

In situ Untersuchung von Proteinen an
Grenzflächen mit oberflächensensitiven
Röntgenstreuungsmethoden

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN DER FAKULTÄT PHYSIK DER
TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND



vorgelegt von

Irena Kiesel

April 2014

"Staunen ist das Salz der Erde"

M.C. Escher

Kurzfassung

Die Proteinadsorption an Grenzflächen ist sowohl wirtschaftlich als auch medizinisch von großer Bedeutung. Proteinfilm können entscheidend die Bildung von Biofilmen an Grenzflächen beeinflussen. Sowohl bei medizinischen als auch bei technischen Anwendungen ist die Kontrolle von Biofilmbildung notwendig.

In dieser Arbeit wurden grundlegende Mechanismen der Proteinadsorption sowohl an Fest/Flüssig-Grenzflächen als auch an Flüssig/Gas-Grenzflächen mittels oberflächensensitiver Röntgenstreuungsmethoden analysiert. Bei den untersuchten Proteinen handelt es sich um Lysozym, Ribonuklease A, Rinderserum-Albumin, Fibronectin und Apolipoprotein A1. Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit beinhaltet die temperaturabhängige Desorption und Adsorption von Proteinen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche. Als Substrat wurden sowohl hydrophile als auch hydrophobe Siliziumwafer verwendet. Durch die geschickte Wahl zweier verschiedener Umgebungen, in diesem Fall Puffer und Proteinlösung, ist es möglich, zwischen thermodynamischen und kinetischen Mechanismen bei der Proteinadsorption zu unterscheiden. Die Stärke der Effekte, Desorption im Puffer und Adsorption in der Proteinlösung, hängt dabei sowohl von der Konformationsstabilität der Proteine als auch von elektrostatischen Wechselwirkungen ab. Die untersuchten Mechanismen lassen sich zum Teil auch auf komplexe Proteine übertragen, wobei die Konformation ebenfalls entscheidend zum temperaturabhängigen Verhalten beiträgt. Ein weiterer Teil der Arbeit behandelt die Adsorption von Proteinen an der Flüssig/Gas-Grenzfläche und an Modellmembranen. Hierbei tragen hydrophobe Effekte zur Proteinadsorption an der freien Flüssig/Gas-Grenzfläche bei, wohingegen bei der Adsorption an Membranen elektrostatische Wechselwirkungen eine größere Rolle spielen. Die verwendeten Modellmembranen bestehen aus Phospholipiden (DPPA), auch in einer Mischung mit Cholesterol, oder Stearinsäure. Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem erste Hinweise darauf gefunden, dass Proteine sich sowohl an der freien Flüssig/Gas-Grenzfläche als auch an Membranen lateral anordnen.

Diese Ergebnisse verbessern das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen bei der Proteinadsorption. Das gezielte Ausnutzen dieser Mechanismen ermöglicht es, anwendungsbezogene Oberflächen herzustellen, um Proteinadsorption, und damit auch die Biofilmbildung, zu kontrollieren.

Abstract

Protein adsorption at interfaces is of great relevance in industry and medicine. The growth of biofilms at interfaces is strongly influenced by adsorbed proteins. The control of this biofilm formation is necessary for technical and medical applications.

Fundamental mechanisms of protein adsorption at solid/liquid- and liquid/gas-interfaces are investigated by surface-sensitive x-ray scattering methods. The investigated proteins are lysozyme, ribonuclease A, bovine serum albumin, fibronectin and apolipoprotein A1. The temperature-induced adsorption and desorption at the solid/liquid-interface is the main part of this work. The used solid substrates are hydrophilic and hydrophobic silicon wafer. It is possible to distinguish between thermodynamical and kinetical mechanisms by using two different environments, namely buffer and protein solution. Two processes have been observed, desorption in buffer and adsorption in protein solution. The strength of these processes depends on conformational stability and electrostatic interaction. The investigated mechanisms can also be used for more complex proteins, although the protein structure influences the temperature dependent behaviour as well. Protein adsorption at the liquid/gas-interface and at membranes are investigated in an other part of this work. Phospholipids (DPPA), also in a mixture with cholesterol, and stearic acid were used to prepare model-membranes. The adsorption at the liquid/gas-interface is mainly driven by hydrophobic effects, whereas electrostatic interactions are more important for the adsorption at membranes. Furthermore, first indications for a lateral ordering of proteins adsorbed at the free liquid/gas-interface or at membranes are found in this work.

These results increase the comprehension of fundamental mechanisms of protein adsorption at interfaces. They could be used to tailor surfaces to control protein adsorption, and therefore biofilm formation.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Kurzfassung | I |
| Abstract | III |
| Liste häufig verwendeter Abkürzungen | VII |
| Liste verwendeter Variablen und Naturkonstanten | IX |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Grundlagen | 5 |
| 2.1 Proteine | 5 |
| 2.1.1 Die Proteinstruktur | 5 |
| 2.1.2 Proteinadsorption | 8 |
| 2.2 Modellmembranen | 11 |
| 2.3 Streugeometrie für oberflächensensitive Röntgenstreuungsmethoden | 14 |
| 2.4 Röntgenreflektivität (XRR) | 16 |
| 2.5 Kleinwinkelstreuung unter streifendem Einfall (GISAXS) | 23 |
| 3 Experimenteller Aufbau | 25 |
| 3.1 Strahllinie BL9 an DELTA | 25 |
| 3.2 Strahllinie BW1 an DORIS III (DESY) | 27 |
| 3.3 Labordiffraktometer D8 | 28 |
| 3.4 Aufbau für die Experimente an der Fest/Flüssig-Grenzfläche | 29 |
| 4 Probensysteme | 31 |
| 4.1 Proteine | 31 |
| 4.2 Amphiphile | 36 |
| 4.3 Cholesterol | 36 |
| 4.4 Siliziumsubstrate | 37 |
| 5 Experimentelles Vorgehen | 39 |
| 5.1 Temperaturabhängige Messungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche | 39 |
| 5.2 Messungen an der Flüssig/Gas-Grenzfläche | 40 |
| 6 Messergebnisse und Auswertung | 41 |
| 6.1 Auswertung der Röntgenreflektivitätsmessungen | 41 |
| 6.2 Auswertung der GISAXS Daten | 46 |
| 6.3 Temperaturabhängige Desorption und Adsorption von Proteinen auf Silizium | 47 |
| 6.4 Temperaturabhängiges Verhalten von Apolipoprotein A1 | 57 |
| 6.5 Proteinadsorption an der Flüssig/Gas-Grenzfläche | 61 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 6.5.1 | Die vertikale Struktur von Lipid- und Proteinschichten an der Flüssig/Gas-Grenzfläche und an Modellmembranen | 62 |
| 6.5.2 | Laterale Ordnung von Proteinen an der Flüssig/Gas-Grenzfläche und an Modellmembranen | 65 |
| 7 | Zusammenfassung und Ausblick | 69 |
| A | Anhang | 73 |
| A.1 | Werte aus den Volumenbruchprofilen der temperaturabhängigen Messungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche | 73 |
| A.2 | Konstruktionszeichnung der Probenzelle und des Probenhalters | 75 |
| | Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | 83 |
| | Literaturverzeichnis | 85 |
| | Publikationen und Konferenzbeiträge | 97 |
| | Danksagung | 99 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 101 |

Liste häufig verwendeter Abkürzungen

| | |
|---------|--|
| Apo A1 | Apolipoprotein A1 |
| BSA | Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin) |
| DPPA | 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt) |
| EDP | Elektronendichteprofil |
| Fib | Fibronektin |
| GID | Diffraktion unter streifendem Einfall (grazing incidence diffraction) |
| GISAXS | Kleinwinkelstreuung unter streifendem Einfall (grazing incidence small angle x-ray scattering) |
| Lys | Lysozym |
| OTS | Octadecyltrichlorosilane |
| pdb | Protein Datenbank (Protein data base) |
| RNase A | Ribonuklease A |
| RSA | Zufallsverteilte Adsorption (Random Sequential Adsorption) |
| XRR | Röntgenreflektivität (x-ray reflectivity) |

Liste verwendeter Variablen und Naturkonstanten

Variablen

| | |
|-------------|--|
| a_m | Fläche pro Lipid in einer Monolage |
| A_m | Fläche der Monolage |
| α | Winkel in der Streugeometrie |
| β | Absorption |
| c | Konzentration |
| d | Schichtdicke |
| D | Diffusionskonstante |
| δ | Dispersion |
| γ | Oberflächenspannung |
| η | Viskosität |
| G | Gibbs'sche Energie |
| Γ | Adsorbierte Menge |
| F_m | Freie Energie einer Monolage |
| H | Enthalpie |
| i | Nummer der Pixel im Detektor |
| k | Wellenvektor |
| J | Teilchenstrom |
| L | Abstand zwischen Probe und Detektor |
| λ | Wellenlänge |
| λ_W | Wärmeleitfähigkeit |
| μ | Absorptionskoeffizient |
| n_m | Anzahl der Lipide in einer Monolage |
| n | Brechungsindex |
| ϕ_m | Beitrag der einzelnen Lipide zur freien Energie einer Monolage |

| | |
|-----------------------------|---|
| $\phi_{\text{hyd,int,m-o}}$ | Beiträge einzelner Lipide zur freien Energie durch Hydratation, interne Wechselwirkung der Lipide bzw. zur oberen Phase |
| Φ | Wechselwirkungspotential |
| $\pi_{\text{hyd,int,m-o}}$ | Beiträge zum Oberflächendruck durch Hydratation, Wechselwirkung zwischen den Molekülen bzw. Wechselwirkung zur oberen Phase |
| Π | Oberflächendruck |
| p | Pixelgröße |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| q | Wellenvektorübertrag |
| r | Reflektionskoeffizient |
| R_F | Fresnelreflektivität |
| ρ | Elektronendichte |
| R_0 | Hydrodynamischer Radius |
| S | Entropie |
| σ | Rauigkeit |
| σ, σ_0 | Oberflächenspannung mit Lipid, Oberflächenspannung der Wasseroberfläche |
| T | Temperatur |
| T_d | Denaturierungstemperatur |
| t | Transmissionskoeffizient |
| θ | Winkel in der Streugeometrie |
| Θ | Bedeckungsgrad |
| z | Abstand von der Probenoberfläche |

Naturkonstanten

| | |
|-------|---|
| e | Elementarladung $1.602 \cdot 10^{-19}$ C |
| k_B | Boltzmannkonstante $1.381 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}$ |
| r_e | klassischer Elektronenradius $2.818 \cdot 10^{-15}$ m |

1 Einleitung

Proteine kommen im Alltag häufig vor, z.B. in Körperflüssigkeiten, in Lebensmitteln und in Gewässern. Dabei treten diese proteinhaltigen Lösungen mit verschiedenen Grenzflächen in Kontakt. Die Proteine in Lösung tendieren dazu, an Grenzflächen zu adsorbieren [1–7]. Grenzflächen zwischen Flüssigkeiten und Festkörpern, die Fest/Flüssig-Grenzflächen, treten z.B. bei Implantaten im Körper, bei Produktionsstätten in der Lebensmittelindustrie oder an Schiffskörpern auf. Adsorbierte Proteine können die Bildung von Biofilmen initiieren, was meist unerwünschte Folgen nach sich zieht [8]. Ein Biofilm auf einer Implantatoberfläche kann die Vermehrung von Bakterien begünstigen, sodass es zu einer Entzündungsreaktion kommt [9]. Auch in der Schiffsindustrie stellt die Biofilmbildung an Schiffsrümpfen ein großes Problem da. Durch die Anlagerung von Algen und Muscheln wird der Widerstand des Schiffes im Wasser erhöht, sodass sich der Treibstoffbedarf erhöht [10, 11]. Neben der Notwendigkeit Proteinschichten und Biofilme zu verhindern, können diese jedoch auch erwünscht sein. So können Biofilme an Implantaten als Schmiermittel dienen [12]. Auch das Einwachsen von Implantaten wird durch einen Biofilm aus Gewebezellen positiv begünstigt. Bei Biosensoren ist die spezifische Bindung von Proteinen an einer Fest/Flüssig-Grenzfläche sogar explizit erwünscht[1].

Proteine adsorbieren auch an der Grenzfläche zwischen einer Flüssigkeit und einer gasförmigen Phase wie z.B. Luft. Die Proteinadsorption an dieser Grenzfläche wird technisch eingesetzt, um beispielsweise Bier- und Milchschaum zu stabilisieren [13, 14].

Außerdem treten in natürlichen Prozessen häufig Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Membranen auf. So werden viele Prozesse im Körper durch Proteine an Membranen gesteuert. Diese sind dabei verantwortlich für den Transport ins Zellinnere [15] und durch den gesamten Körper. Sie spielen eine entscheidende Rolle beim Fettstoffwechsel [16] oder beim Zuckertransport im Gehirn [17]. Dass Proteine auch an Membranen adsorbieren, konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden [18–22]. In den natürlichen Prozessen ist es dabei notwendig, dass die Proteine ihrer Aufgabe entsprechend spezifisch an bestimmte Grenzflächen adsorbieren.

Um generell die meist unspezifische Proteinadsorption an Grenzflächen besser kontrollieren und gezielt einsetzen oder verhindern zu können, ist es notwendig, Proteinadsorption zu untersuchen. Zahlreiche Studien beschäftigen sich dabei mit der Proteinadsorption, wobei bisher die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig verstanden wurden [23]. Ein Problem beim Verständnis der Adsorption der Proteine an Grenzflächen ist die Vielzahl an Parametern, die diesen Prozess beeinflussen. In bisherigen Studien wurden bereits einige dieser Parameter systematisch untersucht. Eine Auswahl an möglichen Parametern sind dabei die Konzentration der Proteine [24, 25], der pH-Wert [26, 27], die Ionenstärke [26, 28], stabilisierende und destabilisierende Kosolventien wie Urea und Glycerol [29, 30], der Druck [31], die Temperatur [32, 33], elektrostatische Wechselwirkungen [18] oder langreichweitige Wechselwirkungen zu einem Substrat [34].

Des Weiteren ist der Einfluss von Wasser als natürliches Medium für Proteine nicht zu vernachlässigen [35], sodass nach Möglichkeit Proteinschichten *in situ* untersucht werden sollen. Dazu eignen sich für die Untersuchung von Proteinen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche Methoden wie Ellipsometrie [36–38], Oberflächen-Plasmonen-Resonanz [39, 40], Rasterkraftmikroskopie [39–41], Quarzwaagen [36, 42, 43], Elektrochemie [21], Radioaktivitätsmessungen [19, 44], Infrarotspektroskopie [45] und Streumethoden sowohl mit Neutronen als auch mit Röntgenstrahlung [33, 43, 46–50]. In vielen dieser Studien wurden dabei einfache Proteine wie Lysozym, Rinderserum-Albumin und RNase A als Modellproteine untersucht. Da in der Natur jedoch eine Vielzahl an unterschiedlichen Proteinen mit verschiedenen Eigenschaften, Funktionen und Formen vorkommen, stellt sich die Frage, in wie weit die bei der Untersuchung der einfachen Modellproteine gefundenen Mechanismen auf komplexere Proteine übertragbar sind. Das Ziel dieser Arbeit liegt darin, Mechanismen der Proteinadsorption an Grenzflächen tiefergehend zu verstehen.

In dieser Arbeit werden adsorbierte Proteinschichten an der Fest/Flüssig-Grenzfläche, an der Flüssig/Gas-Grenzfläche und an Modellmembranen untersucht. Bei den untersuchten Proteinen handelt es sich um die einfacheren Proteine Lysozym, Ribonuklease A, Rinderserum-Albumin und die komplexeren Proteine Fibronectin und Apolipoprotein A1. Als Substrate wurden hydrophile und hydrophobe Siliziumwafer verwendet. Bei den Experimenten an der Fest/Flüssig-Grenzfläche wurden alle oben genannten Parameter, bis auf die Temperatur, konstant gehalten. Bisherige temperaturabhängige Studien sind in Proteinlösung, welches als Proteinreservoir dient, durchgeführt worden [33]. Dabei lässt sich nicht feststellen, welchen Einfluss die Proteine aus der Lösung auf die adsorbierte Proteinschicht haben. Daher wurden die adsorbierten Proteinschichten an der Fest/Flüssig-Grenzfläche in zwei verschiedenen Umgebungen, Puffer und Proteinlösung, temperaturabhängig untersucht. Dieses Vorgehen ermöglicht es, zwischen thermodynamischen und kinetischen Mechanismen in der Proteinadsorption und -desorption zu unterscheiden. Dabei wurde in Puffer Desorption und in Proteinlösung Adsorption beobachtet. Durch die Verwendung verschiedener Proteine wurde außerdem der Einfluss der Konformationsstabilität und der elektrostatischen Wechselwirkungen bestimmt.

Neben den Experimenten an der Fest/Flüssig-Grenzfläche wurden auch Untersuchungen zur Proteinadsorption an der Flüssig/Gas-Grenzfläche und an Membranen durchgeführt. Die untersuchten Proteine sind Lysozym und Apolipoprotein A1 an der freien Wasser/Luft-Grenzfläche und an Modellmembranen. Für die Präparation von Modellmembranen wurde das Phospholipid DPPA, mit und ohne Cholesterol, und Stearinsäure verwendet. Neben der vertikalen Struktur der Proteinschichten wurde auch die laterale Struktur untersucht.

Für diese Untersuchungen eignen sich oberflächensensitive Röntgenstreuungsmethoden. Der Vorteil dieser Methoden ist, dass es möglich ist, Proteine an Grenzflächen *in situ* und

ohne Marker (*label free*) zu untersuchen. Röntgenstrahlung hat eine Wellenlänge in der Größenordnung der Dimension von Proteinen, sodass eine Auflösung der Proteinschichten möglich ist. Als Methoden wurden Röntgenreflektivität und Kleinwinkelstreuung unter streifendem Einfall verwendet, wodurch sowohl Informationen über das vertikale Elektronendichteprofil als auch die laterale Struktur von Proteinschichten gewonnen werden können.

Die Grundlagen der Methoden sind in **Kapitel 2** neben einer Einführung in die Grundlagen der verwendeten biologischen Systeme zusammengefasst. In diesem Kapitel wird die Streugeometrie und die physikalischen Grundlagen von Streuung an Oberflächen erläutert. Des Weiteren wird hier auf den Aufbau der Proteine, grundlegende Mechanismen zur Proteinadsorption und die Zusammensetzung von Modellmembranen eingegangen.

Die Beschreibung des experimentellen Aufbaus befindet sich in **Kapitel 3**. Die Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurde an den beiden Strahllinien BL 9 an DELTA (Dortmund) und BW1 an DORIS III (Hamburg) durchgeführt. Am Labordiffraktometer D8 wurden vorcharakterisierende Messungen durchgeführt. Um temperaturabhängige Untersuchungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche durchführen zu können, wurde eine Zelle konstruiert, deren Anforderungen und Ausführung ebenfalls in diesem Kapitel erläutert werden.

In **Kapitel 4** werden die verwendeten Probensysteme vorgestellt. Dazu gehören die Proteine, die Lipide für die Modellmembranen, das Cholesterol und die Präparation der Siliziumsubstrate.

Die experimentelle Durchführung an der Fest/Flüssig-Grenzfläche und der Flüssig/Gas-Grenzfläche wird in **Kapitel 5** beschrieben.

Die Ergebnisse der Experimente, deren Auswertung und die Diskussion dazu befinden sich in **Kapitel 6**. Im ersten Abschnitt wird auf die Vorgehensweise bei der Auswertung und die Fehlerbetrachtung eingegangen. Die Ergebnisse gliedern sich in drei Unterabschnitte. Dabei wird zunächst die temperaturabhängige Adsorption und Desorption von Proteinen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche diskutiert. Im Anschluss daran befinden sich die Ergebnisse des temperaturabhängigen Verhaltens von Apolipoprotein A1 auf einem hydrophoben Substrat. Abschließend werden die vertikalen und lateralen Strukturen von Proteinschichten an der Flüssig/Gas-Grenzfläche betrachtet.

Im **Kapitel 7** wird diese Arbeit zusammengefasst.

2 Grundlagen

In diesem Kapitel wird zum einen auf die untersuchten Probensysteme, Proteine und Membranen, und zum anderen auf die verwendeten Methoden, Röntgenreflektivität und Röntgenkleinwinkelstreuung unter streifendem Einfall, eingegangen. Zunächst werden in Abschnitt 2.1 die Grundlagen zu Proteinen erläutert. Dazu gehört die Proteinstruktur (Abschnitt 2.1.1) und die Proteinadsorption (Abschnitt 2.1.2). Dabei werden insbesondere thermodynamische und kinetische Aspekte der Proteinadsorption betrachtet. Da in dieser Arbeit auch mit Modellmembranen gearbeitet wurde, werden diese im Abschnitt 2.2 beschrieben. Für die Untersuchung von Proteinschichten werden oberflächensensitive Röntgenstreuungsmethoden verwendet. In Abschnitt 2.3 ist die Streugeometrie zusammenfassend dargestellt. Eine detaillierte Erläuterung der Theorie zur Röntgenreflektometrie (XRR) befindet sich im Anschluss daran in Abschnitt 2.4. Abschließend sind im Abschnitt 2.5 einige grundlegenden Aspekte der zweiten verwendeten Methode, Röntgenkleinwinkelstreuung unter streifendem Einfall (GISAXS), aufgeführt.

2.1 Proteine

Proteine sind Makromoleküle, die eine essenzielle Rolle in nahezu allen biologischen Prozessen spielen. Als Makromoleküle haben Proteine eine komplexe dreidimensionale Struktur, die, zusammen mit chemischen Gruppen, ihre Funktionalität ausmacht. Verlieren die Proteine diese spezifische dreidimensionale Struktur, z.B. durch Änderungen von der Temperatur, des Drucks oder des pH Wertes, verlieren sie auch ihre Funktionalität. Im Abschnitt 2.1.1 wird daher auf die Einzelheiten der Proteinstruktur eingegangen.

Proteine in Lösung tendieren dazu an Grenzflächen zu adsorbieren [1, 6, 8]. Dies kann z.B. an der Grenze zwischen Wasser- und Gasphase bzw. an Membranen auf Flüssigkeitsoberflächen oder an der Grenzfläche zwischen einem Festkörper und der flüssigen Umgebung geschehen. Diese Grenzflächen werden auch Flüssig/Gas- und Fest/Flüssig-Grenzfläche genannt. Adsorptionsprozesse besitzen große Bedeutungen bei Implantatoberflächen in der Medizin, als erster Schritt zur Biofilmbildung an Schiffsrümpfen, in der Lebensmittelindustrie oder bei funktionellen Anwendungen wie Biosensoren [2, 5, 23, 51].

2.1.1 Die Proteinstruktur

Die Grundbausteine der Proteine sind Aminosäuren. Sie bestehen aus organischen Verbindungen und besitzen mindestens eine Carboxylgruppe (-COOH) und eine Aminogruppe (-NH₂) (siehe Abb. 2.1a). Bei pH 7 liegen diese Gruppen meist als Zwitterionen vor, d.h. -COO⁻ und -NH₃⁺ (siehe Abb. 2.1b). Durch Abspaltung eines Wassermoleküls entsteht aus der Carboxylgruppe und der Aminogruppe eine Peptidbindung (siehe Abb. 2.1c). Die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren sind α -Aminosäuren, da die

Carboxylgruppe und die Aminogruppe an demselben Kohlenstoffatom (C_α) gebunden sind. Unterschieden werden die Aminosäuren anhand der verschiedenen Seitenketten (-R), die an das C_α Atom gebunden sind. Eine mögliche Unterteilung ist die Unterscheidung in unpolare, polar ungeladene und geladene Aminosäuren (siehe Abb. 2.2). Der Grad der Polarität der Aminosäuren ist verantwortlich für den amphiphilen Charakter der Proteine. Die Sequenz von Aminosäuren, die auch als Polypeptidkette bezeichnet wird, nennt man *Primärstruktur*. Ein Protein besteht meist aus etwa 50 bis 2000 Aminosäuren.

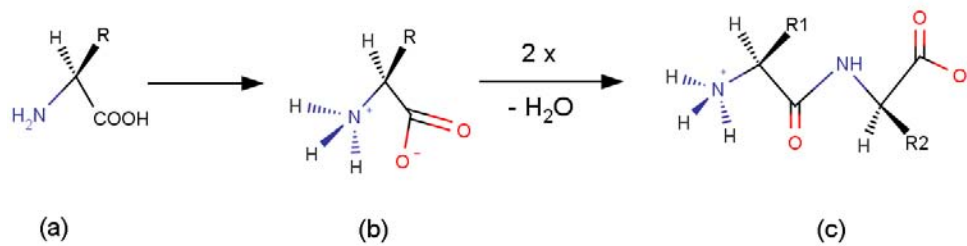


Abbildung 2.1: Die Grundbausteine der Proteine sind Aminosäuren (a). Sie liegen bei pH 7 als Zwitterionen vor (b). Jeweils zwei Aminosäuren bilden unter Abspaltung von Wasser eine Peptidbindung (c).

