute (s. Tabelle 3-3) korrigiert. Die gestrichelte Linie zeigt den Wert von 1 und gibt somit den Vergleich zu 50 bar an.

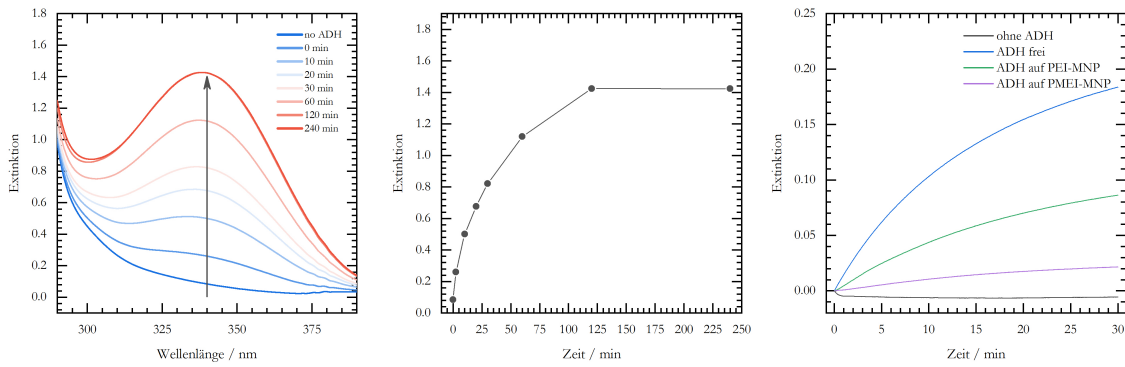


Abb. 9-3 Langzeitmessungen der ADH-Aktivität zur Abschätzung des linearen Bereichs. *Links:* Zeitlicher Verlauf der NADH-Bande bei 340 nm mit fortschreitender Reaktion. *Mitte:* Die zur linken Abbildung korrespondierende Extinktion bei 340 nm. *Rechts:* Der Aktivitätsverlauf der untersuchten Systeme über einen Zeitraum von 30 min (die Messungen für die Druckscans gehen über die ersten 250 s)

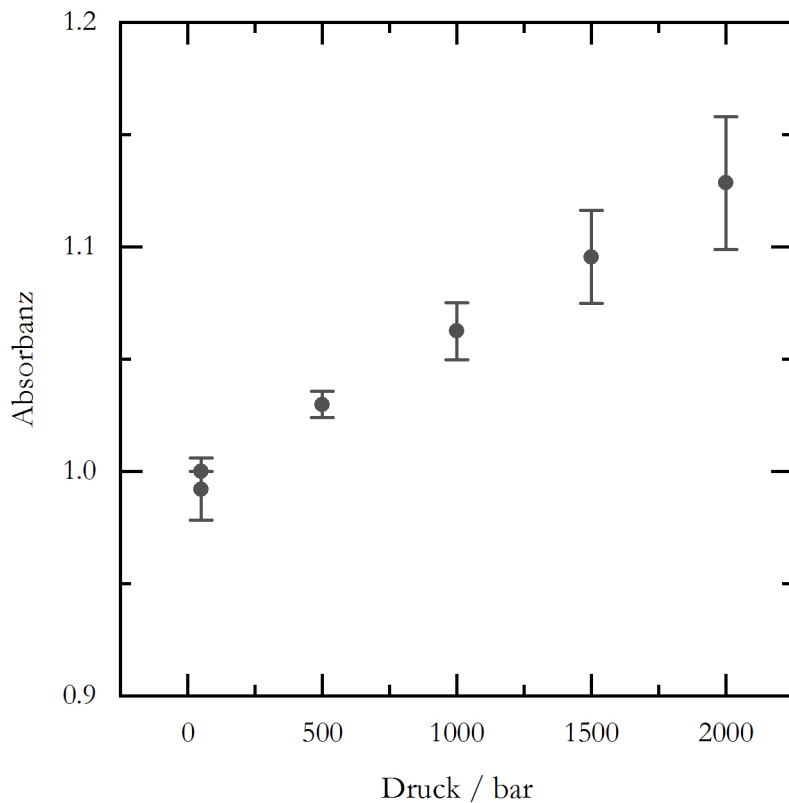


Abb. 9-4 Änderung des Extinktionskoeffizienten von NAD^+ mit steigendem Druck. Die Daten sind auf den ersten Druck bei 50 bar normiert, sodass die Korrekturfaktoren erhalten werden und nicht der Koeffizient direkt.