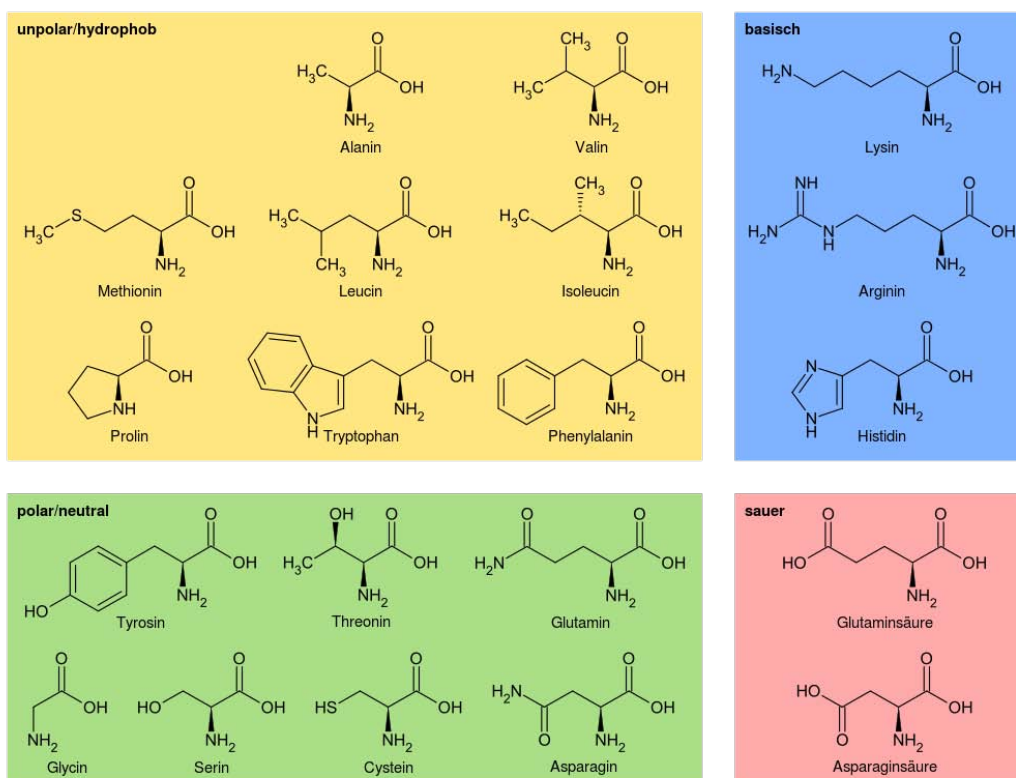


Abbildung 2.2: Unterteilung der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren nach unpolaren, polaren und ungeladenen, positiv und negativ geladenen Seitenketten (Entnommen aus [52]).

Zwischen den Aminosäuren einer Polypeptidkette können Quervernetzungen gebildet werden. Die polaren Teile der Aminosäuren führen zu der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen untereinander. Dabei entstehen zwei häufig vorkommende periodische Strukturen: die α -Helix und das β -Faltblatt. Bei einer α -Helix treten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einer Carboxylgruppe und der Aminogruppe der viertnächsten Aminosäure auf. Dadurch entsteht eine Helix, bei der das Rückgrat der Polypeptidkette das Innere bildet und die Seitenketten der Aminosäuren nach außen zeigen (siehe Abb. 2.3 oben). Bei dem β -Faltblatt ist die Polypeptidkette fast vollständig gestreckt und die Seitenketten von benachbarten Aminosäuren zeigen in entgegengesetzte Richtungen (siehe Abb. 2.3 unten). Die Stabilisierung dieser Struktur erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen mehreren solcher paralleler oder antiparalleler gestreckter Ketten. Das β -Faltblatt ist in Vergleich zu der α -Helix flach, wobei es auch leicht in sich verdreht sein kann. Diese Strukturelemente in der Polypeptidkette, wie die α -Helix oder das β -Faltblatt, werden als *Sekundärstrukturen* bezeichnet.

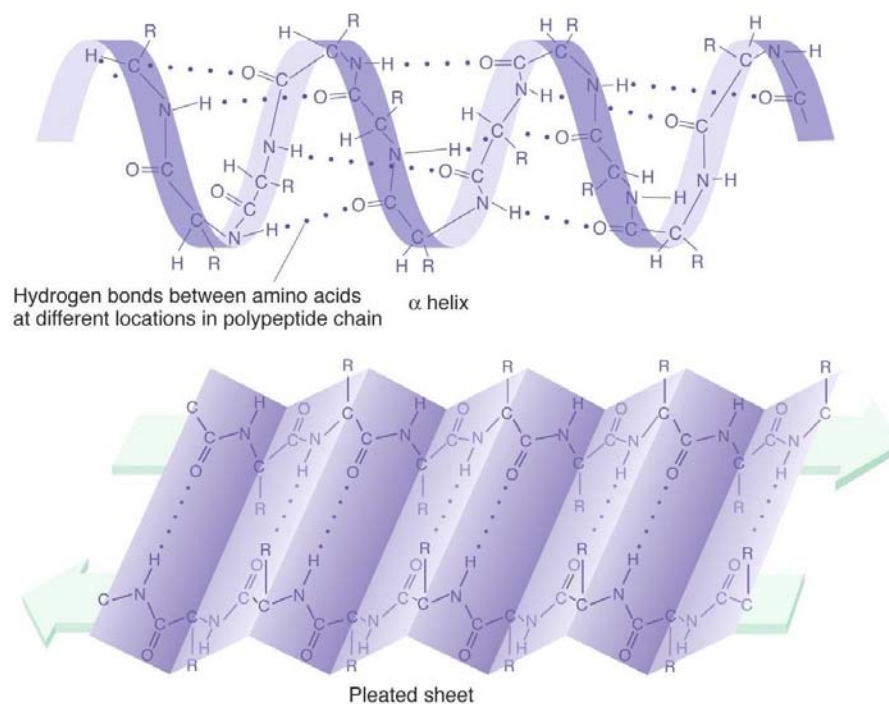


Abbildung 2.3: Die Sekundärstruktur beinhaltet typische Strukturen wie die α -Helix und das β -Faltblatt (Mit Genehmigung entnommen aus [53])

Die gesamte dreidimensionale Anordnung der Polypeptidkette nennt man *Tertiärstruktur*. Sie ist entscheidend für die Funktionalität eines Proteins. Für die gesamte Faltung der Polypeptidkette ist vor allem der hydrophobe Effekt von Bedeutung: die hydrophoben Seitenketten befinden sich beim gefalteten Zustand des Proteins im Inneren, während die polaren und geladenen Seitenketten der wässrigen Umgebung zugewandt sind. Dieser Zustand, bei dem die hydrophoben Reste nicht im Kontakt mit wässriger

Umgebung treten, ist thermodynamisch begünstigt. Eine Ausnahme von dieser Regel findet sich bei Membranproteinen, die für ihre Funktion eine andere Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Seitenketten benötigen.

Besonders starke Bindungen zwischen weit entfernten Aminosäuren sind Disulfidbindungen (-S-S-), die bei der Verknüpfung der -SH Gruppen von zwei Aminosäuren Cystein unter Abspaltung von zwei Wasserstoffatomen entstehen. Die dreidimensionale Struktur von Proteinen wird des Weiteren von *van-der-Waals* Kräften zwischen Kohlenstoffseitenketten beeinflusst. Je nach Stabilität dieser dreidimensionalen Struktur wird zwischen harten und weichen Proteinen unterschieden. Bei weichen Proteinen wird nur wenig Energie, z.B. durch Temperatur oder durch ein Wechselwirkungspotential mit einer Oberfläche, benötigt, um das Protein zu entfalten. Die harten Proteine werden meist durch Disulfidbrücken stabilisiert, wodurch eine deutlich höhere Energie benötigt wird, um die Tertiärstruktur zu zerstören. Dieser Vorgang der Entfaltung wird auch als *Denaturierung* bezeichnet, und kann sowohl reversibel als auch irreversibel sein. Besteht ein Protein aus mehreren Polypeptidketten, so ordnen sich diese Untereinheiten in einer definierten Weise, der *Quatärstruktur*, räumlich zueinander an.

Für detailliertere Informationen zur Proteinstruktur wird auf Lehrbücher der Biochemie verwiesen [54, 55], an denen sich dieses Kapitel orientiert.

2.1.2 Proteinadsorption

Proteine in Flüssigkeit tendieren dazu, an nahezu jeder Grenzfläche zu adsorbieren [5, 56, 57]. Dabei werden sie meist durch Diffusion in die Nähe der Grenzfläche transportiert (siehe Abb. 2.4 (1)). Adsorbieren die Proteine an der Grenzfläche, kommt es zu einem Konzentrationsgefälle in Richtung Oberfläche. Der Teilchenstrom zur Oberfläche J ist dann nach dem ersten *Fick'schen Gesetz* abhängig von dem Konzentrationsgradienten senkrecht zur Oberfläche und dem Diffusionskoeffizienten D

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial z}. \quad (1)$$

Der Diffusionskoeffizient hängt wiederum mit dem hydrodynamischen Radius der Proteine R_0 , der Viskosität der Flüssigkeit η , der *Boltzmannkonstante* k_B und der Temperatur T zusammen

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_0}. \quad (2)$$

In der Nähe der Oberfläche wirken die Kräfte des Wechselwirkungspotentials $\Phi(z)$ in Abhängigkeit des Abstandes von der Substratoberfläche z auf das Protein. Das kann sowohl zu einer Anziehung als auch zu einer Abstoßung der Proteine von der Grenzfläche führen.

Thermodynamik der Proteinadsorption

Thermodynamisch betrachtet setzen sich die treibenden Kräfte der Proteinadsorption aus enthalpischen und entropischen Beiträgen zusammen. Je niedriger die Energie im Gesamtsystem ist, desto energetisch stabiler ist das System. Ausgedrückt werden kann dies über die Änderung der freien *Gibbs'schen Energie* ΔG mittels

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S, \quad (3)$$

wobei ΔH die Änderung der *Enthalpie*, T die Temperatur und ΔS die Änderung der *Entropie* sind. Sinkt in einem System die Gibbs'sche Energie mit steigender Temperatur, ist dies ein Zeichen für einen entropiegetriebenen Prozess [32]. Die Enthalpie kann bei der Proteinadsorption z.B. durch elektrostatische Wechselwirkungen oder *van-der-Waals* Kräfte zwischen der Oberfläche und dem Protein sowie zwischen den Proteinen geändert werden. Das zugrundeliegende *Coulomb-Potential* hängt stark von der Elektronendichteverteilung, dem pH-Wert und der Salzkonzentration in der Lösung ab. Einen wichtigen Beitrag zur Proteinadsorption liefert der *hydrophobe Effekt*. Wie bereits im Abschnitt 2.1.1 eingeführt, weisen Proteine hydrophile und hydrophobe Bereiche auf. In den hydrophoben Bereichen können sich keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wassermolekülen und Protein ausbilden, sodass sich in der umgebenden Wasserphase stärkere Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, als es in einer freien Wasserlösung der Fall wäre. Somit kommt es zu einem geordneten Wasserkäfig um die hydrophoben Bereiche. Lagert sich das Protein an eine Oberfläche an, so können sich die Wassermoleküle, die vorher in dem Käfig gebunden waren, wieder wie in der freien Wasserlösung anordnen, wodurch die Entropie des Systems gesteigert wird. Der hydrophobe Effekt ist somit entropiegetrieben [58]. Neben dem hydrophoben Effekt und einer Änderung der Hydratationsschale kann auch eine Konformationsänderung die Entropie erhöhen.

Kinetik der Proteinadsorption

Bisher wurde nur der energetisch günstigste Zustand betrachtet. Um zu verstehen, wie das System in diesen Zustand gelangt, muss der Adsorptionsweg kinetisch betrachtet werden. Das einfachste Modell ist das *Langmuir-Modell*, in dem angenommen wird, dass es äquivalente und äquidistante Adsorptionsplätze auf einer Oberfläche gibt, kein Wechselwirkungspotential zwischen den Proteinen existiert und adsorbierte Proteine lateral immobil sind, aber wieder desorbieren können. Obwohl die Adsorption mit diesem Modell nur unzureichend beschrieben wird, ist dessen Verwendung weit verbreitet, da es sich mathematisch leicht beschreiben lässt. Dabei hängt die Änderung der Oberflächenbedeckung θ mit der Zeit t von den Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption k_{ad} und Desorption k_{de} , der Konzentration an der Grenzfläche c_G und der maximalen Bedeckung θ_{max} ab:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_{\text{ad}} \cdot c_G \left(1 - \frac{\theta}{\theta_{\text{max}}}\right) - k_{\text{de}} \cdot \theta. \quad (4)$$

Der maximale Bedeckungsgrad θ_{max} ist für kugelförmige Objekte in hexagonal dichtest gepackter Anordnung 91 %.

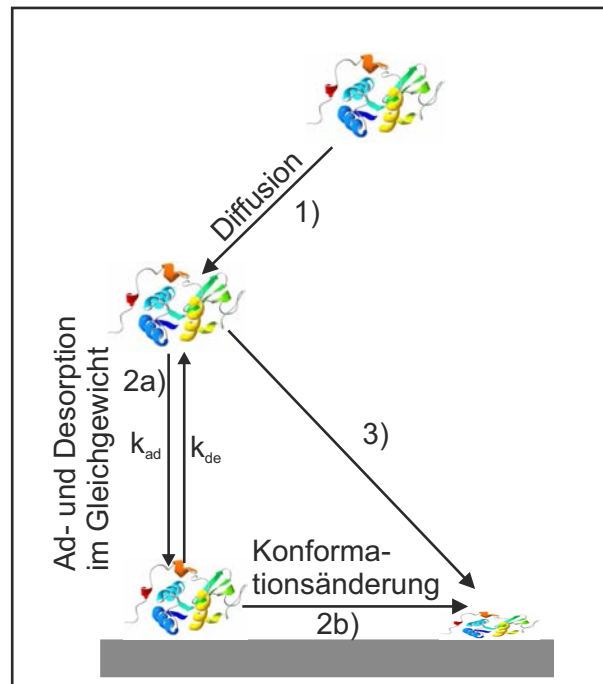


Abbildung 2.4: Proteinadsorption nach dem Zwei-Zustands-Modell: 1) Das Protein wird mittels Diffusion in die Nähe der Oberfläche transportiert. 2a) Das Protein ad- und desorbiert in nativer Konformation an der Grenzfläche. 2b) Das Protein verändert seine Konformation auf Grund des Wechselwirkungspotentials und ist irreversibel gebunden. 3) Das Protein verändert seine Konformation bereits bei der Adsorption.

Eine Erweiterung des Langmuir-Modells ist die *Random Sequential Adsorption* (zufällige fortlaufende Adsorption, RSA), bei dem die Proteine auf beliebige Stellen an der Oberfläche adsorbieren können, und nicht nur auf äquidistanten Adsorptionsplätzen. Der maximale Bedeckungsgrad nach diesem Modell beträgt 55 %.

Bei den bisherigen Modellen wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den Proteinen um starre Körper handelt. Da es sich bei Proteinen um (unterschiedlich) flexible Objekte handelt, können sie sich im Wechselwirkungspotential verformen. Die Verformung kann dazu führen, dass die Proteine nicht desorbieren können. Dieses Modell wird Zwei-Zustands-Modell (*Two-state Model*) genannt (siehe Abb. 2.4). Dabei gibt es zwei verschiedene Reaktionswege, entweder adsorbiert das Protein zunächst in nativer Konformation (2a) und verformt sich dann (2b), oder es verformt sich direkt bei der Adsorption (3).

Es gibt noch viele weitere Modelle zur Proteinadsorption an Grenzflächen. Sie beinhalten z.B. mehrere Konformationszustände auf der Oberfläche, Clusterbildung oder

kooperative Adsorption unter Berücksichtigung der Wechselwirkung von Proteinen untereinander. Eine Übersicht über die geläufigen Modellen findet sich im Review-Artikel von *Rabe et al.* [23]. Jedes Modell hat eine spezielle charakteristische Adsorptionskinetik. In den meisten Fällen wird die Adsorptionskinetik über die adsorbierte Masse Protein pro Fläche Γ mit der Zeit t gemessen. Häufig verwendete Methoden dazu sind optische Reflektometrie, Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (surface plasmon resonance, SPR) oder interne Totalreflexionsfluoreszenzspektroskopie (total internal reflection fluorescence spectroscopy, TIRFS) [8].

2.2 Modellmembranen

Membranen spielen eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen. So sind Zellen von einer semipermeablen Zellmembran umgeben. Viele Wechselwirkungen mit Proteinen finden an der Grenzfläche zu Membranen statt [16, 17]. Zahlreiche Transportproteine oder Transmembranproteine sind dafür verantwortlich, dass Stoffe wie z.B. Salzionen in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus transportiert werden [15]. Wasser kann hingegen auf Grund seines kleinen Durchmessers und fehlender Ladung durch die Membran hindurch diffundieren.

Eine natürliche Zellmembran besteht aus Phospholipiden, Cholesterol und Membranproteinen. Das Cholesterol gehört dabei zu den Lipiden und ist aus einem Sterolskelett mit einer Hydroxylgruppe aufgebaut. Der Aufbau einer Membran wird jedoch durch die Phospholipide bestimmt. Phospholipide bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einer hydrophoben Schwanzgruppe. In einer wässrigen Umgebung lagern sich die Phospholipide in einer selbstangeordneten Phospholipiddoppelschicht an. Dabei zeigen die hydrophoben Schwanzgruppen zueinander. Diese Doppelschicht wird dabei im wesentlichen durch den hydrophoben Effekt stabilisiert, wobei *van-der-Waals*-Wechselwirkungen und elektrostatische Wechselwirkung von eventuell geladenen Kopfgruppen einen zusätzlichen Beitrag leisten. Das Cholesterol lagert sich in diese Phospholipidschicht ein und führt zu einer weiteren Stabilisierung der Membran [59]. In Abhängigkeit der Position von hydrophilen und hydrophoben Bereichen im Protein befindet es sich an der Oberfläche der Membran und ragt in die Membran und/oder in die umgebende wässrige Umgebung, oder es geht durch die gesamte Phospholipidschicht hindurch. Eine grafische Zusammenfassung des Aufbaus einer Zellmembran befindet sich in Abbildung 2.5.

Um Prozesse an Membranen unter reproduzierbaren Bedingungen untersuchen zu können, werden künstliche Modellmembranen hergestellt. Dabei wird die selbstanordnende Eigenschaft der Phospholipide an der Wasser/Luft Grenzfläche ausgenutzt: werden in Chloroform gelöste Phospholipide auf eine Wasseroberfläche aufgespreitet, so verdampft das Lösungsmittel und die Phospholipide ordnen sich, mit der Kopfgruppe in Richtung Wasserphase gerichtet, an. Befinden sich genügend Lipide auf der Oberfläche, so bildet sich eine Monolage aus, auch *Langmuir-Film* genannt. Die Phospholipide verändern

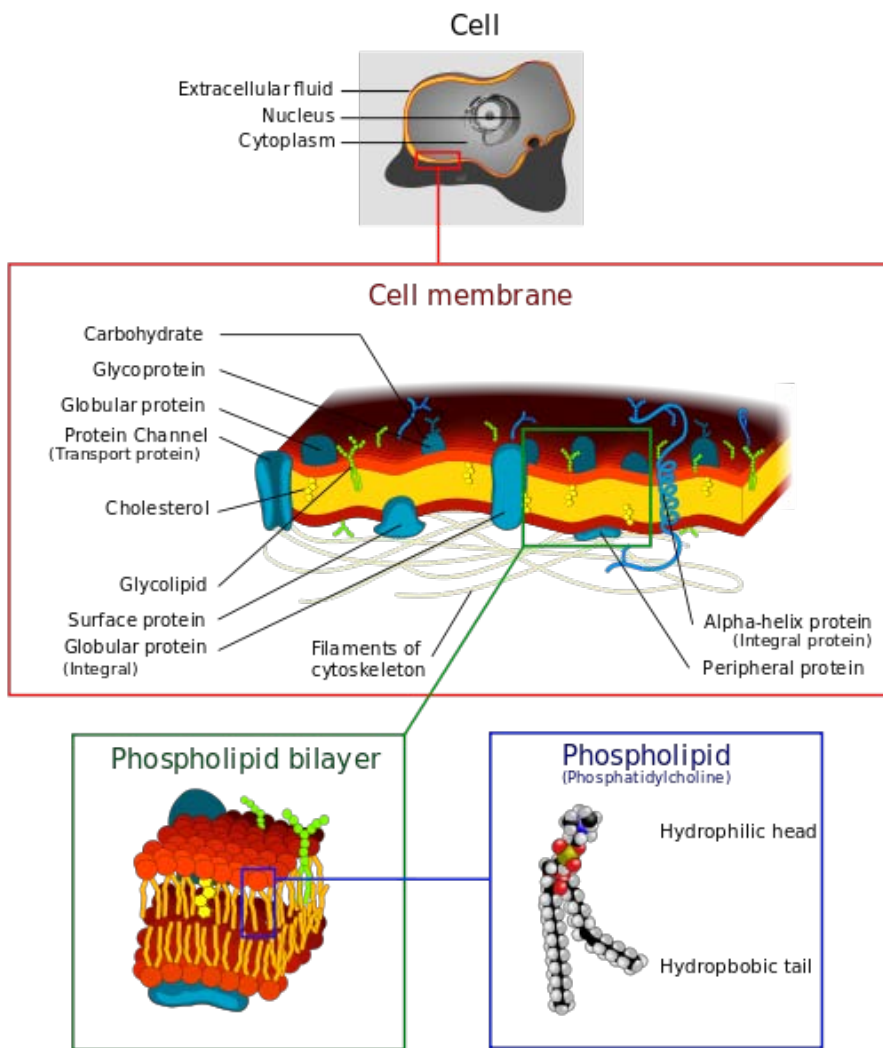


Abbildung 2.5: Vereinfachter Aufbau einer Zellmembran, bestehend aus einer Phospholipiddoppelschicht, verschiedenen Proteinen und Cholesterol. (Entnommen aus [60])

dabei die Oberflächenspannung σ der Flüssigkeit. Der Oberflächendruck

$$\Pi = \sigma_0 - \sigma \quad (5)$$

ist dann die Differenz zwischen der Oberflächenspannung von Wasser σ_0 und der Oberflächenspannung mit Lipid σ .

Der Oberflächendruck ist definiert über die erste Ableitung der freien Energie der Monolage F_m nach der Fläche A [61]

$$\Pi_m(a_m) = -\frac{\partial F_m(a_m)}{\partial A}. \quad (6)$$

Die freie Energie setzt sich dabei zusammen aus der Anzahl der Lipide in der Monolage n_m und dem Beitrag eines einzelnen Lipids zur freien Energie ϕ_m

$$F_m = n_m \phi_m(a_m), \quad (7)$$

wobei ϕ_m von der Fläche a_m , die ein Lipid zur Verfügung hat, abhängt und die Gesamtfläche der Monolage $A_m = n_m \cdot a_m$ ist.

Dabei beinhaltet $\phi_m(a_m)$ die Beiträge der Hydratation der Kopfgruppen $\phi_{\text{hyd}}(a_m)$, der Interaktion zwischen den Lipiden $\phi_{\text{int}}(a_m)$ und der Interaktion zwischen den Lipiden und der Phase oberhalb der Lipidphase $\phi_{\text{m-o}}(a_m)$

$$F_m = n_m \phi_{\text{hyd}}(a_m) + n_m \phi_{\text{int}}(a_m) + n_m \phi_{\text{m-o}}(a_m). \quad (8)$$

Mit der Ableitung aus Gleichung 6 ergibt sich für den Oberflächendruck der Ausdruck

$$\Pi_m = \pi_{\text{hyd}} + \pi_{\text{int}} + \phi'_{\text{m-o}} \approx \pi_{\text{hyd}} + \pi_{\text{int}}, \quad (9)$$

wobei π_{hyd} und π_{int} jeweils die Beiträge zur Oberflächenspannung aus der Hydratation der Kopfgruppen und der Wechselwirkung zwischen den Lipiden sind. Der Term $\phi'_{\text{m-o}}$ ist zu vernachlässigen, da dieser die van-der-Waals Wechselwirkung zwischen den hydrophoben Schwanzgruppen mit der Luft berücksichtigt, die nahezu null ist.

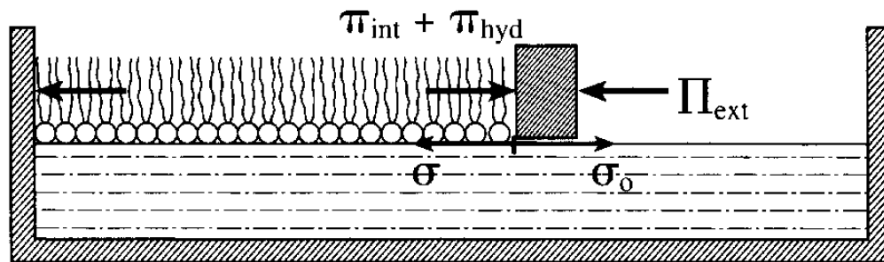


Abbildung 2.6: Oberflächendruck einer Monolage Lipid, die über eine Barriere komprimiert wird. Der Oberflächendruck ergibt sich aus der Differenz der Oberflächenspannung der reinen Wasseroberfläche σ_0 und der Oberflächenspannung mit Lipid σ . Der extern angelegte Oberflächendruck Π_{ext} wirkt dem internen Oberflächendruck entgegen, der sich aus der internen Wechselwirkung zwischen den Lipiden π_{int} und der Hydratation der Kopfgruppe π_{hyd} zusammensetzt. Mit Genehmigung entnommen aus [61].