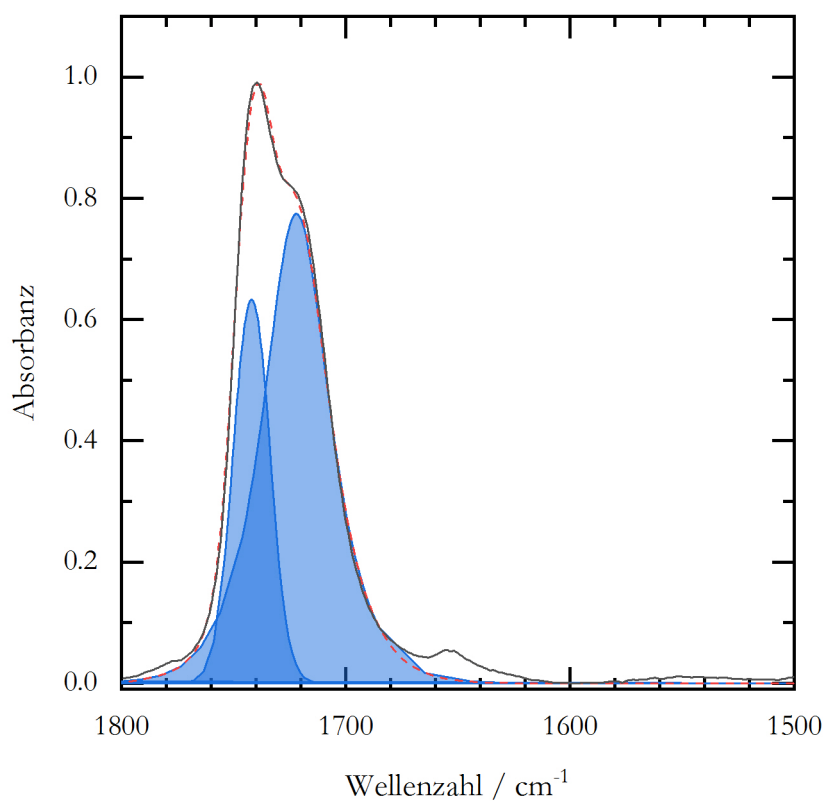


Abb. 9-5 Darstellung des Anpassungsvorgangs zur Subtraktion der C=O-Schwingungen aus den aufgenommenen Spektren. In schwarz ist das Original-Spektrum dargestellt, in blau die beiden Voigt-Funktionen, mit denen die C=O-Streckschwingungen angepasst worden sind, und in rot die resultierte Funktion, die anschließend abgezogen worden ist.

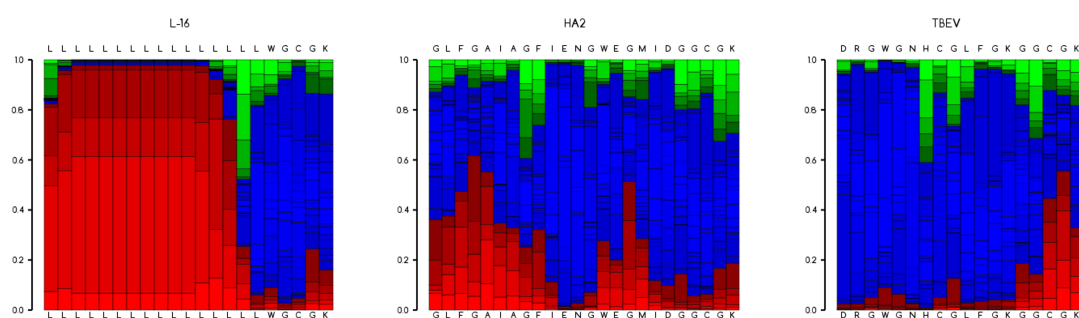


Abb. 9-6 Die von PEP-Fold vorhergesagten Wahrscheinlichkeitsmatrizen für die Strukturen der verwendeten Peptide. Rot: α -Helix, Blau: unbestimmt, Grün: β -Faltlatt.

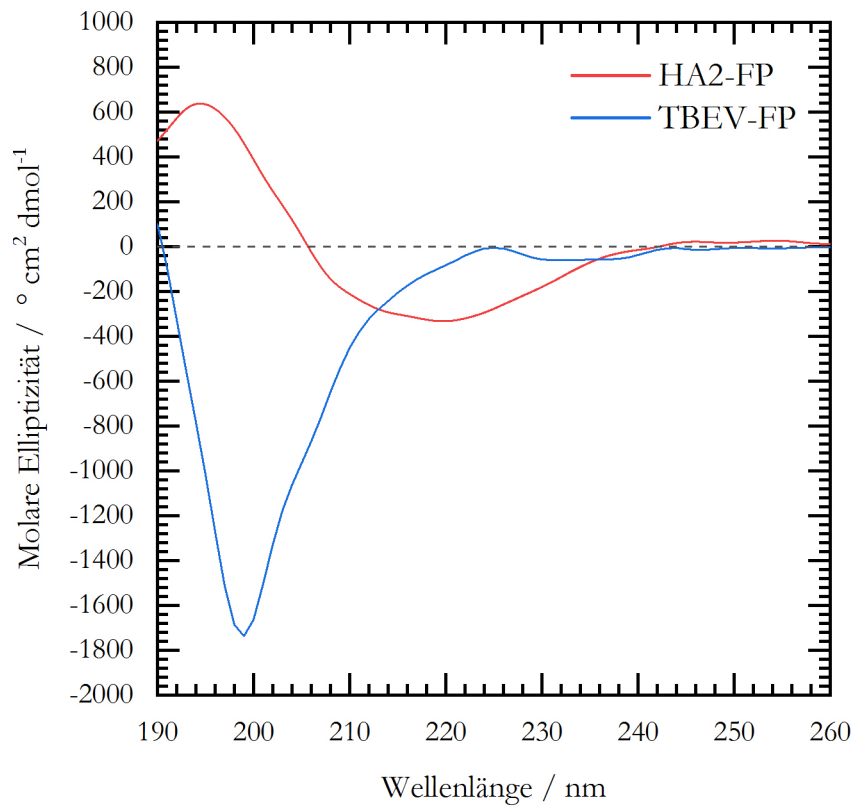


Abb. 9-7 Ausgewählte CD-Spektren der Fusionspeptide bei 25 °C und pH =5.

Literaturverzeichnis

- [1] R. Hayashi, *Biochim. Biophys. Acta*, 1595, 397-399, **2002**.
- [2] C. Balny, P. Masson und K. Heremans, *Biochim. Biophys. Acta*, 1595, 3-10, **2002**.
- [3] V. V. Mozhaev, K. Heremans, J. Frank, P. Masson und C. Balny, *Proteins*, 24, 81-91, **1996**.
- [4] P. Brown, R. Meyer, F. Cardone und M. Pocchiari, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 6093-6097, **2003**.
- [5] C. Balny, *Biochim. Biophys. Acta*, 1764, 632-639, **2006**.
- [6] C. Czeslik, *Chemie Unserer Zeit*, 40, 238-245, **2006**.
- [7] S. Nock und P. Wagner, *Chem. unserer Zeit*, 34, 348-354, **2000**.
- [8] A. Levin, *Masterarbeit, TU Dortmund*, **2016**.
- [9] A. Levin, M. Erkamp, R. Steitz und C. Czeslik, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18, 9070-9078, **2016**.
- [10] S. Cinar, *Dissertation, TU Dortmund*, **2018**.
- [11] R. Vollmers, *Bachelorarbeit, TU Dortmund*, **2018**.
- [12] S. Meichsner, *Masterarbeit, TU Dortmund*, **2018**.
- [13] C. Czeslik, H. Seemann und R. Winter, *Basiswissen Physikalische Chemie*, Vieweg+Teubner, **2010**.
- [14] P. W. Atkins, J. de Paula und M. Bär, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, **2013**.
- [15] R. Winter, F. Noll und C. Czeslik, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Vieweg+Teubner, **2011**.
- [16] J. Daillant und A. Gibaud, *X-ray and Neutron Reflectivity*, Springer, **2009**.
- [17] C. Fermon, F. Ott und A. Menelle, "Neutron Reflectometry" in *X-ray and Neutron Reflectivity*, Springer, **2009**.