Der Oberflächendruck kann durch Kompression mit einer Barriere eingestellt (siehe Abb. 2.6) und mit einer *Wilhelmy-Waage* [63] (siehe Abb. 3.5) gemessen werden. In Abhängigkeit des Oberflächendrucks treten verschiedene Phasen auf, die in Abbildung 2.7 dargestellt sind. Befinden sich nur wenige Lipide auf der Oberfläche, sodass jedes Molekül mehrere 100 \AA^2 zur Verfügung hat, ist keine Ordnung und keine Wechselwirkung zwischen den Lipiden vorhanden. Diese Phase lässt sich als zweidimensionales Gas beschreiben. Wird der Film komprimiert, tritt die entspannte Flüssigphase auf. Auch hier ist keine laterale Struktur vorhanden, weder bei den Kopfgruppen, noch bei

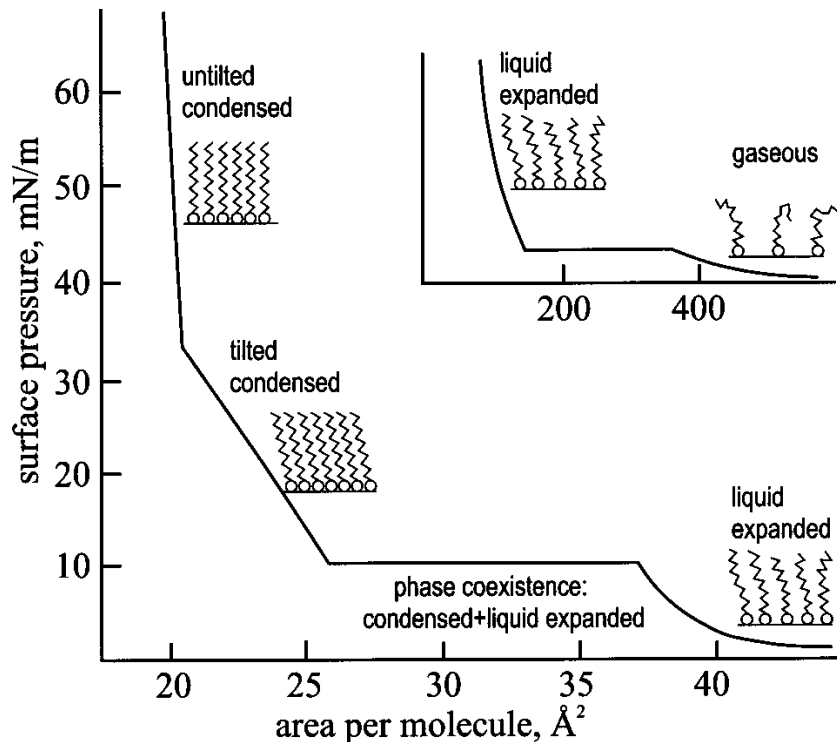


Abbildung 2.7: Phasenübergänge für Lipidmonolagen in Abhängigkeit des Oberflächen- und Flächenpro-Molekül-Druckes. Um eine Modellmembran herzustellen, wird ein Oberflächen- und Flächenpro-Molekül-Druck eingestellt, der der geeigneten kondensierten Phase entspricht. Entnommen mit Genehmigung aus [62] wie folgt: Kaganer, Möhwald, und Dutta, *Reviews of Modern Physics*, 71, 779, 1999. Copyright (1999) von der American Physical Society.

der Konformation der Schwanzgruppen. Bei einer weiteren Komprimierung entsteht die geeignete kondensierte Phase. Hierbei ist eine laterale Ordnung mittels Diffraktion (GID) messbar. Die Schwanzgruppen sind parallel ausgerichtet, aber geneigt. Zwischen der flüssigen expandierten Phase und der geeigneten kondensierten Phase existiert ein Bereich, in dem beide Phasen auftreten. Wird die Fläche pro Molekül weiter verringert, stellen sich die Schwanzgruppen senkrecht zur Oberfläche. Das ist die ungeneigt kondensierte Phase.

2.3 Streugeometrie für oberflächensensitive Röntgenstreuungsmethoden

Bei der Untersuchung von Proteinschichten an Grenzflächen muss die verwendete Messmethode drei wesentliche Anforderungen erfüllen:

1. Sie muss ein Auflösungsvermögen in der Größenordnung der untersuchten Objekte, bei den betrachteten Grenzflächen also im Bereich von \AA , besitzen.
2. Sie muss oberflächensensitiv sein.
3. Sie muss eine Wasserphase durchdringen können (bei den Messungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche).

Röntgenstrahlung im Bereich von einigen keV hat eine entsprechende Wellenlänge, und

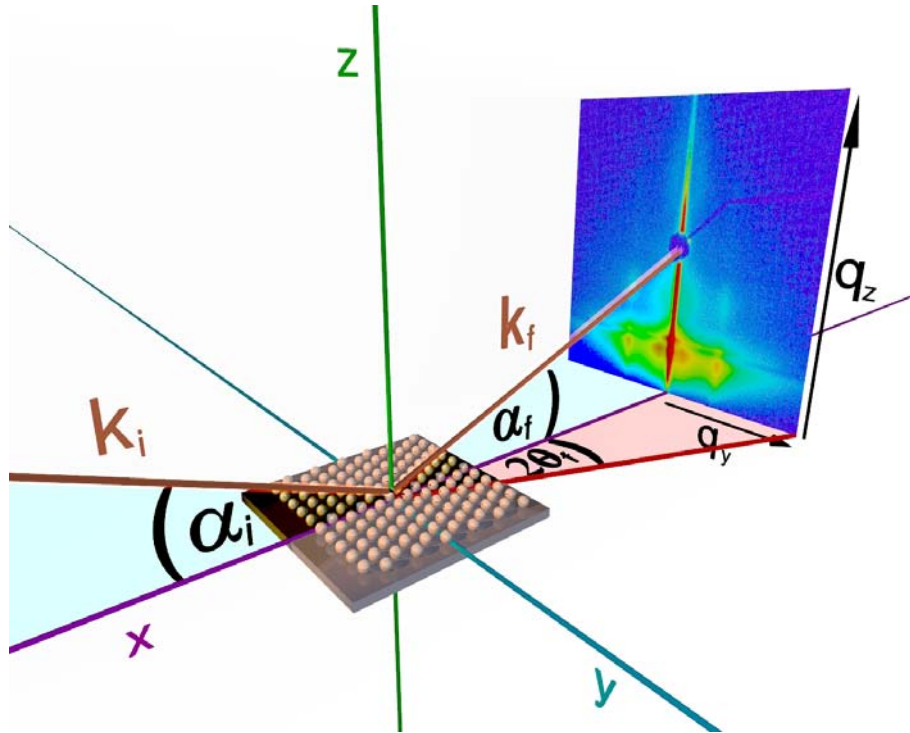


Abbildung 2.8: Streugeometrie für Reflexivitäten (XRR) und Kleinwinkelstreuung unter streifendem Einfall (GISAXS). Mit Genehmigung entnommen aus [64].

erfüllt somit die erste Anforderung. Die Oberflächensensitivität wird erreicht, indem die Probenoberfläche unter kleinen Winkeln (bis zu wenigen Grad), bestrahlt wird, sodass das Signal hauptsächlich von der zu untersuchenden Proteinschicht stammt [65]. Für die Messungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche muss zudem die Wasserphase von 2 cm Dicke durchdrungen werden, weswegen mit einer Photonenenergie von 27 keV gearbeitet wurde (genauere Erläuterung siehe Abschnitt 3.1).

Die beiden verwendeten Methoden sind Röntgenreflektivität (XRR) und Röntgenkleinwinkelstreuung unter streifendem Einfall (GISAXS). Die generelle Streugeometrie für beide Methoden ist in Abbildung 2.8 abgebildet. Der Röntgenstrahl mit dem Wellenvektor \vec{k}_i trifft unter dem Einfallswinkel α_i auf die Probenoberfläche und wird gestreut mit dem Wellenvektor \vec{k}_f . Die gestreute Welle wird beschrieben durch zwei Winkel, α_f , der sich in der Streuebene des einfallenden Strahles befindet, und $2\theta_f$, der in der Ebene der Probenoberfläche liegt.

Der Wellenvektorübertrag \vec{q} ist definiert als

$$\vec{q} = \vec{k}_f - \vec{k}_i, \quad (10)$$

und lässt sich über die Winkel ausdrücken mit

$$\vec{q} = k \begin{bmatrix} q_x \\ q_y \\ q_z \end{bmatrix} = \frac{2\pi}{\lambda} \begin{bmatrix} \cos(\alpha_f) \cos(2\theta_f) - \cos(\alpha_i) \\ \cos(\alpha_f) \sin(2\theta_f) \\ \sin(\alpha_f) + \sin(\alpha_i) \end{bmatrix}. \quad (11)$$

Der Betrag des Wellenvektors k ist über die Wellenlänge λ der verwendeten Röntgenstrahlen mit

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (12)$$

bestimmt. Die Wellenvektorüberträge werden auch nach der parallelen und der senkrechten Komponente bezeichnet und lassen sich mit $q_{\parallel} = \sqrt{q_x^2 + q_y^2}$ und $q_{\perp} = q_z$ aus den Wellenvektorüberträgen der Raumrichtungen bestimmen.

Bei der Röntgenreflektivität wird die Intensität des reflektierten Röntgenstrahls in Abhängigkeit vom Einfallswinkel untersucht. Dabei gilt $\alpha_i = \alpha_f$ und $2\theta_f = 0$. Bei dem Wellenvektorübertrag bleibt dann ein Beitrag q_z senkrecht zur Probenoberfläche übrig

$$q_z = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\alpha_i). \quad (13)$$

Die Röntgenreflektivität enthält somit Informationen über die Struktur der Probe in z Richtung, wobei lateral über die bestrahlte Fläche gemittelt wird.

Im Gegensatz dazu wird bei GISAXS mit einem zweidimensionalen Detektor das gesamte Streubild bei einem konstanten Einfallswinkel aufgenommen. Damit lassen sich Informationen über die Probenoberfläche in lateraler Richtung ermitteln.

2.4 Röntgenreflektivität (XRR)

Reflektivität an ideal glatten Grenzflächen

Elektromagnetische Wellen werden an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex n nach den *Fresnel'schen Formeln* zum Teil transmittiert und zum Teil reflektiert (siehe Abb. 2.9).

Der Brechungsindex wird dabei für Frequenzen ω , die deutlich über der Resonanzfrequenz ω_0 liegen (was für die hier verwendeten Systeme und Photonenenergie gegeben ist) beschrieben durch

$$n = 1 - \delta + i\beta. \quad (14)$$

Die Dispersion δ geht dabei in den Realteil des Brechungsindex ein und kann mit

$$\delta = \frac{\lambda^2}{2\pi} r_e \rho \quad (15)$$

bestimmt werden. Dabei ist λ die Wellenlänge, r_e der klassische Elektronenradius und ρ die Elektronendichte. Die Dispersion ist abhängig vom Material und der Photonen-

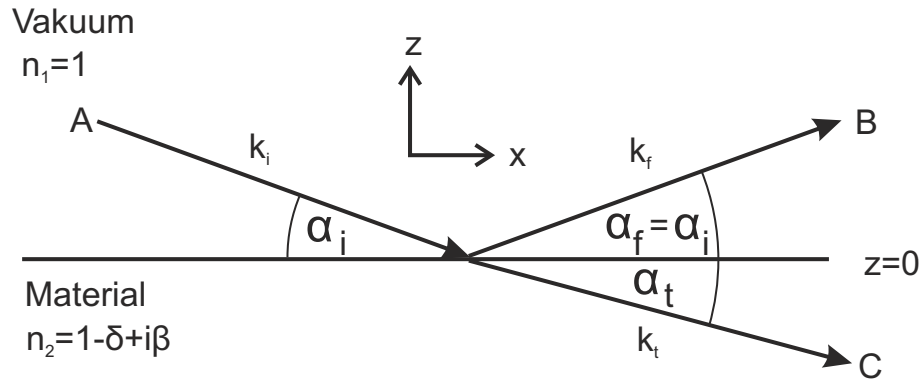


Abbildung 2.9: Beim Auftreffen einer planaren elektromagnetischen Welle auf eine Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex n wird ein Teil der Welle reflektiert, und der andere Teil transmittiert. (nach [65])

energie und ist einheitenlos. Sie liegt für Röntgenstrahlung im Bereich von $10^{-5} - 10^{-7}$. Der Imaginärteil des Brechungsindex beschreibt die Absorption β und lässt sich mit dem energie- und materialabhängigen Absorptionskoeffizienten μ über

$$\beta = \frac{\lambda}{4\pi} \mu \quad (16)$$

berechnen.

Nach dem *Snellius'schem Brechungsgesetz* gilt für den Zusammenhang zwischen einfallendem und transmittiertem Strahl

$$n_1 \cos(\alpha_i) = n_2 \cos(\alpha_t). \quad (17)$$

Unterhalb eines kritischen Winkels α_c wird die Welle vollständig reflektiert, d.h. $\alpha_t=0$. Der Zusammenhang zwischen dem kritischen Winkel der Totalreflexion und den Brechungsindizes ist für eine Grenzfläche im Vakuum mit $n_1 = 1$ und $n_2 = n$

$$\cos(\alpha_c) = n. \quad (18)$$

Für kleine δ gilt dann

$$\alpha_c \approx \sqrt{2\delta} \propto \lambda \sqrt{\rho}. \quad (19)$$

Drückt man die Position des kritischen Winkels in $q_{c,z}$ aus (siehe Gl. 13), so gilt

$$q_{c,z} = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\alpha_c) \approx 4\sqrt{\pi r_e \rho}. \quad (20)$$

Für eine ideal glatte Oberfläche lassen sich mit den *Fresnel'schen Formeln* die Anteile der reflektierten und transmittierten Welle mit dem Reflexions- und Transmissionskoeffizienten r und t in Abhängigkeit der Wellenvektoren angeben zu

$$r = \frac{k_{i,z} - k_{t,z}}{k_{i,z} + k_{t,z}} \quad (21)$$

und

$$t = \frac{2k_{i,z}}{k_{i,z} + k_{t,z}}. \quad (22)$$

Dabei ist

$$k_{i,z} = k \cdot \sin(\alpha_i) \quad (23)$$

und

$$k_{t,z} = n \cdot k \cdot \sin(\alpha_t) \stackrel{\text{Gl. 17}}{=} k \sqrt{n_2^2 - \cos^2(\alpha_i)}. \quad (24)$$

Da für Röntgenstrahlung der Realteil des Brechungsindex ungefähr eins ist, muss bei den Koeffizienten nicht zwischen p- und s-polarisierter Strahlung unterschieden werden [65]. Werden Gleichungen 23 und 24 in Gleichung 21 eingesetzt, wobei der Zusammenhang $\sin^2(\alpha) + \cos^2(\alpha) = 1$ und die Gleichungen 18 und 13 berücksichtigt werden, so erhält man

$$r = \frac{q_{c,z}^2}{\left(q_{i,z} + \sqrt{q_{i,z}^2 - q_{c,z}^2}\right)^2}, \quad (25)$$

wobei $q_{i,z}$ die z -Komponente des Wellenvektorübertrages des einfallenden Strahles ist.

Für eine ideal glatte Oberfläche ist die Reflektivität durch das Betragsquadrat des Reflexionskoeffizienten bestimmt mit

$$R_F = |r|^2 = \left| \frac{q_{c,z}^2}{\left(q_{i,z} + \sqrt{q_{i,z}^2 - q_{c,z}^2}\right)^2} \right|^2. \quad (26)$$

Dabei wird R_F *Fresnelreflektivität* genannt. Die gemessene Reflektivität wird häufig auf R_F normiert, um kleinere Änderungen hervorzuheben. Anhand der Gleichung 26 kann die Reflektivität in drei Bereiche unterteilt werden: (I) Für $q_{i,z} \leq q_{c,z}$ tritt Totalreflexion auf, da die Wurzel imaginär bzw. 0 wird und $R_F = 1$ ist, (II) eine Abnahme der reflektierten Intensität für $q_{c,z} < q_{i,z} < 3q_{c,z}$ und (III) ab $q_{i,z} \approx 3q_{c,z}$ kann $q_{c,z}$ in der Wurzel vernachlässigt werden und man erhält den Zusammenhang

$$R_F = \left(\frac{q_{c,z}}{2q_{i,z}} \right)^4. \quad (27)$$

Die drei Bereiche der Fresnelreflektivität und der Abfall der Intensität mit $q_{i,z}^{-4}$ sind in Abbildung 2.10 dargestellt.

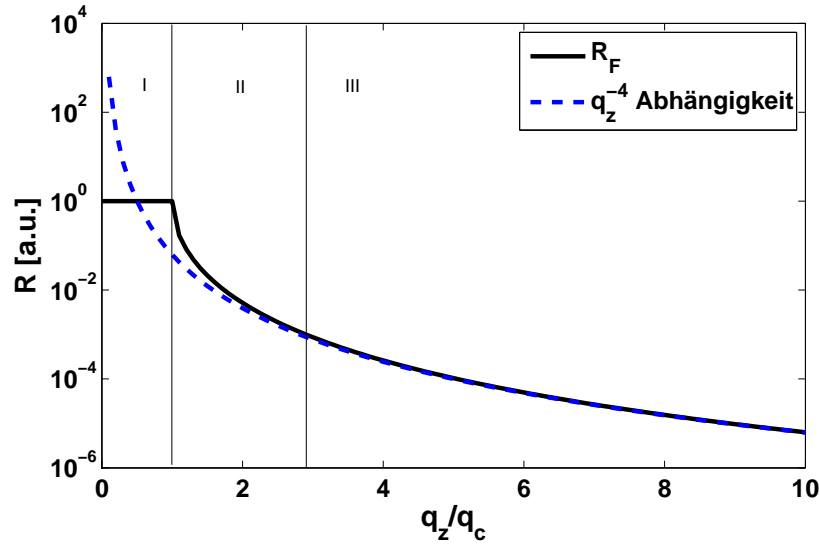


Abbildung 2.10: Die Fresnelreflektivität R_F (Gl. 26) für eine ideal glatte Grenzfläche lässt sich in drei Bereiche unterteilen: (I) Unterhalb des kritischen Winkels tritt Totalreflexion auf und R ist eins, (II) oberhalb von q_c fällt R ab und (III) ab dem dreifachen kritischen Winkel nähert sich die Reflektivität asymptotisch einer q_z^{-4} Abhängigkeit an (Gl. 27). (Nach [47])

Reflektivität von Schichtsystemen

Bisher wurde nur die Reflektivität einer ideal glatten Grenzfläche betrachtet. In der Realität besteht ein Probensystem meist jedoch aus einem Substrat und ein oder mehreren Schichten, die zunächst weiterhin als ideal glatt betrachtet werden. An jeder Grenzfläche zwischen diesen Schichten tritt sowohl Transmission als auch Reflexion auf. Daher wird, wie in Abbildung 2.11, nun ein System aus N Schichten betrachtet. Jede Schicht wird mit dem Index j bezeichnet. Die Schichten $j = 1$ und $j = N + 1$ sind das Vakuum bzw. das Substrat. Diese beiden Schichten sind halb-unendlich in z -Richtung. Die Grenzfläche zwischen dem Vakuum ($j = 1$) und der ersten Schicht ($j = 2$) wird definiert als $z_1 = 0$. Die Reflexion und die Transmission der Schicht j wird mit R_j bzw. T_j benannt ($j = 1 \dots N$). Dabei ist $T_1 = 1$ und $R_{N+1} = 0$. Die Dicke der Schicht d_j ist gegeben durch $z_{j-1} - z_j$. Jede Schicht j hat den Brechungsindex n_j . Mit dem rekursiven Algorithmus nach Parratt [66] lässt sich für jede Schicht j das Verhältnis X_j zwischen Transmission und Reflexion berechnen zu

$$X_j = \frac{R_j}{T_j} = e^{-2i k_{z,j} \cdot z_j} \frac{r_{j,j+1} + X_{j+1} \cdot e^{2i k_{z,j+1} \cdot z_j}}{1 + r_{j,j+1} X_{j+1} \cdot e^{2i k_{z,j+1} \cdot z_j}}. \quad (28)$$

Dabei ist

$$r_{j,j+1} = \frac{k_{z,j} - k_{z,j+1}}{k_{z,j} + k_{z,j+1}} \quad (29)$$

der Reflexionskoeffizient der Schicht j mit der z -Komponente des Wellenvektors $k_{z,j} = k \sqrt{n_j^2 - \cos^2(\alpha_i)}$ analog zu Gleichung 24.

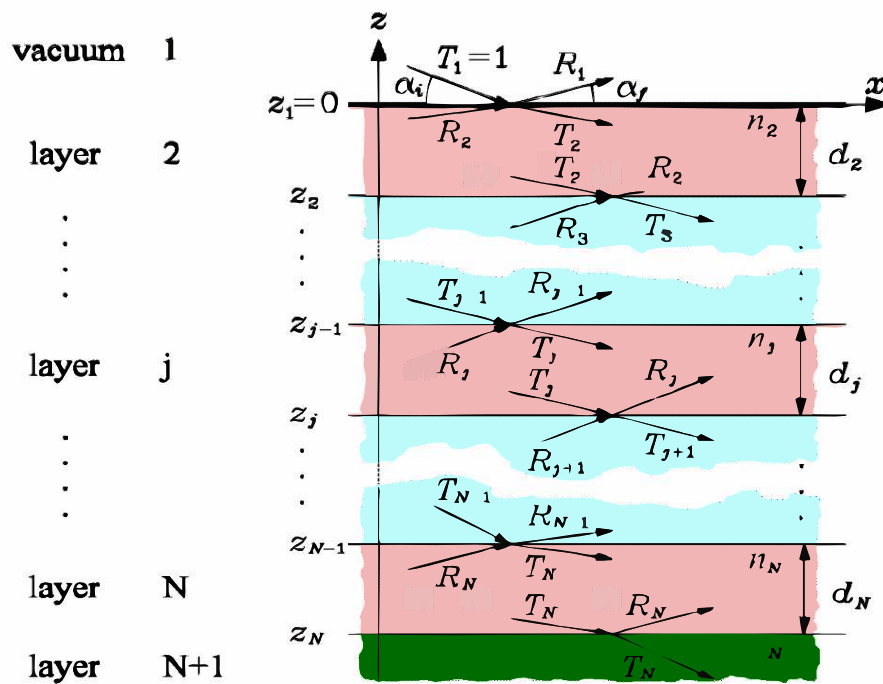


Abbildung 2.11: Reflexion und Transmission an Schichtsystemen nach dem Parratt-Algorithmus. (Bild nach [65])

Beispiel: Einschichtsystem

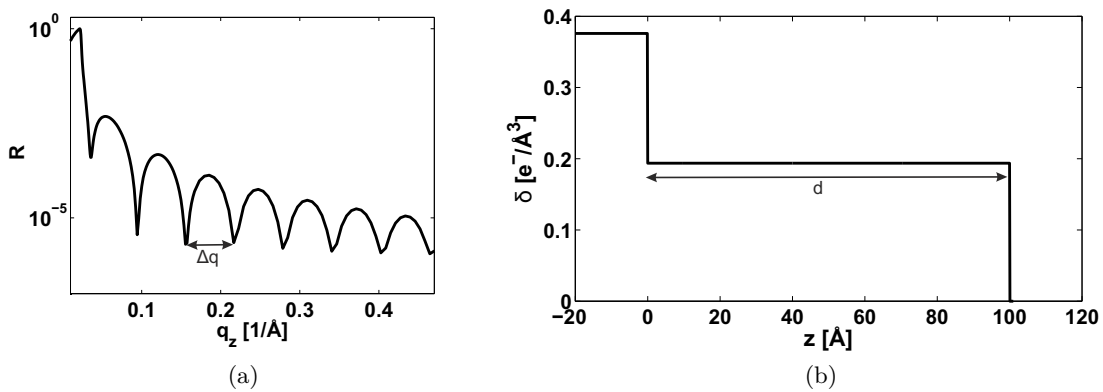


Abbildung 2.12: Reflektivität (a) für ein Schichtsystem mit einer Schicht und ideal glatten Grenzflächen mit dem dazugehörigen Elektronendichteprofil (b). Die Schicht führt zu Oszillationen in der Reflektivität.

Eine Schicht mit der Dicke d sorgt mit konstruktiver und destruktiver Interferenz für Oszillationen in der Reflektivität, die *Kiessig-Oszillationen* [67]. In Abbildung 2.12 sind die Reflektivität und das Elektronendichteprofil für ein System mit einer Schicht mit ideal glatten Grenzflächen dargestellt. Ein Elektronendichteprofil gibt die lateral

gemittelte Elektronendichte in Abhängigkeit der Höhe z wieder. Mit dem Abstand zwischen zwei Oszillation Δq lässt sich die Schichtdicke d über

$$d = \frac{2\pi}{\Delta q} \quad (30)$$

bestimmen.

Rauigkeit

Bisher wurde in den Betrachtungen davon ausgegangen, dass die Grenzflächen ideal glatt sind. In der Realität tritt eine Rauigkeit σ auf. Da bei Reflektivitäten lateral über die Probenoberfläche gemittelt wird und somit nur die z -Komponente des Wellenvektorübertrages berücksichtigt wird, wird die Rauigkeit mit einer Wahrscheinlichkeitsdichte P um die mittlere Position z_0

$$P(z) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(z-z_0)^2}{2\sigma^2}} \quad (31)$$

verknüpft. Diese Verteilung entspricht einem *Gauss-Profil* mit der Halbwertsbreite σ (siehe Abb. 2.13).

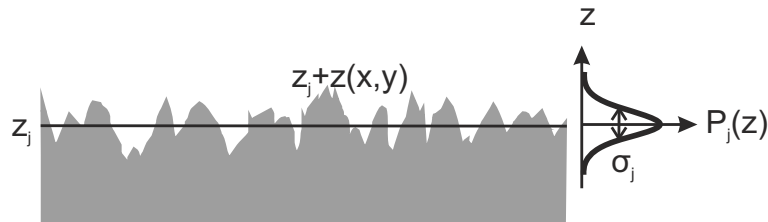


Abbildung 2.13: Die Rauigkeit einer Grenzfläche lässt sich mit einem Gauss-Profil der Wahrscheinlichkeitsdichte verknüpfen (Bild nach [65]).

Die Reflektivität an einer rauen Grenzfläche lässt sich beschreiben mit

$$R(q_z) = R_F(q_z) e^{-q_z^2 \sigma^2}. \quad (32)$$

Eine raue Grenzfläche spiegelt sich dementsprechend über eine exponentielle Abnahme in der reflektierten Intensität mit q_z^2 wieder.

Das effektive Dichtemodell

Betrachtet man nun komplexere Systeme, wie Proteinschichten an Grenzflächen, so lassen sich diese nicht mehr über einzelne Schichten mit einer Rauigkeit definieren. Das gilt für alle Systeme, in denen die Rauigkeit in der Größenordnung der Schichtdicke liegt. Wie bereits in Gleichung 15 beschrieben, hängen die Dispersion, und damit der Brechungsindex und somit auch die Reflektivität, im Wesentlichen von der Elektronendichte ab. Wird bei einem System mit Rauigkeiten in der Größenordnung der

Schichtdicke das Elektronendichteprofil wie bisher beschrieben, so ist dieses nicht kontinuierlich [65]. Eine Lösung dafür ist das effektive Dichtemodell. Es beschreibt die effektive Elektronendichte, die bei der Reflektivität berücksichtigt wird, in der Tiefe z . Um dennoch den Parratt-Algorithmus anwenden zu können, wird das Elektronendichteprofil in dünne Scheiben ohne Rauigkeit mit der Dicke ϵ unterteilt auf die der Parratt-Algorithmus angewendet wird (siehe Abb. 2.14).