-
- [18] M. Yasaka, *Rigaku Journal*, 26, 1-9, **2010**.
- [19] F. J. Wirkert, M. Paulus, J. Nase, J. Möller, S. Kujawski, C. Sternemann und M. Tolan, *J. Synchrotron Radiat.*, 21, 76-81, **2014**.
- [20] J. Koo und C. Czeslik, *Rev. Sci. Instrum.*, 83, p. 085109, **2012**.
- [21] D. Axelrod, T. P. Burghardt und N. L. Thomson, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 13, 247-268, **1984**.
- [22] B. Stuart, *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, John Wiley & Sons, **1997**.
- [23] B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, **2004**.
- [24] J. T. Pelton und L. R. McLean, *Analytical Biochemistry*, 277, 167-176, **2000**.
- [25] J. Kong und S. Yu, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 39, 549-559, **2007**.
- [26] P. T. T. Wong und D. J. Moffat, *Applied Spectroscopy*, 43, 1279-1281, **1989**.
- [27] D. J. Siminovitch, P. T. T. Wong und H. H. Mantsch, *Biochemistry*, 26, 3277-3287, **1987**.
- [28] C. G. Jeworrek, *Dissertation, TU Dortmund*, **2011**.
- [29] Y. Kitamura und T. Itoh, *J. Solution Chem.*, 16, 715-725, **1987**.
- [30] H. Fukada und K. Takahoshi, *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 33, 159-166, **1998**.
- [31] A. Levin und C. Czeslik, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 171, 478-484, **2018**.
- [32] W. M. de Vos, P. M. Biesheuvel, A. de Keizer, J. M. Kleijn und M. A. Cohen Stuart, *Langmuir*, 24, 6575-6584, **2008**.
- [33] C. Czeslik, G. Jackler, R. Steitz und H.-H. von Grünberg, *J. Phys. Chem. B.*, 108, 13395-13402, **2004**.
- [34] T. A. Horbett und J. L. Brash, *Proteins at interfaces II*, 602, 1-23, **1995**.
- [35] M. Malmsten, *Biopolymers at Interfaces*, 2, **2003**.
- [36] S. Burkert, E. Bittrich, M. Kuntzsch, M. Müller, K.-J. Eichorn, C. Bellmann, P. Uhlmann und M. Stamm, *Langmuir*, 26, 1786-1795, **2010**.

- [37] E. Psarra, U. König, Y. Ueda, C. Bellmann, A. Janke, E. Bittrich, K.-J. Eichorn und P. Uhlmann, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7, 12516-12529, **2015**.
- [38] A. Bratek-Skicki, P. Eloy, M. Morga und C. Dupont-Gillain, *Langmuir*, 34, 3037-3048, **2018**.
- [39] M. Ballauff und O. Borisov, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 11, 316-323, **2006**.
- [40] S. Milner, *Science*, 251, 905-914, **1991**.
- [41] C. Czeslik, R. Jansen, M. Ballauff, A. Wittemann, C. A. Royer, E. Gratton und T. Hazlett, *Phys. Rev. E*, 69, p. 021401, **2004**.
- [42] O. Hollmann und C. Czeslik, *Langmuir*, 22, 3300-3305, **2006**.
- [43] A. Wittemann, B. Haupt und M. Ballauff, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5, 1671-1677, **2003**.
- [44] O. Hollmann, R. Steitz und C. Czeslik, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10, 1448-1456, **2008**.
- [45] A. Wittemann und M. Ballauff, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8, 5269-5275, **2006**.
- [46] F. A. M. Leermakers, M. Ballauff und O. V. Borisov, *Langmuir*, 23, 3937-3946, **2007**.
- [47] P. M. Biesheuvel, F. A. M. Leermakers und M. A. Cohen Stuart, *Phys. Rev. E* 73, p. 011802, **2006**.
- [48] B. B. Boonyaratanakornkit, C. B. Park und D. Clark, *Biochim. Biophys. Acta*, 1595, 235-249, **2002**.
- [49] T. Q. Luong, S. Kapoor und R. Winter, *ChemPhysChem*, 16, 3555-3571, **2015**.
- [50] R. Chattopadhyaya, W. E. Meador, A. R. Means und F. A. Quioco, *J. Mol. Biol.*, 228, 1177-1192, **1992**.
- [51] N. Matsushima, N. Hayashi, Y. Jinbo und Y. Izumi, *Biochem. J.*, 347, 211-215, **2000**.
- [52] S. Cinar, S. Al-Ayoubi, C. Sternemann, J. Peters, R. Winter und C. Czeslik, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20, 3514-3522, **2018**.
- [53] N. Hayashi, M. Matsubara, A. Takasaki, K. Titani und H. Taniguchi, *Protein Expr.*, 12, 25-28, **1998**.
- [54] S. Cinar, S. Möbitz, S. Al-Ayoubi, B.-K. Seidlhofer und C. Czeslik, *Langmuir*, 33, 3982-3990, **2017**.