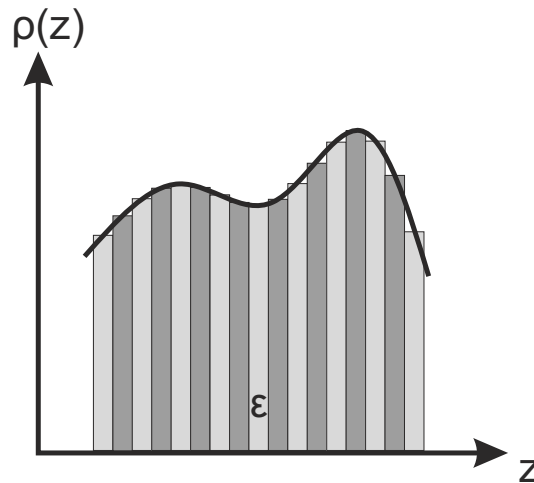


Abbildung 2.14: Effektives Dichtemodell (Bild nach [65])

Kinematische Näherung

Bisher wurde die Reflektivität auf optische Weise betrachtet. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die *kinematische Näherung* [65, 68] anzuwenden. Die kinematische Näherung gilt für den Bereich in dem der Streuquerschnitt für die gestreute Strahlung klein ist, da dort Mehrfachstreuung vernachlässigt werden kann. In der Nähe des kritischen Winkels ist dies nicht gegeben. Die kinematische Näherung beschreibt die Reflektivität ausreichend gut ab einem Winkel $\alpha_i > 3\alpha_c$. Unter Verwendung der kinematischen Näherung (auch *1. Born'sche Näherung* genannt) lässt sich die Reflektivität als Fouriertransformierte der Änderung des Elektronendichteprofiles beschreiben mit

$$R(q_z) = R_F \left| \frac{1}{\Delta\rho} \int \frac{d\rho(z)}{dz} e^{-iq_z z} dz \right|^2. \quad (33)$$

Gleichung 33 beinhaltet die Fresnelreflektivität R_F für ein ideal glattes Substrat (Gl. 26), den Elektronendichtekontrast $\Delta\rho$ zwischen Substrat und umgebendem Medium und die Änderung der Elektronendichte senkrecht zur Oberfläche.

2.5 Kleinwinkelstreuung mit Röntgenstrahlung unter streifendem Einfall (GISAXS)

Mit GISAXS lässt sich die laterale Struktur von Oberflächen untersuchen. Die gestreute Intensität ist dabei unter Anderem abhängig vom Formfaktor F und dem Strukturfaktor S . Der Formfaktor berücksichtigt dabei die Form der Partikel an denen gestreut wird. Da bei GISAXS unter dem Einfallswinkel $\alpha_i < \alpha_c$ gearbeitet wird, darf die Mehrfachstreuung nicht vernachlässigt werden. Dies wird in der so genannten Distorted Wave Born Approximation (DWBA) berücksichtigt. Der Strukturfaktor ist von der lateralen Anordnung der Partikel an der Oberfläche abhängig. Insbesondere die Ausbildung von regelmäßigen 2D Gittern an der Grenzfläche führt zu einem Interferenzmuster im Streubild. Da in dieser Arbeit nur eine qualitative Auswertung der gemessenen GISAXS-Bilder stattfindet, soll an dieser Stelle nicht weiter auf die theoretische Beschreibung der Intensitätsverteilung in GISAXS eingegangen werden. Eine tiefere Beschreibung findet sich in den Referenzen [64, 69, 70].

3 Experimenteller Aufbau

Die Experimente in dieser Arbeit wurden überwiegend an den beiden Synchrotronstrahlungsquellen DELTA (Dortmund) und DORIS III (Hamburg) durchgeführt. Die beiden verwendeten Messplätze, BL9 und BW1, werden in den Abschnitten 3.1 und 3.2 näher erläutert. Einige vorcharakterisierende Messungen wurden am Labordiffraktometer D8 durchgeführt, welches im Abschnitt 3.3 beschrieben ist. Des Weiteren wurde für die temperaturabhängigen Messungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche eine Probenzelle entwickelt, auf die in Abschnitt 3.4 näher eingegangen wird.

3.1 Strahllinie BL9 an DELTA

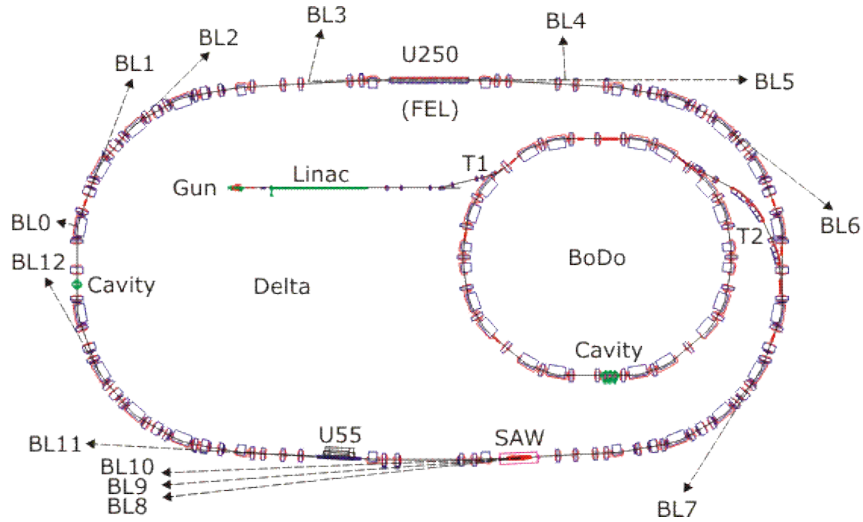


Abbildung 3.1: Schema zur Dortmunder Elektronenspeicherringanlage (DELTA) bestehend aus dem Linearbeschleuniger LINAC, dem Boosterbeschleuniger BoDo und dem Speicherring. Die verwendete Strahllinie BL9 befindet sich an dem supraleitenden asymmetrischen Wiggler (SAW) [71].

Für die Röntgenreflektivitätsmessungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche wurde der 27 keV-Röntgenreflektivitätsaufbau an der Strahllinie BL9 am Synchrotron DELTA verwendet. Ein schematischer Aufbau von DELTA ist in Abbildung 3.1 zu sehen. Es werden Elektronen auf etwa 1.5 GeV beschleunigt und ein Elektronenstrom von bis zu 130 mA im Speicherring gespeichert [72]. Die Röntgenstrahlung an der Beamline BL9 wird mit Hilfe eines supraleitenden asymmetrischen Wigglers (SAW) erzeugt. Um aus dem Röntgenspektrum monochromatische Röntgenstrahlung zu bekommen, befindet sich ein Silizium-(311)-Doppelkristall Monochromator im Strahlengang. Damit können Energien von 4 keV bis 30 keV mit einer Energieauflösung von $\Delta E/E = 10^{-4}$ eingestellt werden. Der zweite Monochromatorkristall bewirkt eine laterale Fokussierung. Bei einem XRR Experiment sind die Strahldimensionen am Ort der Probe $0.2 \times 1 \text{ mm}^2$ [73]. Die optischen Elemente sind in Abbildung 3.2a schematisch dargestellt.

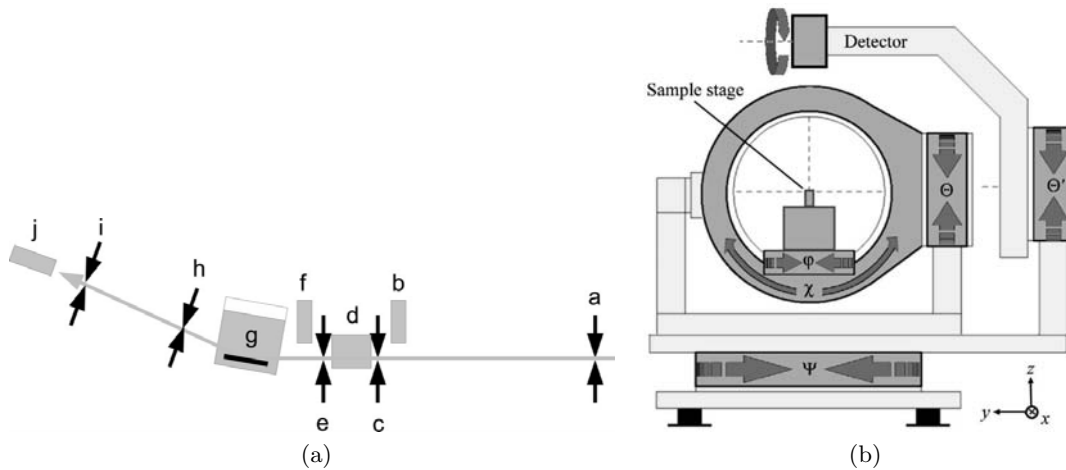


Abbildung 3.2: 27 keV Röntgenreflektivitätssetup an der Strahllinie BL9 mit a) dem Aufbau mit Strahlenoptik und b) dem Huber 6-Kreis-Diffraktometer zum Einstellen der Winkel an der Probe ($\Theta = \alpha_i$) und dem Detektor ($\Theta' = 2\Theta = \alpha_f$). In Abbildung a) bezeichnen a, c, e und i Schlitzsysteme, b den Detektor zur Bestimmung des einfallenden Flusses, d das Autoabsorbersystem und den Fastshutter, g die Probe und j den Detektor. Mit Genehmigung von IUCr entnommen aus [74](a) und [75] (b).

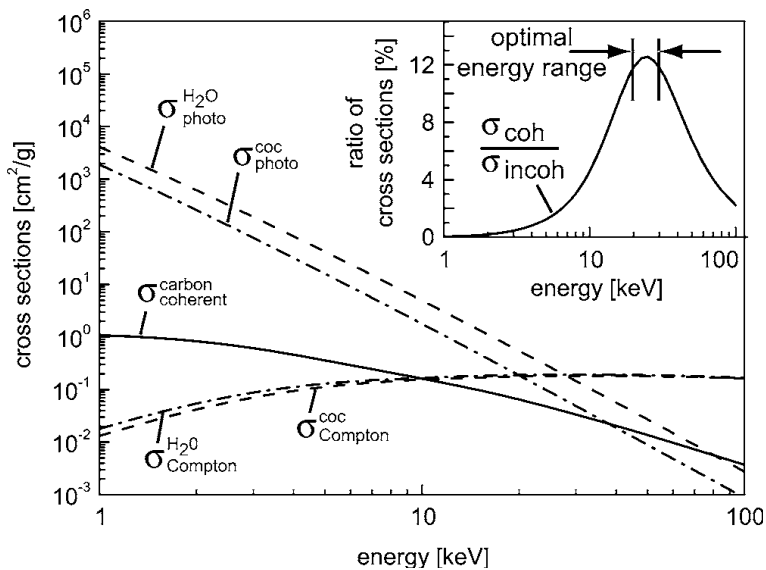


Abbildung 3.3: Das Verhältnis der Streuquerschnitte bei kohärenter Streuung zur gesamten Streuung für verschiedene Energien zeigt, dass die Verwendung von Röntgenstrahlung mit einer Energie von 27 keV optimal für die Untersuchung von Proteinen ist. Mit Genehmigung entnommen aus [76].

Die eingestellte Energie von 27 keV (entspricht der Wellenlänge $\lambda = 0.459 \text{ \AA}$) ist der optimale Kompromiss zwischen möglichst großem Photonenfluss und hoher Energie, wobei bei 100 mA ein Photonenfluss von typischerweise $7 \cdot 10^8 \text{ Photonen/s}\cdot\text{mm}^2$ erreicht wird [74]. Des Weiteren besteht zum einen bei 27 keV die Möglichkeit eine Wasserphase zu durchdringen und somit Experimente in wässriger Lösung durchzuführen. Zum anderen sind

bei dieser Energie möglichst geringe Strahlenschäden an den Proteinen zu erwarten. Ein Maß für ein möglichst intensives Messsignal bei geringst möglichen Strahlenschäden durch inkohärente Streuung ist das Verhältnis des kohärenten Streuquerschnitts zum totalen Streuquerschnitt. Aus Abbildung 3.3 kann entnommen werden, dass dieses Verhältnis für kohlenstoffhaltige Verbindungen (wie z.B. Aminosäuren) bei 27 keV optimal ist [76].

Die Probenzelle befindet sich in einem Huber 6-Kreisdiffraktometer, wie in Abbildung 3.2b dargestellt ist, wodurch die Probe im Winkel und in alle Raumrichtungen einjustiert werden kann. Für die Reflektivität wird in $\Theta - 2\Theta$ Geometrie gemessen, wie im Abschnitt 2.4 zur Röntgenreflektometrie näher erläutert wurde. Zur Messung der reflektierten Intensitäten wird ein NaI-Detektor verwendet.

3.2 Strahllinie BW1 an DORIS III (DESY)

Die Experimente an der Flüssig/Gas-Grenzfläche wurden an der Beamline BW1 an der Synchrotronstrahlungsquelle Doris III (DESY, Hamburg) durchgeführt. Die Röntgenstrahlung wurde mit einem Wiggler erzeugt. Mit einem Beryllium-Doppelkristall-Monochromator [77] wird die verwendete Energie 9.5 keV, was einer Wellenlänge von 1.307 Å entspricht, eingestellt. Eine Skizze der Strahlenoptik von BW1 befindet sich in Abbildung 3.4.

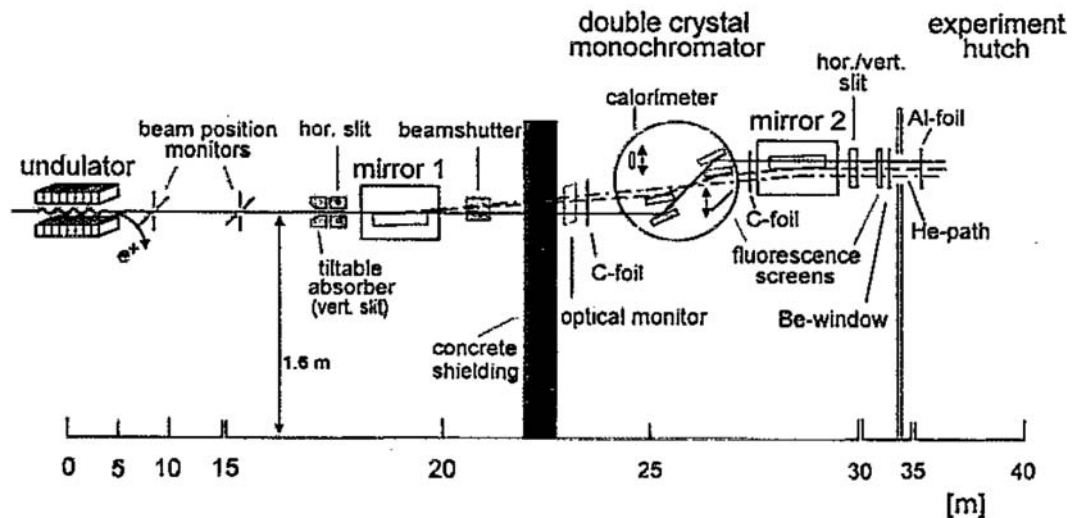


Abbildung 3.4: Aufbau der Beamline BW1 mit der Strahloptik (Bild mit Genehmigung entnommen aus [77])

Der Aufbau von BW1 beinhaltet einen Langmuirtrog inklusive einer Barriere aus Teflon mit Langmuirwaage zum kontrollierten Komprimieren einer Lipidschicht (siehe Abb. 3.5). Der einfallende Röntgenstrahl wird auf die Flüssigkeitsoberfläche gelenkt, da diese selbst nicht kippbar ist. Die möglichen Messmethoden waren XRR, GID (grazing incident diffraction, Diffraction unter streifendem Einfall) und GISAXS. Die Kombination

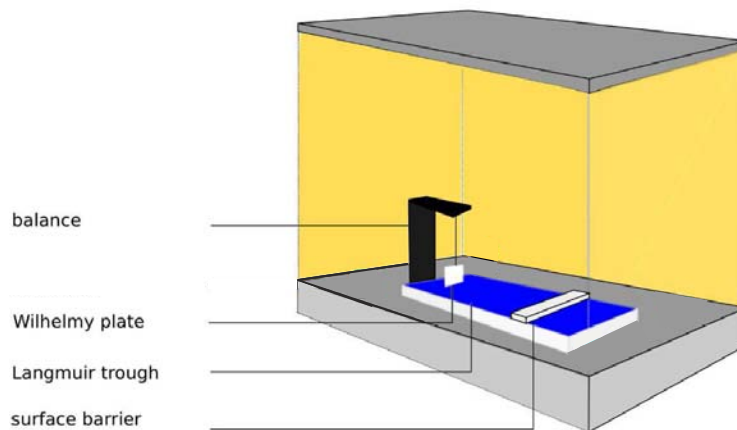


Abbildung 3.5: Skizze des Langmuirtrogs mit der Langmuirwaage inklusive der Wilhelmy-Platte (Filterpapier) zum Messen des Oberflächendruckes und der Barriere zum Komprimieren eines Lipidfilmes. Der Trog befindet sich in einem mit Helium gespülten Container mit Kaptonfenstern. (Abgeändertes Bild aus [78])

dieser Messmethoden ermöglicht sowohl die Untersuchung der vertikalen als auch der lateralen Struktur einer Grenzfläche. Mit GID und GISAXS lassen sich unterschiedliche Größenskalen in der lateralen Ordnung untersuchen, wobei sich GID für die Untersuchung der lateralen Struktur von kleinen Molekülen, wie Phospholipiden, eignet. Hingegen wird GISAXS verwendet, um die laterale Verteilung von größeren Molekülen, wie Proteinen, zu detektieren. In dieser Arbeit wurde neben XRR auch GISAXS als Methode verwendet. Die Röntgenreflektivitäten wurden mit einem Punktdetektor aufgenommen, wohingegen für die GISAXS Messungen ein 2D Detektor (Pilatus 100k) benötigt wurde. Die Überbelichtung des Detektors wurde vermieden, indem vor dem Primärstrahl ein Beamstop positioniert wurde. Um die Streustrahlung an Luftmolekülen möglichst gering zu halten, befindet sich der Langmuirtrog in einem mit Helium gespülten Container mit Kaptonfenstern.

3.3 Labordiffraktometer D8

Einige vorcharakterisierende Reflektivitäten der Substrate für die Experimente an der Fest/Flüssig-Grenzfläche wurden an Luft an dem Labordiffraktometer Bruker D8 ADVANCE gemessen. Die Röntgenstrahlung wird hier mit einer Kupferanode erzeugt. Die Energie der $\text{Cu}_{K\alpha}$ Linie beträgt $E = 8048 \text{ eV}$, was einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{W}} = 1.54 \text{ \AA}$ entspricht. Der Röntgenstrahl wird mit einem Göbelspiegel vertikal fokussiert und mit einem Spaltsystem verkleinert. Die Spaltgröße in der Höhe beträgt vor der Probe 0.1 mm und 0.2 mm vor dem Punktdetektor.

3.4 Aufbau für die Experimente an der Fest/Flüssig-Grenzfläche

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Probenzelle konstruiert, die es ermöglicht *in situ* Röntgenreflektivitätsmessungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche während des Heizens durchzuführen. Als Material wurde Kupfer gewählt, da Kupfer die zweithöchste Wärmeleitfähigkeit mit $\lambda = 401 \text{ W/m}\cdot\text{K}$ unter den Metallen besitzt [79]. Aufgrund der hohen Wärmeleitfähigkeit wird eine möglichst gleichmäßige Wärmeverteilung in der Probenzelle gewährleistet. Alle Flächen, die in Kontakt mit der Flüssigkeit kommen können, wurden vergoldet, um eine möglichst inerte Oberfläche zu erhalten. Damit der Röntgenstrahl in die Zelle gelangen kann, bestehen die Fenster aus $25 \mu\text{m}$ dicker Kaptonfolie. Die Temperaturregelung wird über elektrische Heizfolien der Firma Minco (HK5568R25, $2 \times 25 \Omega$), einen Temperatursensor Pt100 in der Mitte der Flüssigkeit und eine Feedbackschleife mittels eines LakeShore 330 Temperaturkontrollers realisiert. Zur Stabilisierung der Temperatur ist weiterhin unter der eigentlichen Probenzelle eine Wasserkühlung befestigt. Die Temperatur der Wasserkühlung wird mittels eines Wärmetauschers geregelt. Die Substrate werden in einen vergoldeten Kupferhalter eingelegt. Das Substrat wird mit zwei verschiebbaren Platten, die mit Schrauben fixiert werden, in seiner Position gehalten, ohne es dabei zu verspannen. Der Halter ist dabei für Substrate mit einer Größe von $10 \times 19 \text{ mm}^2$ und einer Dicke von 1 mm optimiert. Eine eigens für diese Probenzelle konstruierte Adapterplatte ermöglicht die drehpunktgerechte Positionierung der Probenzelle in dem 6-Kreis-Diffraktometer (siehe Abbildung 3.2b). Die Konstruktionspläne der Probenzelle und des Probenhalters befinden sich im Anhang A.2. Ein Foto der heizbaren Probenzelle im Diffraktometer ist in Abbildung 3.6 abgebildet.

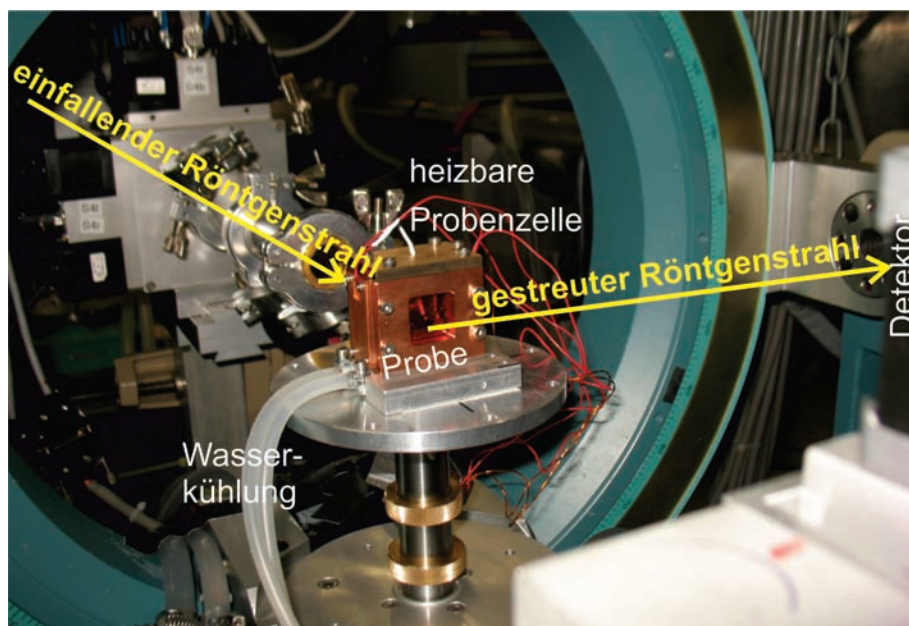


Abbildung 3.6: Foto der heizbaren Probenzelle im Diffraktometer

4 Probensysteme

In diesem Kapitel werden die Probensysteme vorgestellt. Im ersten Abschnitt werden die verwendeten Proteine erläutert, wobei in Tabelle 4.1 einige wichtige Parameter der Proteine zusammengefasst sind. Im zweiten und dritten Abschnitt werden die Moleküle, die für die Modellmembranen eingesetzt wurden, eingeführt. Der vierte Abschnitt geht auf die Präparation der Siliziumsubstrate für die Experimente an der Fest/Flüssig-Grenzfläche ein.

4.1 Proteine

Lysozym

Lysozym (Lys) ist ein in vielen Studien verwendetes globuläres Protein, das aus Hühnereiweiß isoliert wird. Es tritt beim Menschen z.B. in der Tränenflüssigkeit oder im Speichel auf und hat eine antibakterielle Wirkung, indem es enzymatisch die Zellwände der Bakterien aufbricht. Es ist mit einer molaren Masse von $M = 14.3\text{kDa}$ und 129 Aminosäuren ein kleines Protein mit den Maßen $30 \times 30 \times 45 \text{ \AA}^3$. Aufgrund der Ausbildung von vier Disulfidbrücken weist es eine hohe Konformationsstabilität auf und zählt somit zu den harten Proteinen. Der isoelektrische Punkt pI bei 25°C befindet sich bei einem Wert größer als 11 [81], sodass die Nettoladung bei $\text{pH } 7$ positiv ist. Die Denaturierungstemperatur liegt bei $T_{d,\text{Lys}} = 71^\circ\text{C}$, wenn ein pH -Wert von 7 eingestellt ist [82]. In Abbildung 4.1 ist die dreidimensionale Struktur von Lysozym abgebildet.



Abbildung 4.1: Lysozym (nach [80])

Ribonuklease A

Ribonuklease A (RNase A) gehört ebenso wie Lysozym zu den häufig verwendeten Modellproteinen. Das in dieser Arbeit verwendete Protein wurde aus der Bauchspeicheldrüse vom Rind (bovine pancreas) gewonnen. RNase A kann RNA-Stränge zerteilen. Mit einer molaren Masse $M = 13.6\text{kDa}$ und 124 Aminosäuren ist es ebenfalls ein kleines Protein mit den Maßen $22 \times 28 \times 38 \text{ \AA}^3$ (siehe Abb. 4.2).

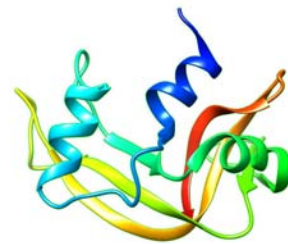


Abbildung 4.2: Ribonuklease A (nach [83])

Der isoelektrische Punkt ist pI 9.3 [84], sodass auch RNase A bei pH 7 positiv geladen ist. Die Denaturierungstemperatur ist mit $T_{d,RNase\ A} = 68\text{ °C}$ [85] etwas geringer als bei Lysozym. Es weist ebenfalls aufgrund von Disulfidbrücken eine hohe Konformationsstabilität auf und gehört zu den harten Proteinen.

Rinderserum-Albumin

Das Protein human serum albumin (HSA) tritt im menschlichen Blut auf und dient zur pH -Stabilisierung des Blutes und zum Transport z.B. von Fettsäuren. Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin, BSA) ist strukturell ähnlich und wird in der Forschung eingesetzt, da es problemlos aus Rinderblut gewonnen werden kann. Im Vergleich zu Lys und RNase A ist BSA mit 589 Aminosäuren und einer molaren Masse von $M = 66.3\text{ kDa}$ ein relativ großes Protein. BSA tritt in Abhängigkeit des pH -Wertes in verschiedenen



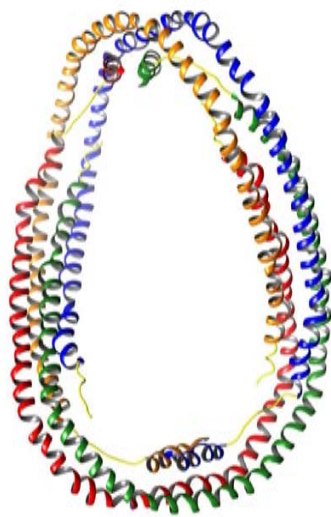
Abbildung 4.3: Rinderserum-Albumin (nach [86])

Konformationen auf, wobei es bei pH 7 in der sogenannten „N-Form“ auftritt, die in etwa eine Herzform hat (siehe Abb. 4.3). Die Maße sind dabei $80 \times 69 \times 30\text{ Å}^3$. Im Vergleich zu Lys und RNase A ist die Konformationsstabilität deutlich geringer, sodass BSA zu den weichen Proteinen zählt. Das spiegelt sich auch in der etwas geringeren Denaturierungstemperatur von $T_{d,BSA} = 57\text{ °C}$ [87] wieder. Der isoelektrische Punkt liegt mit pI 4.8 [88] unterhalb von pH 7, was zu einer negativen Gesamtladung bei pH 7 führt. Der in Tabelle 4.1 angegebene Wert für das Volumen wurde aus der Struktur, jedoch ohne Wasserstoffatome, ermittelt.

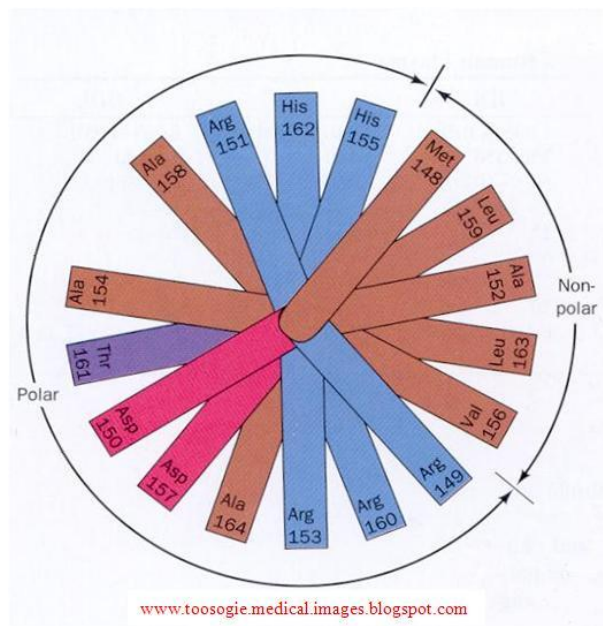
Apolipoprotein A1

Das Apolipoprotein A1 (Apo A1) wird aus menschlichem Blut gewonnen und weist mit 243 Aminosäuren eine molare Masse von 29 kDa auf. Es liegt somit in der Größe zwischen BSA und den beiden kleineren Proteinen Lys und RNase A. Das Protein setzt sich aus vier hufeisenförmigen Untereinheiten zusammen, die eine leicht verdrehte, kreisförmige Quartärstruktur mit den Maßen $135 \times 90 \times 60\text{ Å}^3$ bilden [89]. Zur Bestimmung des Volumens und der Elektronendichte (siehe Tab. 4.1) wird ein Ellipsoid mit den Maßen des Proteins angenommen. Apo A1 gehört zu den Lipoproteinen hoher Dichte (High Density Lipoprotein, HDL) und ist für den Fettstoffwechsel essentiell, da es Fettsäuren und Cholesterin transportiert. Durch den Aufbau des Proteins mit hydrophilen und hydrophoben Bereichen auf der Außenseite, lagert es sich an der Grenzfläche von

(Zell-)membranen an. Die α -Helizes des Apolipoproteins haben ihre polaren und unpolaren Aminosäurereste jeweils auf gegenüberliegenden Seiten, sodass die α -Helizes ähnlich wie Baumstämme auf der Membranoberfläche schwimmen können [55]. Der isoelektrische Punkt liegt mit pI 5.7 [90], ebenso wie bei Fib und BSA, unterhalb von pH 7, sodass das Apo A1 bei pH 7 effektiv negativ geladen ist. Kalorimetrische Untersuchungen von Apo A1 zeigen ein breites Signal im Bereich zwischen $25^\circ C$ und $90^\circ C$ mit einem Maximum bei $T_{d,Apo} = 57^\circ C$ [91]. Das breite Signal lässt darauf schließen, dass bei Apo A1 temperaturabhängig eine Konformationsänderung über mehrere nicht voneinander abgegrenzte Zustände vorliegt.



(a)



(b)

Abbildung 4.4: Struktur von Apolipoprotein A1 (nach [89]) (a). Die Projektion eines Teils der Apo A1 Aminosäuresequenz zeigt die Verteilung der polaren und unpolaren Seitenketten (b) (nach [55]).

Fibronektin

Ein noch größeres und komplexeres Protein ist Fibronektin (Fib), wobei das hier verwendete Protein aus Rinderblut gewonnen wird. Fibronektin spielt eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung an Wunden, aber auch bei Thrombose, und ist daher in der Medizin im Bezug auf Implantate interessant. Fibronektin hat eine molare Masse von $M = 440$ kDa und besteht aus 2477 Aminosäuren. Fragmente des Fibronektins konnten bereits strukturell bestimmt werden, ein vollständiges Strukturmodell gibt es in der Proteindatenbank (pdb [92]) bisher noch nicht. Dennoch ist aus anderen Experimenten, z.B. mit dem Rasterkraftmikroskop oder dem Elektronenmikroskop, bekannt, dass Fibronektin im wesentlichen in zwei Konformationen auftritt [40, 93–96]. Die elongierte

Konformation hat dabei einen Durchmesser von 20 \AA und eine flexible Länge zwischen $1200 - 1800 \text{ \AA}$, wohingegen die globuläre Form einen Durchmesser zwischen $160 - 350 \text{ \AA}$ aufweist. Die in Tabelle 4.1 angegebenen Werte für das Volumen und die Elektronendichte sind berechnet für ein ellipsoides Protein mit einem Durchmesser von 20 \AA und einer Länge von 1200 \AA . Es ist bisher nicht bekannt, ob Fibronektin eher ein weiches oder hartes Protein ist. Aufgrund der verschiedenen Konformationen, die es einnehmen kann, zählt es jedoch wahrscheinlich eher zu den weichen Proteinen. Der isoelektrische Punkt ist mit $pI \ 5.8$ [95], ebenso wie bei BSA, unterhalb von $pH \ 7$, und somit ist das Protein insgesamt bei $pH \ 7$ negativ geladen. Die Denaturierungstemperatur liegt mit $T_{d,Fib} = 65 \text{ °C}$ [94] nur leicht niedriger als bei RNase A.

| Protein | Lys | RNase A | BSA | Fib | Apo A1 |
|--|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Molare Masse M [g/mol] | 14 300 | 13 600 | 66 300 | 440 000 | 29 000 |
| Masse m [10^{-20} g] | 2.37 | 2.26 | 11.01 | 73.05 | 4.81 |
| Molares Volumen V [cm^3/mol] | 9 348 | 8 685 | 42 390 | 150 575 | 229 898 |
| Volumen v [\AA^3] | 15 520 | 14 420 | 70 380 | 250 000 | 381 700 |
| Spezifisches Volumen ν [cm^3/g] | 0.654 | 0.639 | 0.639 | 0.342 | 7.928 |
| Elektronenanzahl | 7 628 | 7 288 | 58 234 | 145 266 | 43 404 |
| Elektronendichte ρ_{prot} [$e^-/\text{\AA}^3$] | 0.49 | 0.51 | 0.83 | 0.47 | 0.11 |
| pdb-File | 2LYZ | 1FS3 | 3V03 | - | 1AV1 |
| Isoelektrischer Punkt pI | >11 [81] | 9.3 [84] | 4.8 [81] | 5.2 [95] | 5.8 [90] |
| Maße [\AA^3] | $30 \times 30 \times 45$ | $22 \times 28 \times 38$ | $80 \times 69 \times 30$ [88] | $20 \times 20 \times 1200$ | $135 \times 90 \times 60$ [89] |
| Form | elliptisch | elliptisch | Nierenform | elongiert und elliptisch | ringförmig |
| Aminosäuren | 129 | 124 | 589 | 2 477 | 243 |
| T_{denat} @ pH 7, Lösung | 71 °C [82] | 68 °C [85] | 57 °C [87] | 65 °C [94] | 57 °C [91] |

Tabelle 4.1: Zusammenfassung einiger wichtiger Parameter der untersuchten Proteine

4.2 Amphiphile

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Modellmembranen ein Phospholipid und eine Fettsäure verwendet. Beide bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einer hydrophoben Schwanzgruppe. Dadurch orientieren sich die Amphiphile beim Aufspreiten auf eine Wasseroberfläche mit der Kopfgruppe zur Wasserphase und ordnen sich zu einer selbstorganisierenden Monolage an (self assembling monolayer, SAM). Auf diese Weise lassen sich leicht Modellmembranen herstellen. Das verwendete Phospholipid ist DPPA (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphat (sodium salt), $C_{35}H_{68}NO_8PNa$, siehe Abb. 4.5a) und besitzt bei pH 7 eine negativ geladene Kopfgruppe, sodass eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Modellmembran und geladenen Proteinen in der Lösung stattfinden kann. Als Fettsäure wurde Stearinsäure ($C_{18}H_{36}O_2$, siehe Abb. 4.5b) eingesetzt.

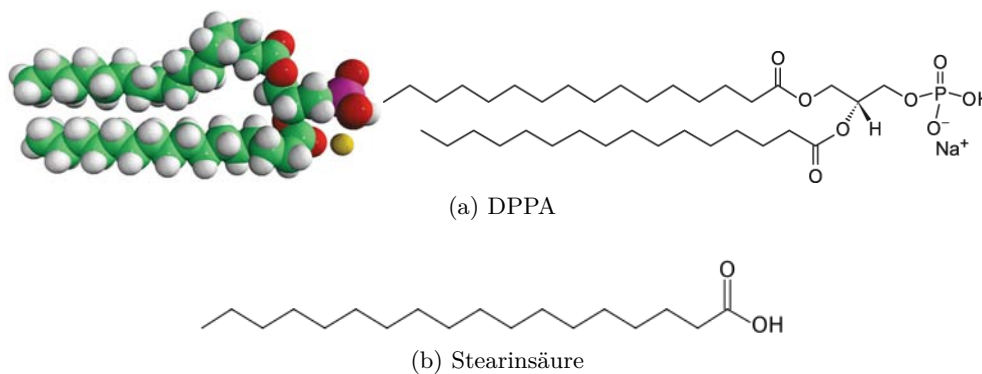


Abbildung 4.5: Struktur der beiden verwendeten Amphiphile (Entnommen von [97])

4.3 Cholesterol

Cholesterol (auch: Cholesterin) ist ein im Mensch und Tier vorkommendes Sterol (siehe Abb. 4.6), welches zusammen mit Lipoproteinen für den Fetthaushalt im Körper zuständig ist. Cholesterin lagert sich dabei in (Zell-)membranen ein und unterstützt deren Stabilität. Bisher ist noch nicht eindeutig geklärt, ob Cholesterol in Lipidschichten eine Überstruktur ausbildet. GID-Experimente mit unterschiedlichen Verhältnissen von Cholesterol und dem Phospholipid DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) zeigen, dass sich bei einem molaren Verhältnis von 1:1 eine kurzreichweitige laterale Ordnung in der Größenordnung von einigen nm ausbildet [99].

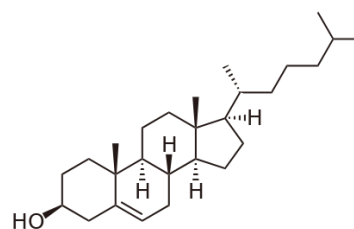


Abbildung 4.6: Cholesterol (Bild entnommen aus [98])

4.4 Siliziumsubstrate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Substrate für die Experimente an der Fest/Flüssig-Grenzfläche verwendet. Als Grundsubstrat dienten jeweils Silizium(111)-Wafer, die von Wacker Silitronic (Burghausen, Deutschland) bereitgestellt wurden. Die Siliziumwafer sind auf einer Seite poliert und undotiert. Diese Siliziumwafer wurden im Ultraschallbad in Chloroform vorgereinigt und in $10 \times 19 \text{ mm}^2$ große Stücke geschnitten. Für die hydrophilen Wafer wurde die RCA Reinigung [100] angewendet, wobei die Wafer in einer Lösung aus H_2O_2 und NH_4OH hydrophiliert wurden. Eine native Siliziumdioxidschicht mit einer Dicke von $5 - 10 \text{ \AA}$ und einer Rauigkeit von 3 \AA befindet sich auf dem Siliziumwafer. Die Siliziumoberfläche ist nach der Reinigung mit Hydroxylgruppen terminiert und bei pH 7 negativ geladen. Um eine Schmutzanlagerung zu verhindern, wurden die Wafer nach der Reinigung in deionisiertem Wasser gelagert und innerhalb einer Woche verwendet.

Für die Herstellung der hydrophoben Wafer wurden zunächst die Siliziumwafer mit der RCA Reinigung behandelt, im Argonstrom gründlich getrocknet und anschließend mit einer hydrophoben Schicht versehen. Dazu wurde eine 1 mmol/L OTS-Lösung (Octadecyltrichlorosilan, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_2\text{SiCl}_3$) in 75% Hexan und 25% Chloroform hergestellt. Die Waferstücke wurden für 3-4 Stunden in dieser Lösung belassen. Überflüssiges Polymer wurde durch zweimaliges abwechselndes Spülen in Toluol und Hexan entfernt. Die hydrophoben Wafer sind unempfindlich gegen Schmutzanlagerung und können, staubgeschützt, an Luft aufbewahrt werden. Das Verfahren der OTS-Beschichtung ist auch von *Mezger et al.* [101] beschrieben worden. Vor ihrer Verwendung im Experiment wurden die hydrophoben Substrate für fünf Minuten in Chloroform im Ultraschallbad gereinigt und anschließend mit Phosphatpuffer abgespült.

5 Experimentelles Vorgehen

Im folgenden Kapitel wird auf das experimentelle Vorgehen in den einzelnen Versuchen eingegangen. Dazu ist es zweckmäßig, zwischen den Experimenten an der Fest/Flüssig-Grenzfläche (Abschnitt 5.1) und den Experimenten an der Flüssig/Gas-Grenzfläche (teilweise auch an Membranen) (Abschnitt 5.2) zu unterscheiden. Dabei geht es im Wesentlichen um die Beschreibung der Probenpräparation an den Messplätzen und um Details zum Messverfahren. Die Messmethoden und der generelle Aufbau der Messplätze wurden bereits in den Abschnitten 2.4, 2.5 und 3.4 beschrieben.

5.1 Temperaturabhängige Messungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche

Für die Experimente an der Fest/Flüssig-Grenzfläche wurde zunächst ein Phosphatpuffer aus den Phosphatsalzen Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 hergestellt, sodass eine Konzentration $c = 0.01 \text{ mol/L}$ und ein pH 6.8 erreicht wurde. Um eine Bläschenbildung während des Erhitzens zu verhindern, wurde der Puffer mit Hilfe eines Exsikkators entgast. Die Konzentrationen der Proteine im Puffer betragen bei Lys, RNase A und BSA $c = 1 \text{ mg/mL}$, bei Fib $c = 0.1 \text{ mg/mL}$ und bei Apo A1 $c = 0.01 \text{ mg/mL}$. Die Substrate wurden jeweils mindestens eine Stunde in die Proteinlösung gelegt, bevor sie für die Reflektivitätsmessungen verwendet wurden. Vorherige Studien haben gezeigt, dass sich nach dieser Zeit der Adsorptionsprozess im Gleichgewicht befindet [24]. Zwei verschiedene Messreihen wurden mit diesen Substraten durchgeführt. In der ersten wurden die Substrate in der Proteinlösung belassen. Bei der zweiten Messreihe wurden die Substrate in eine reine Phosphatpufferlösung transferiert. Für die temperaturabhängigen XRR-Messungen an den so hergestellten Proteinfilmern wurde die beschriebene Heizzelle (siehe Abschnitt 3.4) verwendet. Der Temperaturbereich lag zwischen $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und $90 \text{ }^\circ\text{C}$, da für alle verwendeten Proteine die Denaturierungstemperatur in Lösung in diesem Intervall liegt (siehe Tab. 4.1). Die Temperatur ließ sich mit Hilfe der Heizzelle (siehe Abschnitt 3.4) mindestens mit einer Genauigkeit von $\Delta T = \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ einstellen. Bevor die eigentliche Reflektivität gemessen wurde, musste das Substrat nach jeder Temperaturveränderung justiert werden und es wurde gewartet, bis sich die Temperatur stabil eingestellt hatte (ca. 10 Minuten). Bei jeder Temperatur wurden eine oder mehrere Reflektivitäten aufgenommen. Um das Hintergrundsignal der diffusen Streuung abziehen zu können, wurden zusätzliche Messungen mit einem Offset des Detektorwinkels von $\Delta(\alpha_f) = 0.1^\circ$ aufgenommen. Als Referenz diente ein sauberes Substrat ohne Proteine in Phosphatpufferlösung bei $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Messzelle und die Probenhalter wurden bei den ersten Messzeiten mit Diethylether, bei den späteren Messzeiten mit 2%-Hellmanex III Lösung [102], für 10 Minuten im $50 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen Ultraschallbad gereinigt.

5.2 Messungen an der Flüssig/Gas-Grenzfläche

Wie auch bei den Experimenten an der Fest/Flüssig-Grenzfläche, wurde auch bei den Versuchen an der Flüssig/Gas-Grenzfläche ein Phosphatpuffer mit einer Konzentration 0.01 mol/L und einem pH-Wert von 6.8 hergestellt. Für die Referenzmessungen wurde deionisiertes Wasser in den Langmuirtrog gefüllt und sowohl XRR als GISAXS aufgenommen. Um die Streustrahlung zu minimieren, wurde die Probenzelle mit Heliumgas geflutet (siehe Abschnitt 3.2). Als Einfallswinkel für die GISAXS-Messungen wurde $\alpha_i = 0.85 \cdot \alpha_c$ gewählt. Der kritische Winkel der Wasser/Helium-Grenzfläche beträgt $\alpha_c = 0.13^\circ$. Die verwendeten Proteine waren Lysozym in den Konzentrationen 1 mg/mL und 2 mg/mL und Apolipoprotein A1. Das Apo A1 wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von $c = 0.01 \text{ mg/mL}$ hergestellt, wovon 10 mL auf die Pufferoberfläche im Langmuirtrog getropft wurden, sodass eine resultierende Konzentration von $0.5 \text{ } \mu\text{g/mL}$ erreicht wurde. Für die Modellmembranen wurde das Phospholipid DPPA in Chloroform gelöst (1 mol/L) und auf die Flüssigkeitsoberfläche aufgespreitet. In weiteren Versuchen wurde eine Mischung aus DPPA und 46 mol\% Cholesterol, gelöst in Chloroform, auf die Flüssigkeitsoberfläche aufgespreitet. Mit Hilfe der Barriere und der Langmuirwaage lässt sich der Oberflächendruck verfolgen und einstellen. Bei den Messungen von Proteinen an der Flüssigkeitsoberfläche wurden die Messungen bei Lysozym an der unkomprimierten Grenzfläche durchgeführt, wohingegen für Apolipoprotein A1 $\Pi = 30 \text{ mN/m}$ eingestellt wurde. Bei der Proteinadsorption an der Lipidschicht wurden sowohl die Grenzflächen im unkomprimierten Zustand als auch die bei einem eingestellten Oberflächendruck von $\Pi = 35 \text{ mN/m}$ untersucht. Bei der kombinierten Cholesterol/Lipidschicht wurde ein Oberflächendruck von $\Pi = 30 \text{ mN/m}$ eingestellt. In Tabelle 5.1 sind die Oberflächendrücke bei den Messungen an der Flüssig/Gas-Grenzfläche zusammengefasst. Des Weiteren wurden GISAXS-Messungen an Lysozym unter Stearinsäure durchgeführt.

| | Puffer | DPPA | DPPA+Chol |
|---------|---|---|---|
| Puffer | $0 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ | $35 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ | $30 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ |
| Lysozym | $23 \frac{\text{mN}}{\text{m}} \quad 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ | $35 \frac{\text{mN}}{\text{m}} \quad 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ | $30 \frac{\text{mN}}{\text{m}} \quad 2 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ |
| Apo A1 | $30 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ | $35 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ | $30 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ |

Tabelle 5.1: Oberflächendrücke Π bei den gemessenen Reflektivitäten

6 Messergebnisse und Auswertung

In diesem Kapitel werden die Messergebnisse der durchgeführten Experimente präsentiert und diskutiert. Dazu wird zunächst dargestellt, wie die Auswertung der Reflektivitätsmessungen durchgeführt wurde. Zur Interpretation der Ergebnisse der Röntgenreflektivitätsmessungen wird in Abschnitt 6.1 eine entsprechende Fehlerbetrachtung erläutert. Bei der zweiten verwendeten Methode, GISAXS, findet eine qualitative Auswertung der Daten statt. Die Herangehensweise der GISAXS-Auswertung befindet sich in Abschnitt 6.2.

Auswertung und Diskussion gliedern sich des Weiteren in drei Abschnitte. Im Abschnitt 6.3 wird die temperaturabhängige Adsorption und Desorption von Proteinen an der Grenzfläche zwischen Silizium und der Puffer-Phase untersucht und diskutiert. Im darauffolgenden Abschnitt 6.4 werden die Ergebnisse zum temperaturabhängigen Verhalten von Apolipoprotein A1 auf einem hydrophoben Substrat dargestellt und besprochen. Im letzten Abschnitt (6.5) werden Experimente zur Proteinadsorption an der Flüssig/Gas-Grenzfläche und an Membranen vorgestellt. Dabei wurde sowohl das vertikale Elektronendichteprofil als auch die laterale Struktur der Adsorbate untersucht.

6.1 Auswertung der Röntgenreflektivitätsmessungen

Wie bereits in Abschnitt 2.4 zur Theorie der XRR beschrieben wurde, wird bei der Reflektivitätsmessung die Intensität des reflektierten Strahls in Abhängigkeit des Einfallswinkels gemessen. Der Winkel wird nach Gleichung 13 in den Wellenvektorübertrag q_z umgerechnet.

Die gemessene Reflektivität bedarf noch weiterer Korrekturen. Die einfallende Intensität des Röntgenstrahls einer Synchrotronstrahlungsquelle unterliegt unvermeidbaren Schwankungen. Um diese Schwankungen auszugleichen, wird ein der einfallenden Intensität proportionales Signal mit einem Strahlmonitor gleichzeitig für jeden Messpunkt aufgezeichnet, sodass die gemessene reflektierte Intensität auf die Eingangsintensität normiert werden kann. Da sich die reflektierte Intensität während einer Messung über sieben Größenordnungen erstreckt, wird der Strahl mit unterschiedlich dicken Absorberfolien abgeschwächt, um eine Überbelichtung des Detektors zu vermeiden. Als Korrektur muss die jeweilige Abschwächung mit dem entsprechenden Absorberfaktor berücksichtigt werden. Diese Werte sind im Normalfall bekannt, müssen aber zum Teil angepasst werden, um eine stetige Aneinanderreihung der mit verschiedenen Absorbern gemessenen Reflektivitätsteile zu erhalten. Innerhalb einer Messreihe wurden die Absorberfaktoren konstant gehalten. Des Weiteren wird der Streuuntergrund, die diffuse Streuung, mit einem Winkelversatz von $\Delta(\alpha_f) = 0.1^\circ$ aufgenommen und von der gemessenen Reflektivität abgezogen. Die diffuse Streuung ist erst bei höheren q_z -Werten in der Größenordnung der Reflektivität. Aufgrund der Genauigkeit der Justage kann es in der Reflektivität zu einer Ungenauigkeit von $\Delta q_z \leq 0.001 \text{ \AA}^{-1}$ kommen. Dies lässt

sich besonders gut im Bereich direkt oberhalb des kritischen Winkels, wo die reflektierte Intensität stark abfällt, erkennen. Eine Korrektur in dieser Größenordnung wurde manuell durch eine Verschiebung der Reflektivität entlang der q_z -Achse durchgeführt, sodass sich die Flanken hinter dem kritischen Winkel optimal überlagern.

Wie bereits in Gleichung 27 dargestellt, fällt die reflektierte Intensität ab $q_z > 3q_{c,z}$ mit q_z^{-4} ab und wird über mehrere Größenordnungen gemessen. Um kleine Unterschiede in den Reflektivitäten besser hervorzuheben, wird die Reflektivität auf die Fresnelreflektivität R_F normiert (siehe Abschnitt 2.4). Beispielhaft sind die Reflektivitäten des reinen Substrats und von Lysozym auf Silizium in Puffer bei 55 °C in Abbildung 6.1 gezeigt, wobei (a) die Fresnel-unnormierten und (b) die Fresnel-normierten Reflektivitäten zeigt.

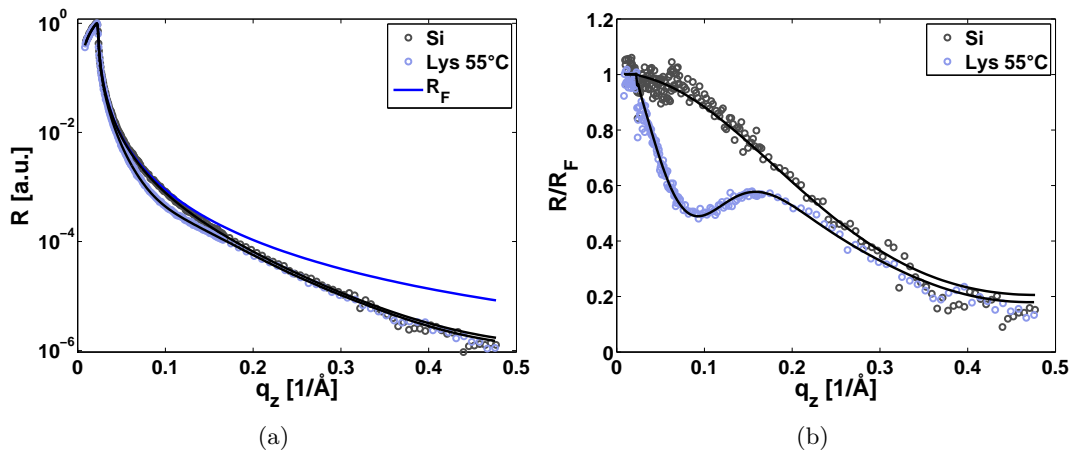


Abbildung 6.1: Beispiel für die Darstellung der Reflektivität an einer Lysozymschicht auf Silizium in Puffer bei 55 °C. Dabei sind in (a) die Reflektivitäten des Substrates in Puffer mit und ohne Proteinschicht und die Fresnelreflektivität des Substrates gezeigt. In (b) sind die auf die Fresnelreflektivität normierten Reflektivitäten dargestellt. Die durchgezogenen Linien sind die berechneten Reflektivitäten aus den modellierten Elektronendichteprofilen, die in Abbildung 6.2 dargestellt sind.