-
- [55] E. P. K. Currie, A. B. Sieval, M. Avena, H. Zuilhof, E. J. R. Sudhölter und M. A. Cohen Stuart, *Langmuir*, 15, 7116-7118, **1999**.
- [56] A. Nelson, *J. Appl. Cryst.*, 39, 273-276, **2006**.
- [57] C. B. Klee und T. C. Vanaman, *Adv. Protein Chem.*, 35, 213-321, **1982**.
- [58] T. Swift, L. Swanson, M. Geoghegan und S. Rimper, *Soft Matter*, 12, 2542-2549, **2016**.
- [59] F. Abe, C. Kato und K. Horikoshi, *Trends Microbiol.*, 11, 447-453, **1999**.
- [60] O. Hollmann, C. Reichart und C. Czeslik, *Z. Phys. Chem.*, 222, 205-2015, **2008**.
- [61] J. M. Berg, J. L. Tymoczko und L. Stryer, *Biochemie*, Springer Spektrum, **2010**.
- [62] C. Yigit, M. Kanduč, M. Mallauß und J. Dzubiella, *Langmuir*, 33, 417-427, **2017**.
- [63] R. Hariharan, C. Biver und W. B. Russel, *Macromolecules*, 31, 7514-7518, **1998**.
- [64] G. S. Manning, *J. Chem. Phys.*, 51, 924-933, **1969**.
- [65] A. Levin, A. Hartl, O. Reiser und C. Czeslik, *Colloids Surf. B*, 182, 110344-1 - 110344-7, **2019**.
- [66] W. Gehartz, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 19, 49-104, **1991**.
- [67] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan und R. Renandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 1451-1463, **2007**.
- [68] J. N. Talbert und J. M. Goddard, *Colloids Surf. B*, 93, 8-19, **2012**.
- [69] M. Franzreb, M. Siemann-Herzberg, T. J. Hobley und O. R. T. Thomas, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70, 505-5016, **2006**.
- [70] M. Amiri, A. Salavati-Niasari und A. Akbari, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 265, 29-44, **2019**.
- [71] C. Czeslik und R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3, 235-239, **2001**.
- [72] S. Cinar und C. Czeslik, *Colloids Surf. B*, 129, 161-168, **2015**.
- [73] C. Reichart und C. Czeslik, *Langmuir*, 25, 1047-1053, **2009**.
- [74] Q. M. Kainz und O. Reiser, *Accounts of Chemical Research*, 47, 667-677, **2014**.

- [75] Q. M. Kainz, S. Fernandes, C. Eichenseer, F. Besostri, H. Körner, R. Müller und O. Reiser, *Faraday Discussions*, 175, 27-40, **2014**.
- [76] R. N. Grass, E. K. Athanassiou und W. J. Stark, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 4909-4912, **2007**.
- [77] S. Raj, S. Ramaswamy und B. V. Plapp, *Biochemistry*, 53, 5791-5803, **2014**.
- [78] S. Trivic und V. Leskovac, *J. Serb.*, 65, 207-227, **2000**.
- [79] M. J. Eisenmenger und J. I. Reyes-De-Corcuera, *Enzyme Microb. Technol.*, 45, 331-347, **2009**.
- [80] C. Czeslik, T. Q. Luong und R. Winter, *MRS Bulletin*, 42, 738-742, **2017**.
- [81] P. Butz, K. O. Greulich und H. Ludwig, *Biochemistry*, 27, 1556-1563, **1988**.
- [82] T. P. Silverstein, *J. Chem. Educ.*, 93, 963-970, **2016**.
- [83] V. V. Mozhaev, K. Heremans, J. Frank, P. Masson und C. Balny, *Trends Biotechnol.*, 12, 493-501, **1994**.
- [84] S. Cinar und C. Czeslik, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics*, 1866, 61-623, **2018**.
- [85] J. A. Creighton und D. G. Eadon, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 87, 3881-3891, **1991**.
- [86] D. Byler und H. Susi, *Biopolymers*, 25, 469-487, **1986**.
- [87] B. He, J.-H. Bai und H.-M. Zhou, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29, 1021-1028, **1997**.
- [88] D. W. Green, H.-W. Sun und B. V. Plapp, *J. Biol. Chem.*, 268, 7792-7798, **1993**.
- [89] T. Tamiya, N. Okahashi, R. Sakuma, T. Aoyama, T. Akahane und J. J. Matsumoto, *Cryobiology*, 22, 446-456, **1985**.
- [90] M. Bühner und H. Sund, *Eur. J. Biochem.*, 11, 73-79, **1969**.
- [91] E. Morild, *Biophys. Chem.*, 6, 351-362, **1977**.
- [92] G. Decher, *Science*, 277, 1232-1237, **1997**.
- [93] S. Cinar und C. Czeslik, *Colloids Surf. B*, 158, 9-15, **2017**.

-
- [94] A. Levin, S. Cinar, M. Paulus, J. Nase, R. Winter und C. Czeslik, *Biophys. Chem.*, 252, 106194-1 - 106194-9, **2019**.
- [95] J. B. Schlenoff, *Langmuir*, 25, 14007-14010, **2009**.
- [96] C. Jeworrek, O. Hollmann, R. Steitz, R. Winter und C. Czeslik, *Biophys. J.*, 96, 1115-1123, **2009**.
- [97] G. Jackler, C. Czeslik, R. Steitz und C. A. Royer, *Phys. Rev. E*, 71, p. 041912, **2005**.
- [98] P. Schwinté, V. Ball, B. Szalontai, Y. Haikel, J.-C. Voegel und P. Schaaf, *Biomacromolecules*, 3, 1135-1143, **2002**.
- [99] P. Schwinté, J.-C. Voegel, C. Picart, Y. Haikel, P. Schaaf und B. Szalontai, *J. Phys. Chem. B*, 105, 11906-11916, **2001**.
- [100] V. Schuabb, S. Cinar und C. Czeslik, *Colloids Surf., B*, 140, 497-504, **2016**.
- [101] N. Velk, K. Uhlig, A. Vikulina, C. Duschl und D. Volodkin, *Colloids Surf., B*, 147, 343-350, **2016**.
- [102] I. André, T. Kesvatera, B. Jönsson, K. S. Åkerfeldt und S. Linse, *Biophys. J.*, 87, 1929-1938, **2004**.
- [103] M. Salomäki, P. Tervasmäki, S. Areva und J. Kankare, *Langmuir*, 20, 3679-3683, **2004**.
- [104] A. Levin, C. Jeworrek, R. Winter, K. Weise und C. Czeslik, *J. Phys. Chem. B*, 36, p. 8492-8502, **2017**.
- [105] S. C. Harrison, *Virology*, 479-480, 498-507, **2015**.
- [106] J. M. White, S. E. Delos, M. Brecher und K. Schornberg, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 43, 189-219, **2008**.
- [107] J. M. Seddon, *Biochim. Biophys. Acta, Rev.*, 1031, 1-69, **1990**.
- [108] D. P. Siegel, *Langmuir*, 26, 8673-8683, **2010**.
- [109] D. P. Siegel, *Biophys. J.*, 95, 5200-5215, **2008**.
- [110] M. J. M. Darkes, S. M. A. Davies und J. P. Bradshaw, *FEBS Lett.*, 461, 178-182, **1999**.
- [111] D. Siegel und R. M. Epand, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1468, 87-98, **2000**.