Um Informationen über das Probensystem zu bekommen, wird ein Modell des Elektronendichteprofiles (EDP) entworfen. Mit der Software LSFit wird aus diesem Modell unter Anwendung des Parratt-Algorithmus (siehe Abschnitt 2.4) die Reflektivität berechnet und mit der gemessenen Reflektivität verglichen. Durch Variation der Parameter im Modell wird die berechnete Reflektivität an die Messdaten angepasst. Als Merkmal für die Qualität der Anpassung eines Modells wird die Abweichung zwischen der theoretischen und der gemessenen Reflektivität

$$\chi^2 = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N (\log(R(q_{\text{ber},n})) - \log(R(q_{\text{exp},n})))^2 \quad (34)$$

berechnet, wobei N die Anzahl der Messpunkte und $R(q_{\text{ber},n})$ bzw. $R(q_{\text{exp},n})$ die berechnete bzw. die gemessene Reflektivität an dem n -ten Messpunkt ist. Die Elektro-

nendichtepprofile, die für die Anpassung der Reflektivitäten in Abbildung 6.1 verwendet wurden, sind in Abbildung 6.2a dargestellt.

Des Weiteren ist bei kleinen Proben unter kleinem Winkel die Projektion des einfallenden Röntgenstrahls auf die waagerechte Ebene größer als die Länge der Probe. Erst ab einem Winkel α_g trifft der gesamte Strahl die Probe und kann zur reflektierten Intensität beitragen. Der Winkel ist bestimmt durch die Höhe des Strahls h und der Länge der Probe l

$$\sin(\alpha_g) = \frac{h}{l}. \quad (35)$$

Für Winkel $\alpha_i < \alpha_g$ muss die Reflektivität mit einem Faktor $\sin(\alpha_g)/\sin(\alpha_i)$ korrigiert werden. In LSFit kann α_g als Parameter *footprint* angegeben werden, wobei diese Korrektur dann automatisch verwendet wird.

Das Elektronendichteprofil $\rho(z)$ setzt sich zusammen aus den Anteilen des Substrats, des Wassers und des Proteins. Diese Anteile lassen sich ausdrücken über die Volumenbruchteile $\phi(z)$. Für das Elektronendichteprofil des Substrats im Wasser ergibt sich der Zusammenhang

$$\rho_{\text{Subst}}(z) = \phi_{\text{Si}}(z)\bar{\rho}_{\text{Si}} + \phi_{\text{H}_2\text{O},1}(z)\bar{\rho}_{\text{H}_2\text{O}}, \quad (36)$$

mit der mittleren Elektronendichte von Silizium $\bar{\rho}_{\text{Si}}=0.6987 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ bzw. Wasser $\bar{\rho}_{\text{H}_2\text{O}}=0.3340 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ und den Volumenbruchteilen von Silizium $\phi_{\text{Si}}(z)$ und Wasser $\phi_{\text{H}_2\text{O},1}(z)$ in Abhängigkeit der Höhe z .

Analog lässt sich das Elektronendichteprofil mit Proteinschicht über

$$\rho_{\text{Prot}}(z) = \phi_{\text{Si}}(z)\bar{\rho}_{\text{Si}} + \phi_{\text{H}_2\text{O},2}(z)\bar{\rho}_{\text{H}_2\text{O}} + \phi_{\text{Prot}}(z)\bar{\rho}_{\text{Prot}} \quad (37)$$

ausdrücken, wobei hier der Volumenbruchanteil $\phi_{\text{Prot}}(z)$ und die mittlere Elektronendichte $\bar{\rho}_{\text{Prot}}$ (siehe Tab. 4.1) des Proteins mit einfließen. Aus diesen Gleichungen lässt sich das Volumenbruchprofil des Proteins aus den Elektronendichteprofilen mit und ohne Protein berechnen. Dazu wird das Elektronendichteprofil des Substrats (Glg. 36) von dem Elektronendichteprofil mit Protein (Glg. 37) abgezogen:

$$\rho_{\text{Prot}}(z) - \rho_{\text{Subst}}(z) = (\phi_{\text{H}_2\text{O},2}(z) - \phi_{\text{H}_2\text{O},1}(z))\bar{\rho}_{\text{H}_2\text{O}} + \phi_{\text{Prot}}(z)\bar{\rho}_{\text{Prot}}. \quad (38)$$

Des Weiteren gilt, dass die Volumenbruchanteile in einem Elektronendichteprofil zusammen 1 ergeben müssen:

$$\phi_{\text{Si}}(z) + \phi_{\text{H}_2\text{O},1}(z) = 1 \quad (39)$$

$$\phi_{\text{Si}}(z) + \phi_{\text{H}_2\text{O},2}(z) + \phi_{\text{Prot}}(z) = 1. \quad (40)$$

Wird die Differenz der Gleichungen 39 und 40 gebildet

$$\phi_{\text{H}_2\text{O},2}(z) - \phi_{\text{H}_2\text{O},1}(z) = -\phi_{\text{Prot}}(z), \quad (41)$$

so lassen sich in Gleichung 38 die Anteile des Wassers durch den Anteil an Protein ersetzen:

$$\rho_{\text{Prot}}(z) - \rho_{\text{Subst}}(z) = -\phi_{\text{Prot}}(z)\bar{\rho}_{\text{H}_2\text{O}} + \phi_{\text{Prot}}(z)\bar{\rho}_{\text{Prot}}.$$

Somit lässt sich das Volumenbruchprofil des Proteins folgendermaßen berechnen

$$\phi_{\text{Prot}}(z) = \frac{\rho_{\text{Prot}}(z) - \rho_{\text{Subst}}(z)}{\bar{\rho}_{\text{Prot}} - \bar{\rho}_{\text{H}_2\text{O}}}. \quad (42)$$

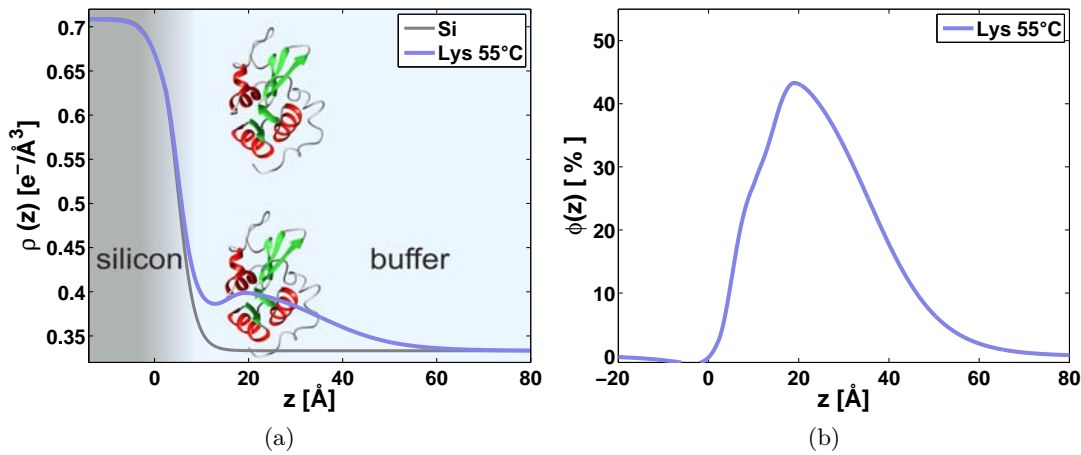


Abbildung 6.2: Elektronendichteprofile (a) und Volumenbruchprofil (b) zum System Lysozym auf Silizium in Puffer bei 55 °C. Im Hintergrund des Elektronendichteprofiles ist das zugrundeliegende Modell mit Siliziumwafer, einer Siliziumdioxidschicht und der Pufferphase dargestellt. An der Grenzfläche zwischen Puffer und Substrat lagert sich das Protein an. Um den Proteinanteil stärker hervorzuheben, lässt sich aus diesen beiden Kurven das Volumenbruchprofil, wie im Text beschrieben, bestimmen (siehe Gleichung 42).

Das Volumenbruchprofil aus dem Beispiel der Reflektivitäten aus Abbildung 6.1 und den dazu gehörigen Elektronendichteprofilen aus Abbildung 6.2a ist in der Abbildung 6.2b dargestellt.

Das Volumenbruchprofil gibt an, wie groß der Volumenanteil des Proteins in Abhängigkeit vom Abstand zur Substratoberfläche ist. Das Volumenbruchprofil kann nun weiter ausgewertet werden, um detailliertere Informationen zur Proteinschicht zu erhalten. Der maximale Wert im Volumenbruchprofil entspricht dem Bedeckungsgrad Θ . Er gibt den mit Proteinen bedeckten Flächenanteil in einer Schicht an. Die Halbwertsbreite des Volumenbruchprofils $\phi_{\text{Prot}}(z)$ ergibt zusammen mit der Rauheit σ die Schichtdicke d . Die gesamte Form gibt Hinweise über den Aufbau der Proteinschicht, z.B. ob Mul-

tilagen vorhanden sind, ob verschiedene Konformationen vorliegen oder ob sich eine Verarmungsschicht zwischen Substrat und Protein ausbildet.

Um die Ergebnisse aus der Röntgenreflektivität mit Ergebnissen anderer Methoden vergleichen zu können, ist es zweckmäßig die adsorbierte Menge Γ zu bestimmen. Diese ist proportional zur eingeschlossenen Fläche im Volumenbruchprofil und lässt sich berechnen mit

$$\Gamma = \frac{m}{v} \int \phi(z) dz,$$

wobei m die Masse und v das Volumen des verwendeten Proteins ist.

Fehlerbetrachtung

Die Fehlerbetrachtung bei der Auswertung von Reflektivitäten, bei denen das effektive Elektronendichteprofil verwendet wird, ist nicht trivial. Bei der Anpassung der Reflektivität wird das Abstandsquadrat zwischen der gemessenen und der berechneten Reflektivität χ^2 (siehe Gleichung 34) bestimmt. Das Modell des Elektronendichteprofiles wird so angepasst, dass $\chi^2 < 0.1$ im Bereich bis $q_z = 0.3 \text{ \AA}^{-1}$ und $\chi^2 < 1$ bei der gesamten Reflektivität ist. Bei weniger komplexen Probensystemen kann bei der Modellierung ein Boxmodell angenommen werden. Hierbei lässt sich eine Ungenauigkeit für die einzelnen Parameter wie die Schichtdicke, die Rauheit und die Dispersion abschätzen, indem diese variiert werden. Da jedoch im Modell für die Proteine von einem effektiven Elektronendichtemodell ausgegangen wird (siehe Abschnitt 2.4), können die Parameter nicht unabhängig voneinander betrachtet werden. Insbesondere, wenn zur Modellierung des Profils mehrere Schichten angenommen werden müssen, ist eine Einzelbetrachtung der Fehler nicht sinnvoll. Somit wurde dem Elektronendichteprofil kein messbedingter Fehler zugeordnet.

Der präparationsbedingte Unterschied zwischen wiederholten Messungen ist dominant. Durch kleinste Änderungen in der Präparation kann die Proteinschicht bereits geringfügige Unterschiede aufweisen, was sich merklich auf die Reflektivität auswirkt. Bei der Bestimmung der adsorbierten Menge, der Schichtdicke und des Bedeckungsgrades ist es somit sinnvoll, die Fehler zwischen wiederholten Messungen anzugeben. Abschätzen lassen sich die Fehler damit für den Bedeckungsgrad $\Delta\Theta = \pm 1\%$, die Schichtdicke $\Delta d = \pm 1 \text{ \AA}$ und die adsorbierte Menge $\Delta\Gamma = \pm 0.1 \text{ mg/m}^2$. In der Regel sind die Fehlerbalken jedoch kleiner als die in den Grafiken verwendeten Symbole. Des Weiteren wurde bei den temperaturabhängigen Messungen eine Messreihe jeweils an einer Proteinschicht durchgeführt ohne sie neu zu präparieren, sodass innerhalb dieser Messreihen keine präparationsbedingten Fehler auftreten können. Dementsprechend ist anzunehmen, dass die Trends innerhalb einer Messreihe einen noch geringeren Fehler aufweisen, als der durch wiederholte Messungen abgeschätzte.

Bei der Bestimmung des Volumenbruchprofils wird das Elektronendichteprofil mit Pro-

tein von dem ohne Protein abgezogen. Bei der Modellierung des Elektronendichteprofiles mit Protein stimmt die Grenzfläche zum Substrat häufig nicht exakt mit dem Elektronendichteprofil ohne Protein überein. Die Elektronendichte des festen Siliziumsubstrates sollte sich nicht durch das Protein verändern, was sich jedoch in der Modellierung des effektiven Dichtemodells nicht vollkommen verhindern lässt. Daher kann es in den Volumenbruchprofilen an der Grenzfläche zu Werten unterhalb von null kommen, die in kleinen Unterschieden in den Elektronendichteprofilen begründet sind. Bei der Bestimmung der eingeschlossenen Fläche im Volumenbruchprofil wird der negative Bereich abgezogen, wodurch die Werte der adsorbierten Menge um bis zu 10% nach unten abweichen können.

6.2 Auswertung der GISAXS Daten

Bei der Auswertung der GISAXS Daten werden im Rahmen dieser Arbeit nur qualitative Aussagen getroffen. Um jedoch Aussagen über laterale Signale treffen zu können, ist es zweckmäßig die Position der Pixel des verwendeten Pilatus-Detektors als Funktion des Wellenvektorübertrags anzugeben. Die parallele (q_{\parallel}) und senkrechte (q_{\perp}) Komponente des Wellenvektorübertrages lassen sich mit

$$q_{\perp} = q_z = \frac{2\pi}{\lambda} (\sin(2\theta_f) + \sin(\alpha_i)) \quad (43)$$

und

$$q_{\parallel} = q_{xy} = \sqrt{q_x^2 + q_y^2} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{(\cos(\alpha_f) \cdot \cos(2\theta_f) - \cos(\alpha_i))^2 + (\cos(\alpha_f) \cdot \sin(2\theta_f))^2} \quad (44)$$

aus den Winkeln der Streugeometrie (siehe Abbildung 2.8) bestimmen.

Dabei lässt sich q_{\parallel} mit $\alpha_f = 0$ vereinfachen zu

$$q_{\parallel} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{(\cos(2\theta_f) - \cos(\alpha_i))^2 + (\sin(2\theta_f))^2}. \quad (45)$$

Für kleine Einfallswinkel $\alpha_i = 0.85 \cdot \alpha_c = 0.11^\circ$ lässt sich mit einigen trigonometrischen Umformungen der Zusammenhang

$$q_{\parallel} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{(\cos(2\theta_f) - 1)^2 + (\sin(2\theta_f))^2} \quad (46)$$

$$q_{\parallel} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\cos^2(2\theta_f) - 2 \cdot \cos(2\theta_f) + 1 + \sin^2(2\theta_f)} \quad (47)$$

$$q_{\parallel} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{2 - 2 \cdot \cos(2\theta_f)} \quad (48)$$

$$q_{\parallel} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{2 - 2 \cdot \left(1 - 2 \cdot \sin^2 \left(\frac{2\theta_f}{2}\right)\right)} \quad (49)$$

$$q_{\parallel} = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \left(\frac{2\theta_f}{2}\right) \quad (50)$$

ermitteln.

Der Winkel θ_f ist dabei über

$$\tan(\theta_f) = \frac{i \cdot p}{L} \quad (51)$$

bestimmt, wobei für die Pixelgröße $p = 0.172$ mm, für den Abstand zwischen Probe und Detektor $L = 0.68$ m, für i die Nummer des Pixels und für die Wellenlänge $\lambda = 1.3$ Å verwendet wurde. Eine Untergrundkorrektur wurde nicht vorgenommen.

6.3 Temperaturabhängige Desorption und Adsorption von Proteinen auf Silizium¹

Proteine in wässriger Umgebung tendieren dazu, an nahezu jeder Grenzfläche zu adsorbieren [5]. Adsorbierte Proteine können das weitere Wachstum eines Biofilms initiieren. Diese Biofilme können die Akzeptanz von Implantaten oder die Funktionalität von Sensoren beeinflussen [1, 104]. Des Weiteren soll in anderen Bereichen, wie z.B. in der Lebensmittelindustrie oder an Schiffsrümpfen, die Entstehung von Biofilmen vermieden werden [10, 11, 105]. Aus diesem Grund wird ein fundamentales Verständnis der Proteinadsorption und -desorption benötigt. Um die grundlegenden Mechanismen zu erforschen, wurden temperaturabhängige Untersuchungen von verschiedenen Proteinschichten auf hydrophilem Silizium in zwei verschiedenen Umgebungen, in Puffer und Proteinlösung, an der Beamline BL 9 am DELTA durchgeführt. Die Beschreibungen der Strahllinie und der experimentellen Durchführung befinden sich in den Abschnitten 3.1, 3.4 und 5.1. Die verwendeten Proteine sind Lysozym, Ribonuklease A, BSA und Fibronectin.

In den Abbildungen 6.3 sind die Reflektivitäten der Grenzflächen zwischen Silizium und Puffer bzw. Proteinlösung bei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Die Reflektivitäten sind auf die Fresnelreflektivität des reinen Siliziumwafers normiert, um kleine Veränderungen stärker hervorzuheben. Zusätzlich ist die Reflektivität an Silizium in Puffer als Referenz dargestellt. Die Kurven sind um einen konstanten Faktor entlang der y-Achse zueinander verschoben, um die Erkennbarkeit zu verbessern. Die durchgezogenen Linien sind die aus den modellierten Elektronendichteprofilen berechneten Reflektivitäten, die an die Messdaten angepasst wurden. Messungen mit der gleichen Temperatur innerhalb einer Messreihe wurden nacheinander aufgenommen. In der Le-

¹Die Ergebnisse aus diesem Abschnitt wurden in [103] publiziert.

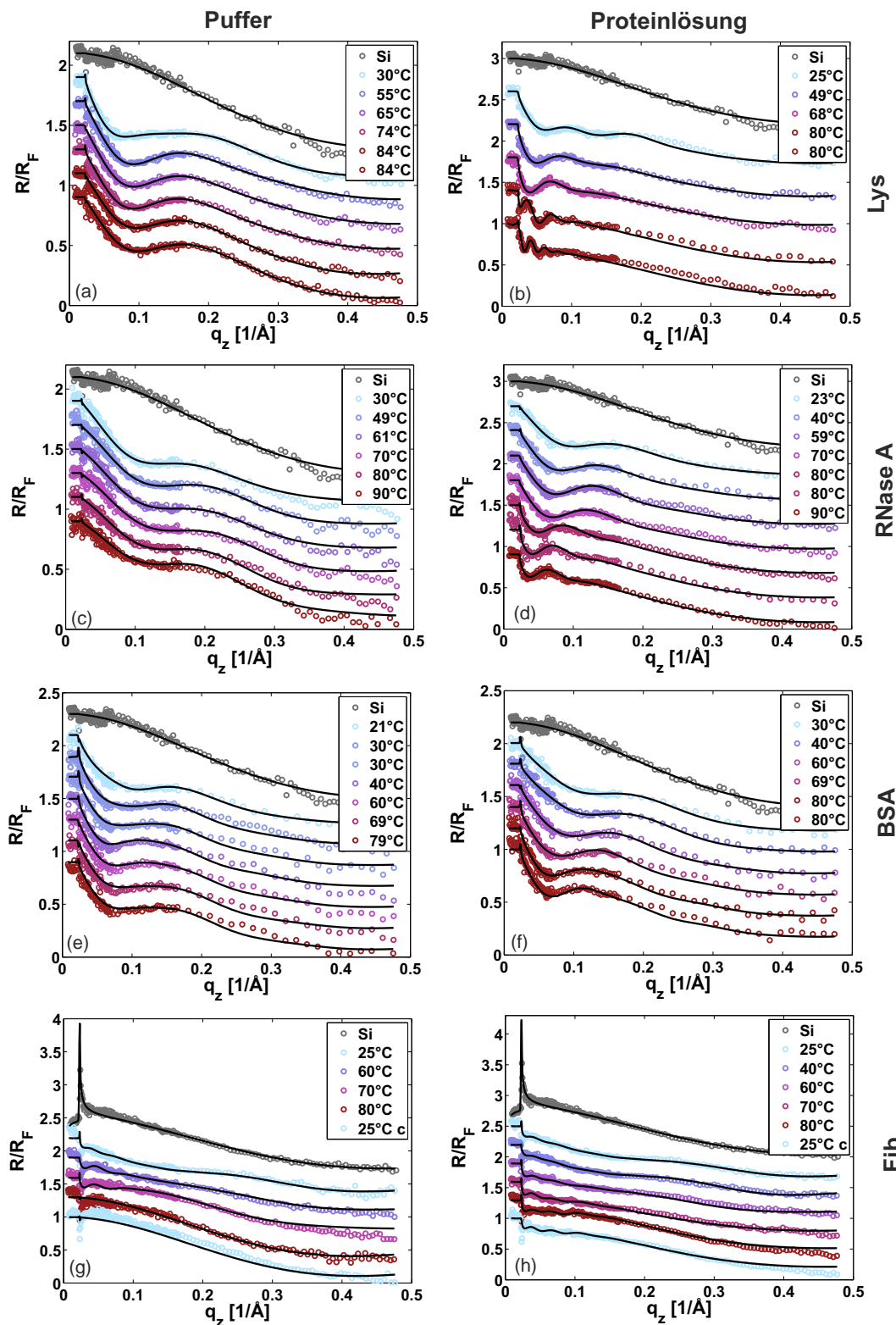


Abbildung 6.3: Fresnel-normierte Reflektivitäten der Proteinschichten auf Silizium bei verschiedenen Temperaturen in Puffer (a,c,e,g, linke Spalte) und in Proteinlösung (b,d,f,h, rechte Spalte). Die Proteine sind Lysozym (a,b), RNase A (c,d), BSA (e,f), und Fib (g,h). Die Reflektivitäten wurden um einen konstanten Wert entlang der y-Achse verschoben. Die durchgezogenen Linien sind die angepassten berechneten Reflektivitäten nach den modellierten Elektronendichteprofilen. Messungen bei derselben Temperatur wurden nacheinander aufgenommen. Das 'c' in den Legenden der Bilder (g) und (h) bezeichnet die Reflektivität, die nach dem Heizen und wieder Abkühlen aufgenommen wurde.

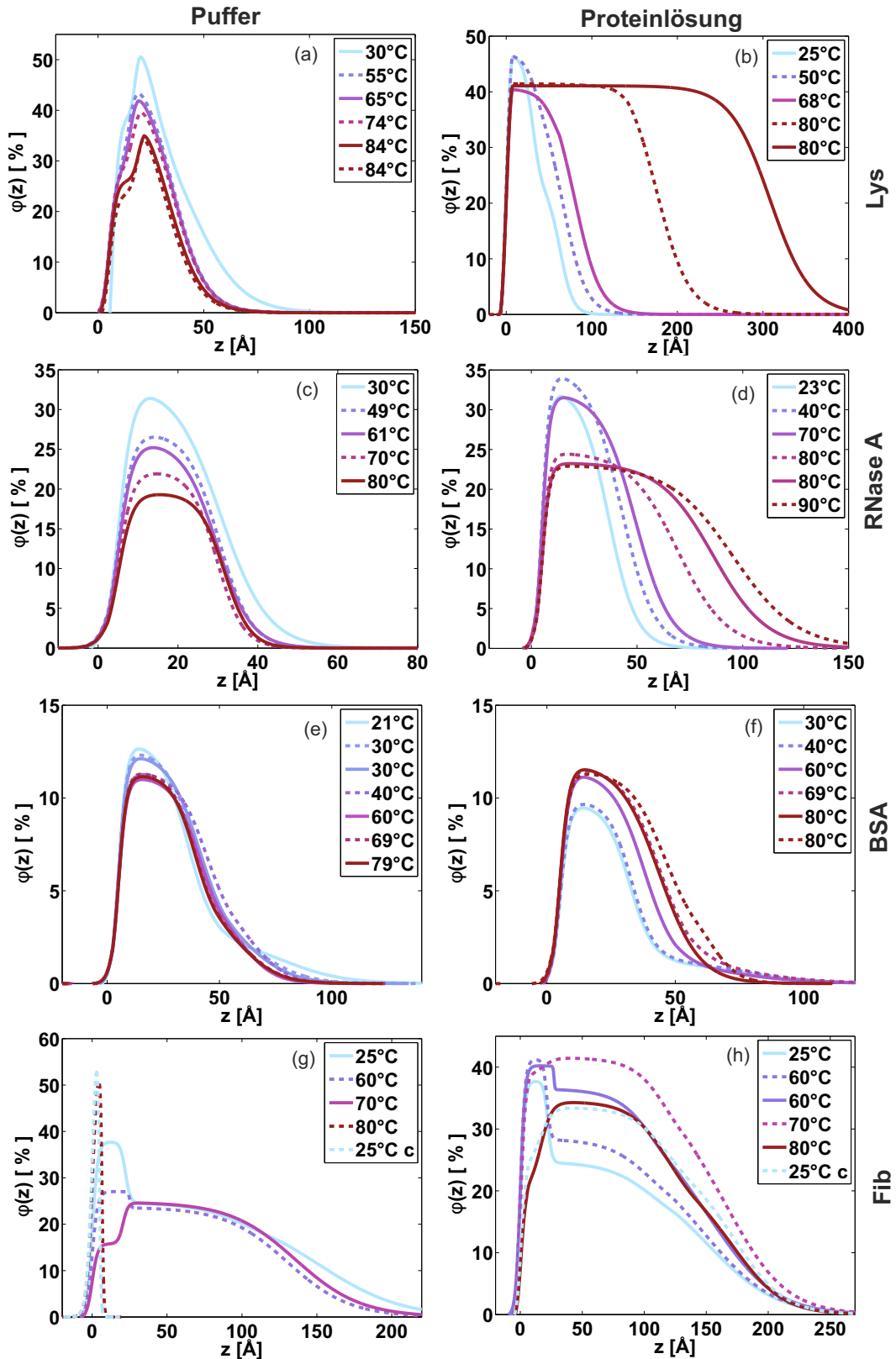


Abbildung 6.4: Temperaturabhängige Volumenbruchprofile der Proteine Lys (a,b), RNase A (c,d), BSA (e,f), und Fib (g,h) auf Silizium in Puffer (linke Spalte) und in Proteinlösung (rechte Spalte). Die Profile gehören zu den Reflektivitäten aus Abbildung 6.3. Volumenbruchprofile bei derselben Temperatur sind nacheinander gemessen worden. Das c in der Legende von Fibronectin (g,h) steht für die Messung an der abgekühlten Probe nach vorangegangener Heizphase.

gende von Fibronectin (siehe Abb. 6.3g und h) bezeichnet 'c' die Messung an der abgekühlten Probe nach vorangegangener Heizphase.

In den Reflektivitäten, gemessen unter reinem Puffer, (siehe Abb. 6.3 linke Spalte) ist für die gemessenen Proteine ein deutlicher Unterschied zum reinen Silizium-Substrat zu sehen. Die Oszillationen weisen eine Periode von etwa $\Delta q \approx 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ auf, was mit $d = 2\pi/\Delta q \approx 30 \text{ \AA}$ gut mit den erwarteten Schichtdicken von einer Protein-Monolage übereinstimmt. Innerhalb der Heizreihen lassen sich kleine Änderungen erkennen.

Ebenso wie bei den Reflektivitäten in Puffer lässt sich an den Reflektivitäten in Proteinlösung (siehe Abb. 6.3 rechte Spalte) bereits erkennen, dass eine Proteinschicht adsorbiert ist. Vergleicht man die Reflektivitäten von Lysozym in Puffer (siehe Abb. 6.3a) und Proteinlösung (siehe Abb. 6.3b) bei der niedrigsten Temperatur, so kann in Proteinlösung bereits eine kürzere Periode der Oszillation bestimmt werden, was ein Zeichen für eine dickere Schicht ist. In den Heizserien lässt sich insbesondere für Lysozym (siehe Abb. 6.3b) und RNase A (siehe Abb. 6.3d) bei höheren Temperaturen eine ausgeprägte, kurzwellige Oszillation erkennen. Diese verändert sich auch zeitlich bei wiederholten Messungen bei einer Temperatur zu noch kurzwelligeren Oszillationen. Das Ausbilden dieser Oszillationen deutet auf eine Zunahme der Schichtdicke hin. Bei BSA (siehe Abb. 6.3f) lässt sich auch eine Veränderung in den Reflektivitäten mit steigender Temperatur beobachten, wobei diese deutlich schwächer ausgeprägt ist als bei Lys und RNase A. Auch für Fibronectin (siehe Abb. 6.3h) ändert sich die Reflektivität mit steigender Temperatur, jedoch kann hier kein eindeutiger Trend bestimmt werden.

Die Volumenbruchprofile, die aus den modellierten Elektronendichteprofilen mit und ohne Protein berechnet werden, sind für die Messungen in Puffer und in Proteinlösung in Abbildung 6.4 dargestellt.

Um einen besseren Vergleich zwischen den Proteinschichten in Puffer und in Proteinlösung zu ermöglichen, wurden der Bedeckungsgrad Θ , die Schichtdicke d , und die adsorbierte Menge Γ aus den Volumenbruchprofilen bestimmt und in den Abbildungen 6.5 und 6.6 und in Tabelle A1 im Anhang zusammengefasst. Die ausgefüllten Kreise entsprechen den Messungen in Proteinlösung, die leeren Kreise denen in Puffer. Messpunkte bei gleicher Temperatur wurden nacheinander aufgenommen. Die Temperaturen oberhalb der Denaturierungstemperatur des jeweiligen Proteins sind durch einen grauen Bereich gekennzeichnet. Die eingezeichneten Linien dienen als Führungslinien für das Auge. Die gepunktete Linie gehört dabei zu den Messungen in Puffer, die durchgezogene Linie zu den Messungen in Proteinlösung.

Die Lysozymschichten in Puffer (siehe Abb. 6.4a) weisen Schichtdicken mit $d = 28 \text{ \AA}$ bis 33 \AA auf (siehe Abb. 6.5a), welche gut mit einer Monolage aus Lysozym ($30 \times 30 \times 45 \text{ \AA}^3$) in "side-on" Konformation übereinstimmen. Der Bedeckungsgrad liegt bei der niedrigsten Temperatur bei 50 % (siehe Abb. 6.5b). Der maximale Bedeckungsgrad für die zufällige aufeinanderfolgende Adsorption (RSA [23, 106]) beträgt 55 %, was leicht über dem hier ermittelten Wert liegt. Daraus lässt sich schließen, dass nahezu eine komplette Monolage Protein adsorbiert wurde.

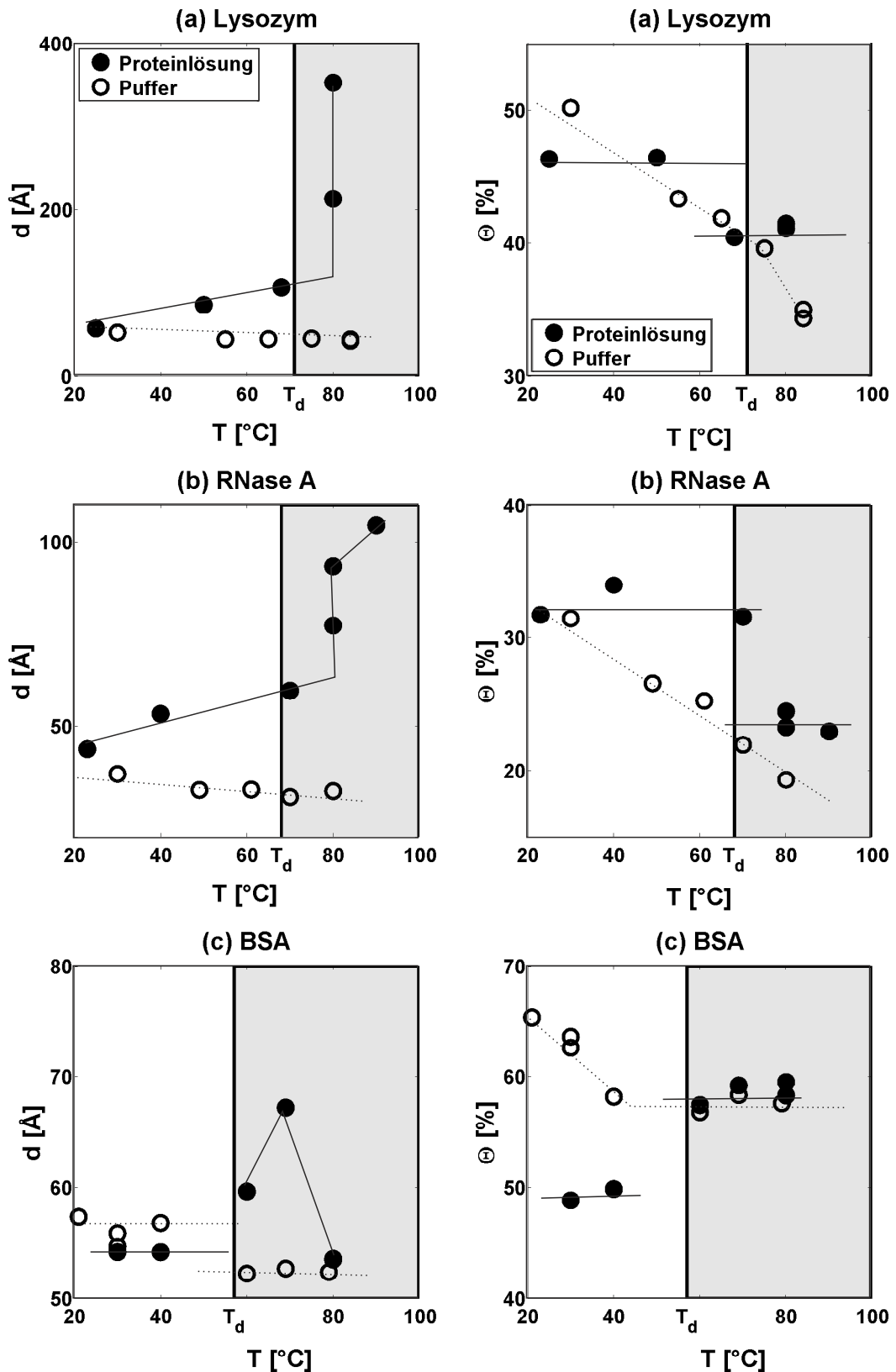


Abbildung 6.5: Schichtdicke d und Bedeckungsgrad θ von Proteinen auf Silizium in Puffer (leere Kreise) und in Proteinlösung (ausgefüllte Kreise). (a) Lysozym, (b) RNase A, (c) BSA, und (d) Fibronectin. Punkte bei derselben Temperatur wurden nacheinander aufgenommen. Die eingezeichneten Linien sind Führungslinien für das Auge. Der graue Bereich kennzeichnet Temperaturen größer als die Denaturierungstemperatur. Die Darstellungsbereiche für θ und d sind für die unterschiedlichen Proteine nicht gleich.

Mit steigender Temperatur nimmt die Schichtdicke d von Lys und RNase A nur sehr wenig ab, wohingegen der Bedeckungsgrad Θ mit steigender Temperatur sinkt.

Bei BSA (siehe Abb. 6.5c) bleibt die Schichtdicke konstant mit einem kleinen abrupten Abfall zwischen 40 °C und 60 °C. Der Bedeckungsgrad verringert sich bis zur Denaturierungstemperatur leicht und bleibt dann konstant.

Im Gegensatz dazu wird für Fibronectin (siehe Abb. 6.4g) ein anderes Verhalten beobachtet. Bei 25 °C können in dem Volumenbruchprofil zwei unterschiedliche Bereiche voneinander getrennt werden, die Dicken von 20 Å bzw. 160 Å besitzen. Es ist bekannt, dass Fibronectin in zwei verschiedenen Hauptkonformationen vorkommt [40, 93]. Die beobachteten Schichtdicken stimmen gut mit diesen beiden Konformationen überein. Die eine besitzt eine globuläre Form mit 60 Å bis 350 Å Durchmesser, die andere eine elongierte Form mit einem Durchmesser von 20 Å und einer flexiblen Länge von 1200 Å bis 1500 Å. Von *Al-Jawad et al.* [43] wurde mittels Neutronenreflektometrie nur die elongierte Form auf einer Siliziumdioxid-Oberfläche beobachtet. Aufgrund des Auftretens von zwei Konformationen lassen sich bei Fibronectin die Parameter Bedeckungsgrad und Schichtdicke nicht sinnvoll ermitteln. Betrachtet man das temperaturabhängige Volumenbruchprofil von Fibronectin, so scheinen die unterschiedlichen Konformationen eine wichtige Rolle beim temperaturabhängigen Verhalten von Fibronectin an der Fest/Flüssig-Grenzfläche zu spielen. Bis zu 70 °C nimmt der Bedeckungsgrad in Puffer nahe der Grenzfläche ab, wohingegen sich der Bedeckungsgrad der 160 Å dicken Schicht nicht ändert. Bei höheren Temperaturen kollabiert die gesamte Proteinschicht zu einer dünnen Schicht mit erhöhter Elektronendichte. Es treten an dieser Schicht keine weiteren Veränderungen durch Abkühlung auf.

In Proteinlösung ist die Schichtdicke für Lysozym bei 25 ° (siehe Abb. 6.5a) mit 44 Å etwas höher als in Puffer ($d = 28$ Å), wobei der Bedeckungsgrad vergleichbar hoch ist. Das lässt darauf schließen, dass die Packungsdichte der Proteine innerhalb der Schicht in Puffer und Proteinlösung ähnlich ist, sich vereinzelt jedoch eine weitere Lage Protein aus der Lösung anlagert. Dafür spricht auch die Form des Profils, welche in der rechten Flanke eine Schulter aufweist. Unterhalb der Denaturierungstemperatur von Lysozym ($T_{d,Lys} = 71$ °C) steigt die Schichtdicke mit steigender Temperatur leicht an, wobei der Bedeckungsgrad zwischen 50 °C und 68 °C, was bereits in der Nähe der Denaturierungstemperatur ist, abrupt absinkt. Bei 80 °C bleibt der Bedeckungsgrad konstant, wobei die Schichtdicke mit der Zeit weiter anwächst. Während des Zeitraumes des Experiments konnte keine Sättigung des Schichtwachstums festgestellt werden. Die Adsorption läuft folglich weiter, was darauf schließen lässt, dass sich das System nicht im Gleichgewicht befindet.

Ein ähnlicher Trend wird bei RNase A beobachtet (siehe Abb. 6.5b): Unterhalb der Denaturierungstemperatur von RNase ($T_{d,RNA} = 68$ °C) steigt d leicht an bei relativ konstantem Bedeckungsgrad, der bei 70 °C abrupt abfällt und dann wieder konstant bleibt. Die Schichtdicke steigt, ähnlich wie bei Lysozym, oberhalb der Denaturierungstemperatur stärker an.

Bei BSA (siehe Abb. 6.4f) zeigt das Volumenbruchprofil unterhalb der Denaturierungstemperatur $T_{d,BSA} = 57^\circ\text{C}$ keine Änderung. Oberhalb von $T_{d,BSA}$ ist eine leichte Erhöhung sowohl des Bedeckungsgrades als auch der Schichtdicke festzustellen. Die Stärke dieses Anstiegs ist jedoch deutlich schwächer als bei den Proteinen Lysozym und RNase A.

Für Fibronectin in Proteinlösung (siehe Abb. 6.4h) sind im Volumenbruchprofil, wie auch in Puffer, zwei Bereiche erkennbar. Bis zu 70°C steigt der Volumenanteil der dickeren Schicht an. Anders als bei den anderen Proteinen nimmt oberhalb von $T_{d,Fib}=65^\circ\text{C}$ bei 80°C der Volumenanteil in beiden Bereichen ab, wobei die Abnahme in der 20 \AA dicken Schicht nahe der Grenzfläche stärker ist als die der dickeren Schicht. Im Gegensatz zu der Messung im Puffer tritt in Proteinlösung bei 80°C kein Kollabieren der Proteinschicht auf. Das ließe sich mit einer Stabilisierung durch nahe beieinander liegende Proteine auf der Grenzfläche erklären. Das Kühlen hat auch in Proteinlösung keinen Effekt auf das Volumenbruchprofil von Fibronectin.

Im Folgenden wird die adsorbierte Menge, die der Fläche in den Volumenbruchprofilen entspricht, aller vier Proteine in Abhängigkeit der Temperatur betrachtet (siehe Abb. 6.6). Das diamantförmige Symbol bei Fibronectin (siehe Abb. 6.6d) steht für die Messung nachdem die Probe gekühlt wurde. Die Fehler sind, abgesehen von den Fehlern in der adsorbierten Menge bei BSA (siehe Abbildung 6.6c), kleiner als die Symbole. An dieser Stelle sei angemerkt, dass es sich bei den Absolutwerten der adsorbierten Mengen von BSA und Fibronectin und des Bedeckungsgrades von BSA um Schätzwerte handelt (siehe Abschnitt 4.1), da bei deren Bestimmung das eingenommene Volumen der Proteine benötigt wird, welches für diese beiden Proteine nur abgeschätzt werden konnte. Die ungenaue Bestimmung des Volumens liegt an dem Fehlen eines vollständigen pdb-files für die Struktur von Fibronectin bzw. den fehlenden Wasserstoffatomen im pdb-file von BSA. Die Trends sind jedoch unabhängig von den verwendeten Volumenwerten.

Vergleicht man die adsorbierte Menge der verschiedenen Proteine, sowohl in Puffer als auch in Proteinlösung, so lässt sich in gleicher Umgebung für die Proteine jeweils ein ähnlicher Trend feststellen.

In Puffer ist für alle untersuchten Proteine eine Abnahme der adsorbierten Menge zu beobachten. Eine Abnahme der adsorbierten Menge bedeutet, dass eine Desorption der Proteine im Puffer stattfindet. Dieser Trend ist für Lysozym und RNase A (siehe Abb. 6.6a und b) stärker ausgeprägt und kontinuierlicher als bei BSA und Fibronectin (siehe Abb. 6.6c und d). Bei BSA tritt eine abrupte Abnahme der adsorbierten Menge zwischen 40°C und 60°C auf, die jedoch im Vergleich zu der kontinuierlichen Abnahme bei den anderen Proteinen klein ist. Im Volumenbruchprofil von Fibronectin in Puffer (siehe Abb. 6.4g) ist ein Kollaps der Proteinschicht mit Desorption zu erkennen, was sich auch in der verringerten adsorbierten Menge bei 70°C widerspiegelt (siehe Abb. 6.6d). Die Abnahme der adsorbierten Mengen von Lysozym und RNase A (siehe Abb. 6.6) in Puffer mit steigender Temperatur wird im Wesentlichen durch eine Ab-

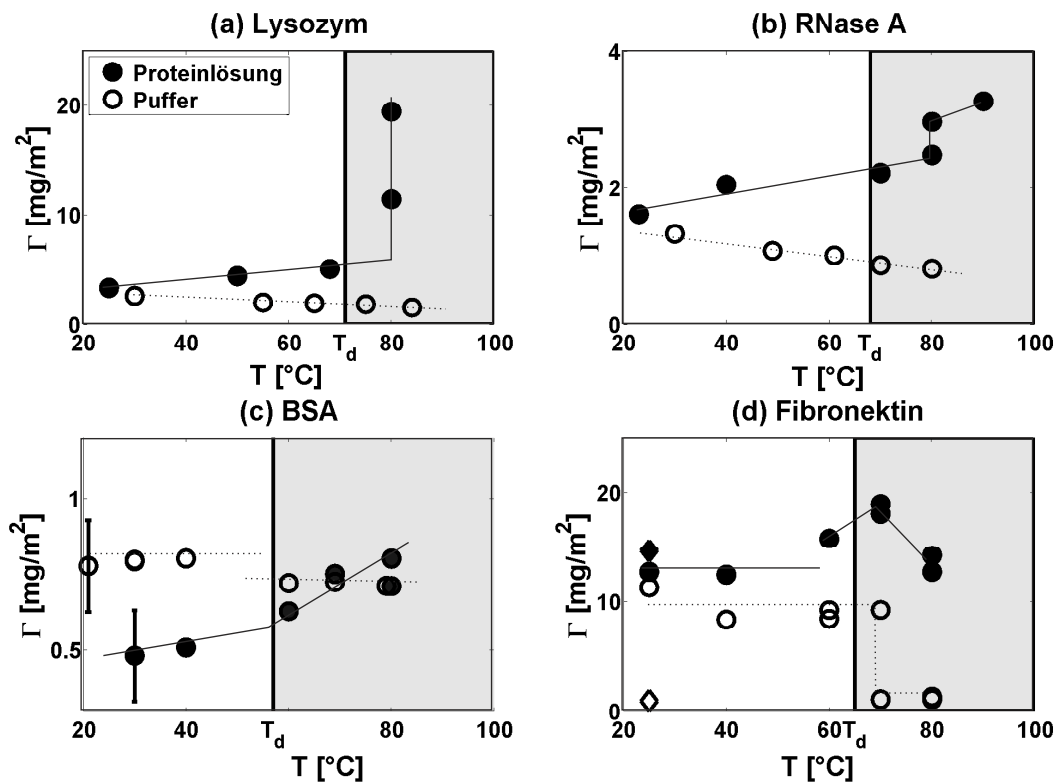


Abbildung 6.6: Adsorbierte Menge Γ von Proteinen auf Silizium in Puffer (leere Kreise) und in Proteinlösung (ausgefüllte Kreise) der Proteine (a) Lysozym, (b) RNase A, (c) BSA, und (d) Fibronektin in Abhängigkeit der Temperatur T . Punkte bei derselben Temperatur wurden nacheinander aufgenommen. Das diamantförmige Symbol bei Fibronektin kennzeichnet die Messung nach dem Kühlen. Die eingezeichneten Linien sind Führungslinien für das Auge. Der graue Bereich kennzeichnet Temperaturen oberhalb der Denaturierungstemperatur in Volumen-Lösung für das jeweilige Protein. Die Darstellungsbereiche für die adsorbierte Menge Γ sind nicht gleich.

nahme des Bedeckungsgrades bestimmt (siehe Abbildung 6.4 und 6.5). Die Abnahme der adsorbierten Menge bei BSA ist sowohl durch eine Abnahme der Schichtdicke als auch des Bedeckungsgrades bestimmt.

Die Desorption der Proteine von der Grenzfläche mit steigender Temperatur lässt sich kinetisch durch eine höhere Beweglichkeit der Proteine erklären. Dabei ist der Trend bei den harten Proteinen Lysozym und RNase A stärker ausgeprägt als bei den weichen Proteinen BSA und Fibronektin. Weiche Proteine passen ihre Form an die Grenzfläche an und erhöhen so die Kontaktfläche. Eine erhöhte Kontaktfläche verringert die Beweglichkeit der Proteine, sodass weniger Proteine desorbieren können.

Tie et al. berichten in einer Studie von einer vergangenheitsabhängigen Desorption von Fibronektin, Cytochrom *c*, und Lysozym auf einer $\text{Si}(\text{Ti})\text{O}_2$ Oberfläche [107]. Ihre Experimente weisen einen Gleichgewichtszustand nach zehn Minuten auf. Die Messungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind frühestens zehn Minuten nach dem Lösungsaustausch begonnen worden. Um dennoch eine rein zeitabhängige Desorp-

tion auszuschließen, wurde eine Lysozimschicht in Puffer in Abständen von mehreren Stunden bei Raumtemperatur bis zu 18h nach der Präparation untersucht. In der Abbildung 6.7 sind die entsprechenden normierten Reflektivitäten (a) und die dazugehörigen Volumenbruchprofile (b) dargestellt. Es ist keine signifikante Änderung in diesem Zeitrahmen festzustellen.

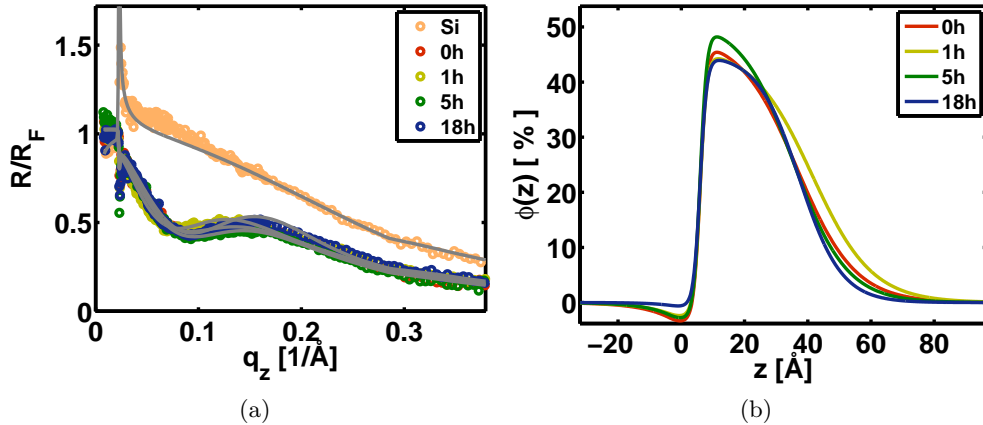


Abbildung 6.7: Untersuchung zur zeitabhängigen Desorption von Lysozym auf Silizium in Puffer. Dabei sind (a) die normierten Reflektivitäten und (b) die dazugehörigen Volumenbruchprofile. Es ist keine signifikante Änderung der Volumenbruchprofile im Zeitrahmen von 18h beobachtet worden.

Im Gegensatz zur Abnahme der adsorbierten Menge in Puffer tritt in Proteinlösung eine Zunahme der adsorbierten Menge auf. Auch hier lässt sich dieser Trend für alle vier untersuchten Proteine beobachten. Eine Zunahme der adsorbierten Menge bedeutet, dass weitere Proteine aus der Lösung adsorbieren. Oberhalb der Denaturierungstemperatur ist der Anstieg der adsorbierten Menge bei Lysozym und RNase A (siehe Abb. 6.6a und b) größer als unterhalb dieser Temperatur. Für BSA (siehe Abb. 6.6c) kann ein etwas stärkerer Anstieg der adsorbierten Menge oberhalb von $T_{d,BSA}$ festgestellt werden, wobei diese Zunahme deutlich schwächer ausgeprägt ist als bei Lys und RNase A. Fibronektin (siehe Abb. 6.6d) zeigt in Proteinlösung eine Zunahme der adsorbierten Menge bereits knapp unterhalb der Denaturierungstemperatur. Bei 80 °C sinkt die adsorbierte Menge jedoch wieder.

In Proteinlösung ist die Zunahme der adsorbierten Menge bei den vier untersuchten Proteinen zumindest zum Teil durch eine größere Schichtdicke bestimmt. Das ist insbesondere für Lysozym und RNase A gegeben, da der Bedeckungsgrad bei der Denaturierungstemperatur sogar abnimmt. Die Schichtdicke nimmt, ebenso wie im Fall der adsorbierten Menge, unterhalb der Denaturierungstemperatur leicht zu, während sie oberhalb dieser Temperatur stärker zunimmt.