- [112] J. L. Nieva und A. Agirre, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1614, 104-114, **2003**.
- [113] R. M. Epanand, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1614, 116-121, **2003**.
- [114] J. Briggs, H. Chung und M. Caffrey, *J. Phys. II*, 6, 723-751, **1996**.
- [115] H. Qui und M. Caffrey, *Biomaterials*, 21, 223-234, **2000**.
- [116] C. Czeslik, R. Winter, G. Rapp und K. Bartels, *Biophys. J.*, 68, 1423-1429, **1995**.
- [117] C. V. Kulkarni, W. Wachter, G. Iglesias-Salto und Engelskirchen, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13, 3004-3021, **2011**.
- [118] L. K. Tamm, X. Han, Y. Li und A. L. Lai, *Biopolymers*, 66, 249-260, **2002**.
- [119] S. Bressanelli, K. Stiasny, S. L. Allison, E. A. Stura, S. Duquerroy, J. Lescar, F. X. Heinz und F. A. Rey, *EMBO J.*, 23, 728-738, **2004**.
- [120] K. Weise und J. Reed, *ChemBioChem.*, 9, 934-943, **2008**.
- [121] X. Han und L. K. Tamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 13097-13102, **2000**.
- [122] J. Lendermann und R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5, 1440-1450, **2003**.
- [123] C. Alland, F. Moreews, D. Boens, M. Carpentier, S. Chiusa, M. Lonquety, N. Renault, Y. Wong, H. Cantalloube, J. Chomilier, J. Hochez, J. Pothier, B. O. Villoutreix, J. F. Zagury und P. Tufféry, *Nucleic Acids Res.*, 33, p. W44–W49, **2005**.
- [124] B. Néron, H. Ménager, C. Maufrais, N. Joly, J. Maupetit, S. Letort, S. Carrere, P. Tuffery und C. Letondal, *Bioinformatics.*, 25, p. 3005–3011, **2009**.
- [125] A. C. Camproux, R. Gautier und P. Tuffery, *J. Mol. Biol.*, 339, 591-605, **2004**.
- [126] J. Maupetit, P. Derreumaux und P. Tuffery, *J. Comput. Chem.*, 31, 726-738, **2010**.
- [127] A. Lamiable, P. Thevenet und P. Tufféry, *J. Comput. Chem.*, 37, 2006-2016, **2016**.
- [128] J. Maupetit, P. Tuffery und P. Derreumaux, *Proteins*, 69, 394-408, **2007**.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| A | Absorbanz |
| ADH | Alkoholdehydrogenase |
| Arg | Arginin |
| Asp | Asparaginsäure |
| CaM | Calmodulin |
| CD | Circulardichroismus |
| DLS | Dynamische Lichtstreuung |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EPR | Elektronenspinresonanz <i>electron paramagnetic resonance</i> |
| F | Fluoreszenz |
| FP | Fusionspeptid |
| FRET | Förster-Resonanzenergietransfer |
| FSD | FOURIER-Selbstentfaltung <i>FOURIER selfdeconvolution</i> |
| FTIR | Fourier-Transform-Infrarot |
| Glu | Glutaminsäure |
| HA2 | Eine Untereinheit von Hämagglutinin |
| His | Histidin |
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| HMM | <i>Hidden Markov Model</i> |
| HP | Hochdruck <i>high pressure</i> |
| HP-XRR | Hochdruck- Röntgenreflektometrie |
| IC | Innere Umwandlung <i>internal conversion</i> |

| | |
|------------------|---|
| IR | Infrarot |
| Lys | Lysin |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| MNP | Magnetische Nanopartikel |
| MO | Monoolein |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure |
| NAD ⁺ | Nicotinamidadeninukleotid (oxidiert) |
| NADH | Nicotinamidadeninukleotid (reduziert) |
| NMR | Kernspinresonanz <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> |
| OPEP | <i>Optimized Potential for Efficient structure Prediction</i> |
| PAA | Poly(acrylsäure) |
| PAH | Polyallylamin-hydrochlorid |
| PDB | Proteindatenbank |
| PDDA | Polydiallyldimethylammoniumchlorid |
| PEI | Poly(ethylenimin) |
| PEM | Poly(elektrolytmultischicht) |
| pH | <i>pondus Hydrogenii</i> |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| pK _a | Negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante |
| PMEI | Methyliertes PEI |
| PS | Poly(styrol) |
| PSS | Poly(styrolsulfonat) |
| Q | Fluoreszenzlöschung <i>Quenching</i> |
| RPBS | <i>Ressource Parisienne en Bio informatique Structurale</i> |

| | |
|--------------|---|
| SA | Strukturalphabet <i>Structural alphabet</i> |
| SAXS | Röntgen-Kleinwinkel-Streuung <i>small-angle X-ray scattering</i> |
| SDS | Natriumlaurylsulfat <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SLD | Streulängendichte |
| TBEV | FSME-Virus <i>tick-borne encephalitis virus</i> |
| TFP | Trifluoperazin |
| TIRF | Interne Totalreflexionsfluoreszenz <i>total internal reflection fluorescence</i> |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| Trp | Tryptophan |
| UV | Ultraviolett |
| Vis | Sichtbar <i>visible</i> |
| XRR | Röntgenreflektometrie <i>X-ray reflectometry</i> |
| XRS | Röntgenspektroskopie <i>X-Ray Spectroscopy</i> |
| α -CT | α -Chymotrypsin |

Publikationsverzeichnis

- [1] **A. Levin**, M. Erkamp, R. Steitz und C. Czeslik, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18, 9070 – 9078, **2016**
Volume profile of α -chymotrypsin during adsorption and enzymatic reaction on a poly(acrylic acid) brush
(Messungen wurden bereits während der Masterarbeit vorgenommen)
- [2] **A. Levin**, C. Jeworrek, R. Winter, K. Weise und C. Czeslik, *J. Phys. Chem. B*, 121, 8492 – 8502, **2017**
Lipid Phase Control and Secondary Structure of Viral Fusion Peptides Anchored in Monoolein Membranes
- [3] **A. Levin** und C. Czeslik, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 171, 478-484, **2018**
Interaction of calmodulin with poly(acrylic acid) brushes: Effects of high pressure, pH-value and ligand binding
- [4] **A. Levin**, A. Hartl, O. Reiser und C. Czeslik, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 182, 110344-1 – 110344-7, **2019**
High-pressure study of magnetic nanoparticles with a polyelectrolyte brush as carrier particles for enzymes
- [5] **A. Levin**, S. Cinar, M. Paulus, J. Nase, R. Winter, C. Czeslik, *Biophys. Chem.*, 252, 106194-1 – 106194-9, **2019**
Analyzing protein-ligand and protein-interface interactions using high pressure

Konferenzbeiträge

- [1] **8th International Meeting on Biomolecules under Pressure**
15. – 17. Februar 2016, Dortmund (Deutschland)
Volume profile of α -chymotrypsin at polyelectrolyte brushes (Poster)
- [2] **115th General Assembly of the German Bunsen Society for Physical Chemistry**
5. – 7. Mai 2016, Rostock (Deutschland)
Activation volumes of enzymes at polyelectrolyte brushes (Poster)
- [3] **9th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology**
25. – 29. Juli 2016, Toronto (Kanada)
Pressure effects on proteins adsorbed at poly(acrylic) brushes (Poster)
- [4] **61st Annual Meeting of the Biophysical Society**
11. – 15. Februar 2017, New Orleans (USA)
Effect of high pressure on protein binding to poly(acrylic acid) brushes (Poster)
- [5] **10. Tag der Chemie**
24. Februar 2017, Dortmund (Deutschland)
Effect of high pressure on protein binding to poly(acrylic acid) brushes (Poster)
- [6] **Meeting DFG Forschergruppe 1979**
21. März 2017, Dortmund (Deutschland)
Secondary structure of fusion peptides anchored in non-lamellar membranes of monoolein (Poster)
- [7] **116th General Assembly of the German Bunsen Society for Physical Chemistry**
25. – 27. Mai 2017, Kaiserslautern (Deutschland)
Secondary structure of fusion peptides anchored on non-lamellar membranes of monoolein (Poster)
- [8] **11. Tag der Chemie**
09. Februar 2018, Dortmund (Deutschland)
Lipid phase control and secondary structure of viral fusion peptides anchored in monoolein membranes
(Vortrag)

-
- [9] **62nd Annual Meeting of the Biophysical Society**
17. – 21. Februar 2018, San Francisco (USA)
Viral fusion peptides incorporated in monoolein membranes: Secondary structure and lipid phase behavior
(Poster)
- [10] **Meeting DFG Forschergruppe 1979**
25. – 27. März 2018, Regensburg (Deutschland)
Pressure effects on the enzymatic activity of alcohol dehydrogenase immobilized on magnetic nanoparticles with a polyelectrolyte shell (Vortrag)
- [11] **10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology**
18. – 22. September 2018, Numazu (Japan)
Pressure effects on polyelectrolyte multilayers containing calmodulin (Poster)

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Levin, Artem

Name, Vorname
(Surname, first name)

141295

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.

Dortmund, 29.07.2019

Ort, Datum
(Place, date)


Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Anwendung von Druck zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen
und Polyelektrolyt-Grenzflächen sowie Modell-Biomembranen

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.

Dortmund, 29.07.2019

Ort, Datum
(Place, date)


Unterschrift
(Signature)