Jackler et al. haben in einer Studie mit optischer Reflektivität und Neutronenreflektometrie ebenfalls die temperaturabhängige Adsorption von Lysozym auf Silizium in einer Proteinlösung mit einer Konzentration von $c = 0.1$ g/mL untersucht [33]. Bei 80 °C

nimmt in dieser Studie die adsorbierte Menge wie auch die Schichtdicke, ähnlich wie in den hier präsentierten Messungen, stark zu. Diese starke Schichtdickenzunahme lässt auf die Bildung von Multilagern schließen. Die Zunahme der adsorbierten Menge mit der Temperatur weist auf einen entropischen Effekt hin. In der Studie von Jackler wird diese Entropiezunahme mit einer kleinen Konformationsänderung der adsorbierten Proteine begründet. Oberhalb der Denaturierungstemperatur kommt es laut der Studie zu einer Dehydrierung der hydrophoben Reste [32, 33], die sich bei dieser Temperatur durch die Entfaltung des Proteins in der Lösung im Kontakt mit der wässrigen Umgebung befinden. Durch den hydrophoben Effekt wird dann eine verstärkte Adsorption bevorzugt.

Ein Grund für die schwächere Adsorption von BSA im Vergleich zu den anderen Proteinen liegt in der elektrostatischen Abstoßung zwischen dem Siliziumwafer und BSA, die bei pH 7 beide negativ geladen sind.

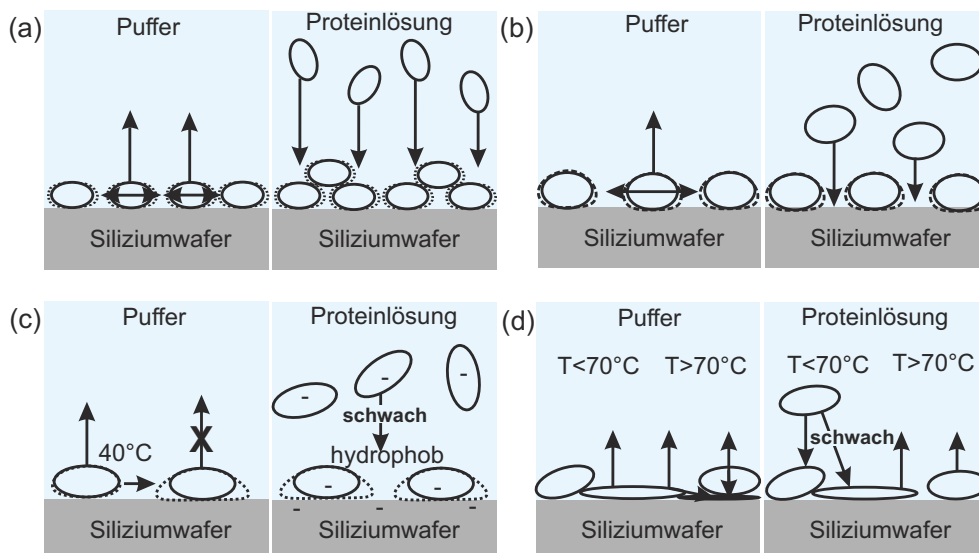


Abbildung 6.8: Modell zur temperaturabhängigen Adsorption und Desorption in Puffer und Proteinlösung von verschiedenen Proteinen: (a) Lysozym, (b) RNase A, (c) BSA, und (d) Fibronectin. Die gestrichelten Linien stellen Konformationsänderungen dar.

Die beobachteten Trends zur temperaturabhängigen Adsorption und Desorption in Puffer und Proteinlösung sind in einem Modell in Abbildung 6.8 zusammengefasst. Für alle untersuchten Proteine ist eine Desorption in Puffer und eine Adsorption in Proteinlösung zu beobachten. Die Desorption lässt sich kinetisch über eine erhöhte Beweglichkeit der adsorbierten Proteine mit steigender Temperatur erklären. Bei weichen Proteinen, wie BSA, führt eine Verformung zu einer höheren Kontaktfläche zwischen Protein und Waferoberfläche, sodass die Beweglichkeit verringert ist. Die Desorption ist dementsprechend bei den weichen Proteinen schwächer ausgeprägt.

Die zunehmende Adsorption mit steigender Temperatur in Proteinlösung ist entropiegetrieben und lässt sich über kleine Konformationsänderungen erklären (durch die gestrichelte Linien in Abbildung 6.8 gekennzeichnet). Eine verstärkte Adsorption oberhalb

der Denaturierungstemperatur lässt sich über den hydrophoben Effekt verstehen. Auf Grund von Entfaltung ragen auch Seitenketten heraus und wechselwirken mit dem umgebenden Wasser. Für BSA wird die Adsorption durch die abstoßende elektrostatische Wechselwirkung zwischen Protein und Wafer-Oberfläche geschwächt. Bei Fibronectin haben die verschiedenen Konformationen einen wesentlichen Einfluss auf die Adsorption und Desorption.

6.4 Temperaturabhängiges Verhalten von Apolipoprotein A1 auf einem hydrophoben Substrat

Bisher wurden häufig verwendete Modell-Proteine auf hydrophilen Substraten untersucht. Im Folgenden wird ein für den Fettstoffwechsel des Menschen essentielles Protein, das Apolipoprotein A1, betrachtet. Durch den Aufbau dieses Proteins mit hydrophoben Bereichen auf der Innenseite eines Rings und hydrophilen Bereichen auf der Außenseite lagert sich dieses Protein bevorzugt an einer Grenzfläche zwischen Wasser und einer hydrophoben Oberfläche an. Um das Verständnis der Adsorptionsmechanismen von komplexen und medizinisch relevanten Proteinen zu verbessern, wurde das temperaturabhängige Verhalten von Apolipoprotein A1 auf einem hydrophoben Substrat in Puffer und Proteinlösung untersucht. Als hydrophobe Substrate wurden Siliziumwafer mit einer OTS-Schicht (Octadecyltrichlorosilan) verwendet. Die Herstellung dieser Substrate wurde bereits in Abschnitt 4.4 beschrieben. Die Versuchsdurchführung ist in Abschnitt 5.1 erläutert.

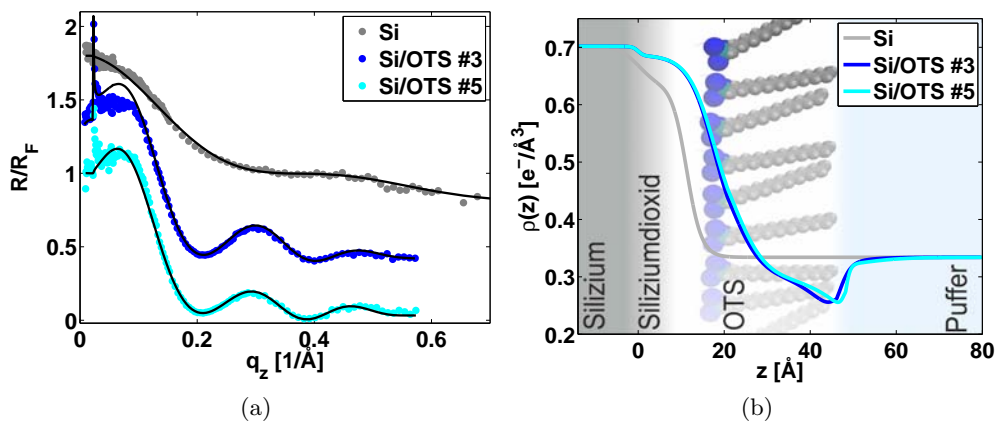


Abbildung 6.9: Fresnel-normierte Reflektivität der mit OTS beschichteten Siliziumwafer (a) und die zugehörigen Elektronendichteprofile (b). Im Hintergrund des Elektronendichteprofiles ist schematisch das zugrundeliegende Modell skizziert. Die Reflektivitäten sind relativ zueinander entlang der Ordinate verschoben worden. Die Nummer in der Legende bezeichnet den jeweiligen verwendeten Wafer.

Zunächst wurden die präparierten hydrophoben Wafer charakterisiert. In Abbildung 6.9 sind die Fresnel-normierten Reflektivitäten (a) und entsprechenden Elektronendichte-

profile (b) dargestellt. Die Reflektivitäten wurden zur besseren Erkennbarkeit relativ zueinander entlang der y -Achse verschoben. Die Nummern in der Legende bezeichnen den jeweils verwendeten Wafer. Die durchgezogenen Linien entsprechen den berechneten Reflektivitäten der modellierten Elektronendichteprofile. Im Hintergrund des Elektronendichteprofiles ist das zugrundeliegende Modell dargestellt, wie es ähnlich auch bei *Mezger et al.* [101] verwendet wird.

An der Oberfläche des Siliziumwafers befindet sich eine native Siliziumdioxidschicht mit einer Dicke von etwa 10 \AA . Auf dieser ordnen sich die OTS-Moleküle an. Die Kopfgruppen weisen eine etwas höhere Elektronendichte als die Schwanzgruppen auf. Die Schwanzgruppen haben eine geringere Elektronendichte als der Puffer. Oberhalb der Schwanzgruppen befindet sich ein Bereich, der eine noch niedrigere Elektronendichte aufweist. In der Literatur [101, 108–116] wird dieser Verarmungsbereich zwischen hydrophoben Substraten und der wässrigen Umgebung als hydrophobes Gap bezeichnet, in der die Wasserdichte geringer als im Volumen ist. Im Vergleich zu den Elektronendichteprofilen von *Mezger et al.* [101] weisen die Elektronendichteprofile in Abbildung 6.9b höhere Rauigkeiten zwischen den einzelnen Bereichen auf, was auf eine undefiniertere Schicht hindeutet. Dennoch haben die Oberflächen gute hydrophobe Eigenschaften, was durch das Abperlen von Wassertropfen überprüft wurde. Die Unterschiede zwischen den Wafern sind geringfügig und durch die Präparation bedingt.

In Abbildung 6.10 sind die temperaturabhängigen Fresnel-normierten Reflektivitäten von Apolipoprotein A1-Schichten auf den hydrophoben Substraten dargestellt. Der Wafer #5 wurde in Puffer gemessen (a), wohingegen der Wafer #3 für die Messungen in der Proteinlösung belassen wurde (b). Die Reflektivitäten sind zur besseren Erkennbarkeit relativ zueinander entlang der y -Achse verschoben. Die durchgezogenen Linien sind die berechneten Reflektivitäten aus den modellierten Elektronendichteprofilen (siehe Abb. 6.11). In den Reflektivitäten mit Protein sind die Oszillationen stärker ausgeprägt als bei den reinen Si/OTS-Substraten. Mit steigender Temperatur ist eine Verschiebung der Minima und Maxima zu beobachten, was vor allem im q_z Bereich von 0.2 \AA^{-1} bis 0.3 \AA^{-1} sichtbar wird. Zwischen den Messungen in Puffer und in Proteinlösung lässt sich anhand der Reflektivitäten kein offensichtlicher Unterschied feststellen.

Die Elektronendichteprofile der Messungen in Puffer (Wafer #5) in Abbildung 6.11 sind zur besseren Erkennbarkeit um $0.1 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ nach oben verschoben worden. In beiden Messreihen ist in den Elektronendichteprofilen im Bereich von $z = 50 \text{ \AA}$ bis 70 \AA eine Erhöhung der Elektronendichte festzustellen, die auf die Adsorption von Apolipoprotein A1 schließen lässt. In Proteinlösung ist diese Erhöhung etwas stärker ausgeprägt, was auf eine erhöhte adsorbierte Menge hinweist. Der Bereich ist mit einer Breite von 20 \AA kleiner als die kleinste Ausdehnung von Apo A1 ($135 \times 90 \times 60 \text{ \AA}^3$). Das deutet darauf hin, dass sich das Apo A1 an der Grenzfläche verformt. Eine Möglichkeit wäre, dass sich der verdrillte Ring der nativen Konformation flach an die Oberfläche

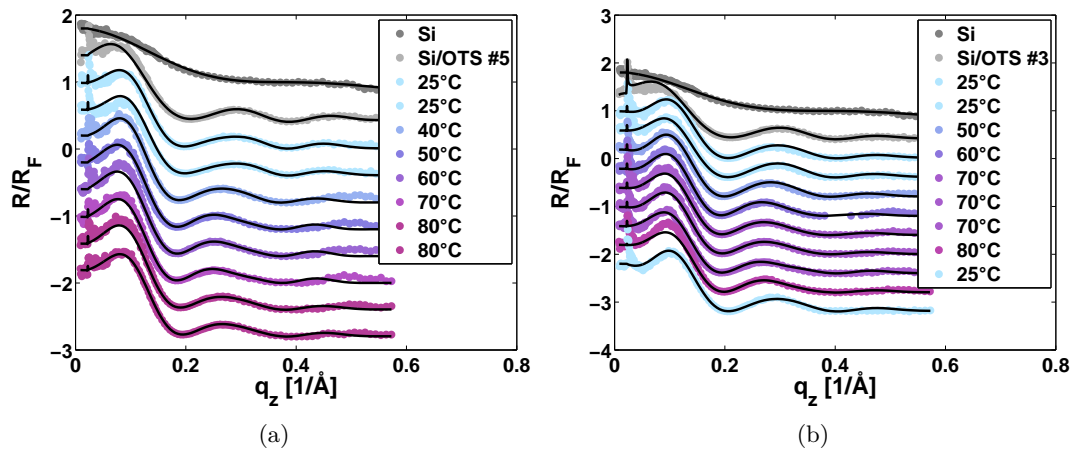


Abbildung 6.10: Temperaturabhängige Fresnel-normierte Reflektivitäten von Apolipoprotein A1 Schichten auf hydrophoben Si/OTS-Wafern in Puffer (a) und Proteinlösung (b). Die Reflektivitäten sind zur besseren Erkennbarkeit relativ zueinander entlang der Ordinate verschoben. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die berechneten Reflektivitäten aus den modellierten Elektronendichteprofilen.

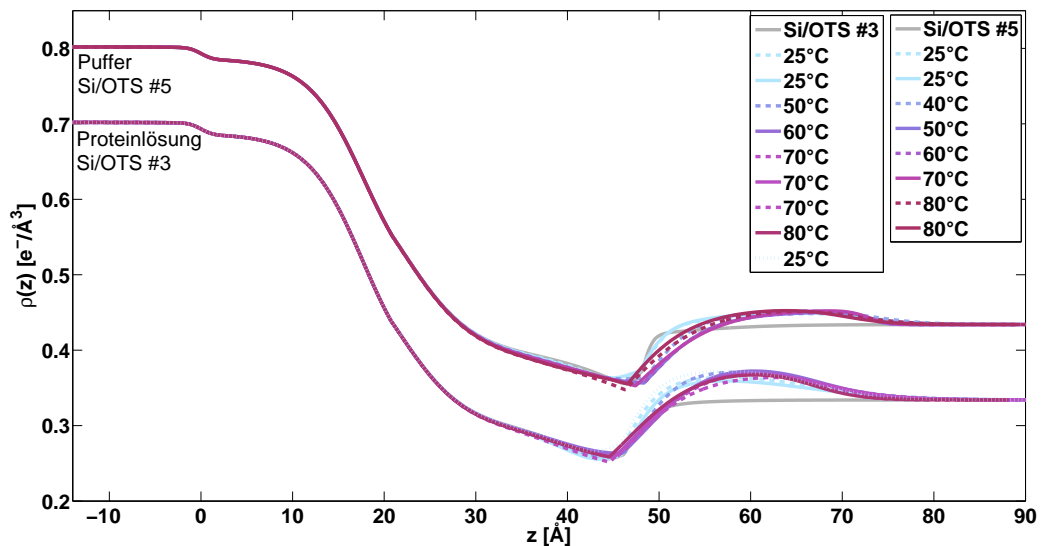


Abbildung 6.11: Elektronendichteprofile von Apolipoprotein A1 auf Siliziumwafern, die mit OTS hydrophobiert wurden, in Puffer (#5) und Proteinlösung (#3). Die Elektronendichteprofile in Puffer wurden zur besseren Erkennbarkeit um $0.1 \text{ e}^-/\text{Å}^3$ nach oben verschoben. Die letzte Messung bei Si/OTS #3 in Proteinlösung wurde nach dem Heizzyklus gemessen.

schmiegt, um so die maximale Kontaktfläche zu erzeugen. Mit steigender Temperatur verändert sich im Wesentlichen nur die Steilheit der Flanke bei $z = 50 \text{ \AA}$. Dieser Trend ist in Proteinlösung stärker ausgeprägt als in Puffer. Eine geringere Steigung an der Grenzfläche zwischen der Verarmungszone und dem Protein bedeutet eine größere Rauigkeit. Diese kann zum Beispiel durch Seitenketten erhöht werden, die in die Verarmungszone hineinragen. In einer kalorimetrischen Studie von *Gursky et al.* [91] wurde ein breites Signal im Bereich von 25 °C bis 90 °C gemessen. Dieses breite Signal lässt darauf schließen, dass Apolipoprotein A1 in Lösung mit steigender Temperatur Konformationsänderungen über mehrere nicht voneinander abgegrenzte Zustände durchführt. Diese Konformationsänderungen könnten auch bei dem adsorbierten Apo A1 vorliegen und die Veränderung der Rauigkeit erklären.

Wegen der Verarmungszone ist es nicht möglich, sinnvoll ein Volumenbruchprofil von Apo A1 zu bestimmen, da nicht gewährleistet werden kann, dass sich diese Zone durch das Protein oder die Temperatur nicht verändert. Dementsprechend können auch weder adsorbierte Menge, noch Schichtdicke oder Bedeckungsgrad exakt bestimmt werden. Dennoch zeigen die Elektronendichteprofile, dass Apo A1 auf den hydrophoben Substraten adsorbiert, es nicht in Puffer desorbiert, und sich mit steigender Temperatur die Rauigkeit zwischen der Verarmungszone und dem Protein erhöht. Zu dem massiven Schichtwachstum wie im Falle des Lysozyms kommt es ebenfalls nicht. Bei einer erneuten Messung nach Abkühlung auf 25 °C ist das Elektronendichteprofil ähnlich wie vor dem Heizen.

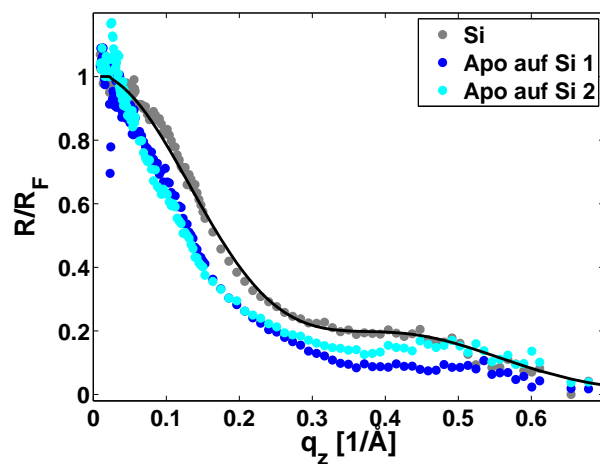


Abbildung 6.12: Fresnel-normierte Reflektivitäten von Apolipoprotein A1 auf Silizium. Die beiden Reflektivitäten wurden direkt nacheinander aufgenommen.

Zum Vergleich wurde überprüft, ob Apolipoprotein A1 ebenfalls an hydrophilen Grenzflächen adsorbiert. Dazu wurden Reflektivitäten an Siliziumwafern in Apolipoproteinlösung aufgenommen. Diese sind in Abbildung 6.12 dargestellt. Die beiden Reflektivitäten wurden direkt nacheinander aufgenommen. Erkennbar ist, dass keine ausgeprägten Minima wie bei den zuvor untersuchten Proteinen (siehe Abbildung 6.3) zu erkennen sind,

sondern die Intensität der Reflektivität mit Protein etwas steiler abfällt als bei dem reinen Substrat. Das lässt auf eine stärkere Rauigkeit der Grenzfläche schließen, wie sie durch eine inhomogene und sehr dünne Schicht entstehen kann. Dementsprechend lässt sich daraus schließen, dass nahezu keine Adsorption von Apo A1 auf hydrophilen Siliziumwafern stattfindet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine adsorbierte Schicht von Apo A1 auf hydrophoben Oberflächen, im Gegensatz zu hydrophilen Oberflächen, sowohl in Puffer als auch in Proteinlösung beobachtet werden konnte. Die Schichtdicke ist mit 20 \AA kleiner als die Maße des Proteins ($135 \times 90 \times 60 \text{ \AA}^3$), was auf eine Verformung des Proteins schließen lässt. Bei steigender Temperatur erhöht sich tendenziell die Rauigkeit zwischen der Verarmungszone und dem Protein, was auf eine temperaturabhängige Verformung hindeutet. Eine Desorption in Puffer oder eine Adsorption in Proteinlösung, analog zu den Messungen auf Silizium in Abschnitt 6.3, konnte nicht festgestellt werden.

6.5 Proteinadsorption an der Flüssig/Gas-Grenzfläche

In den bisherigen Abschnitten wurde Proteinadsorption an der Fest/Flüssig-Grenzfläche untersucht. Im menschlichen Körper sind jedoch vor allem Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Zellmembranen von Bedeutung. Dort sind Proteine zuständig für den Transport durch Zellmembranen [15] oder, wie z.B. beim Apolipoprotein A1, für den Abtransport von Lipiden und Cholesterol im Fettstoffwechsel [89, 117]. Daher ist ein tiefgehendes Verständnis des Adsorptionsverhalten von Proteinen an der Flüssig/Membran-Grenzfläche notwendig.

Um ein einfaches und reproduzierbares Modell für eine Membran experimentell herzustellen, werden Lipidmonolagen an der Flüssig/Gas-Grenzfläche verwendet. In einigen Studien wurde bereits über die Adsorption von Proteinen sowohl an der freien Flüssig/Gas-Grenzfläche als auch Lipidschichten berichtet. Dabei wurde von *Tiemeyer et al.* der Einfluss der Ladungsverteilung auf die Orientierung der adsorbierten Proteine Lysozym und RNase A an Lipidschichten (DPPC und Stearinsäure) untersucht [18]. *Yano et al.* beschreiben in ihrer Studie Adsorptionsmechanismen von Lysozym an der freien Flüssig/Gas-Grenzfläche und das Aussalzen von Lysozym an dieser Grenzfläche bei hohen Salzkonzentrationen [118]. *Ibdah et al.* haben mehrere Studien zur Adsorption von Apolipoprotein A1 sowohl an der Wasser/Luft-Grenzfläche als auch an Lipidmembranen durchgeführt [19, 44]. Die verwendete Methode war hierbei die Messung der Oberflächenradioaktivität. Damit lässt sich die adsorbierte Menge bestimmen, jedoch keine Informationen über die Struktur der Adsorbatschichten gewinnen. In einer Studie von *Lecompte et al.* wurde der Einfluss des Oberflächendrucks und der Proteinkonzentration auf das Adsorptionsverhalten von Apolipoprotein A1 elektrochemisch analysiert [21].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich die beiden Proteine Lysozym und Apolipoprotein A1 an der freien Flüssig/Gas-Grenzfläche und an Lipidschichten

(DPPA) verhalten. Ein weiterer Schritt in Richtung einer realen Membran ist die Einlagerung von Cholesterol in die Lipidmonolage. Auch an diesem System wurde die Proteinsorption untersucht. Da bisher nicht bekannt ist, ob sich Proteine an dieser Grenzfläche lateral geordnet anlagern, wurden neben Röntgenreflektivitätsmessungen, welche Informationen über die Elektronendichteverteilung senkrecht zur Probenoberfläche liefern, auch GISAXS-Experimente durchgeführt. Dabei wurde neben DPPA auch Stearinsäure als Modellmembran verwendet. Die Experimente an der Flüssig/Gas-Grenzfläche wurden an der Strahllinie BW1 an DORIS III (DESY) in Hamburg durchgeführt.

6.5.1 Die vertikale Struktur von Lipid- und Proteinschichten an der Flüssig/Gas-Grenzfläche und an Modellmembranen

Zunächst wurde mittels Röntgenreflektivitätsmessungen untersucht, ob und wie sich die Proteine an der Grenzfläche anlagern. In Abbildung 6.13 sind die Fresnel-normierten Reflektivitäten (linke Spalte) und die modellierten Elektronendichteprofile (rechte Spalte) dargestellt. Die Reflektivitäten und die Elektronendichteprofile sind aufgeteilt in Messungen an der freien Flüssig/Gas-Grenzfläche (siehe Abb. 6.13a und b), an der Modellmembran aus DPPA (siehe Abb. 6.13c und d) und an einer Mischung aus DPPA und Cholesterol (siehe Abb. 6.13e und f). Die Farben entsprechen den Messungen ohne Protein (schwarz), denen mit Lysozym (rot) und denen mit Apolipoprotein A1 (blau). Die Reflektivitäten sind zur besseren Übersicht relativ zueinander entlang der Ordinate verschoben. Die durchgezogenen Linien in den Reflektivitäten entsprechen den berechneten Reflektivitäten aus den Elektronendichteprofilen in der rechten Spalte in Abbildung 6.13.

Im Vergleich der Reflektivitäten DPPA und DPPA mit Cholesterol erkennt man bereits in den Reflektivitäten (siehe Abb. 6.13 linke Spalte, schwarz) eine ausgeprägte Oszillation bei DPPA und eine schwächere Oszillation bei DPPA mit Cholesterol. Das Elektronendichteprofil für DPPA (siehe Abb. 6.13d, schwarz) zeigt deutlich die Ausbildung einer Lipidmonolage, die sich durch eine Erhöhung der Elektronendichte im Bereich der Kopfgruppe und einer ähnlichen Elektronendichte wie die wässrige Phase im Bereich der Schwanzgruppe auszeichnet. In der Mischung DPPA mit Cholesterol (siehe Abb. 6.13f, schwarz) ist ebenfalls die Ausbildung des Lipidfilms an der Grenzfläche zu beobachten. Dieser hat jedoch keine ausgeprägte Struktur wie die reine DPPA-Monolage. Bei DPPA wurde ein Oberflächendruck von $\Pi = 35 \text{ mN/m}$ eingestellt. In der Mischung mit Cholesterol betrug der Oberflächendruck $\Pi = 30 \text{ mN/m}$. Das Elektronendichteprofil deutet darauf hin, dass Cholesterol die geordnete Struktur des Langmuirfilms stört.

Vergleicht man die Reflektivität der freien Puffer-Grenzfläche mit denen mit Protein (siehe Abb. 6.13a), so ist für Lysozym (rot) ein stark ausgeprägtes Maximum und für Apolipoprotein A1 (blau) eine Oszillation zu erkennen. In den entsprechend angepassten Elektronendichteprofilen ist für Lysozym deutlich die Anlagerung an der Grenzfläche zu erkennen. Die Breite der Erhöhung entspricht in etwa dem Durchmesser von Lyso-

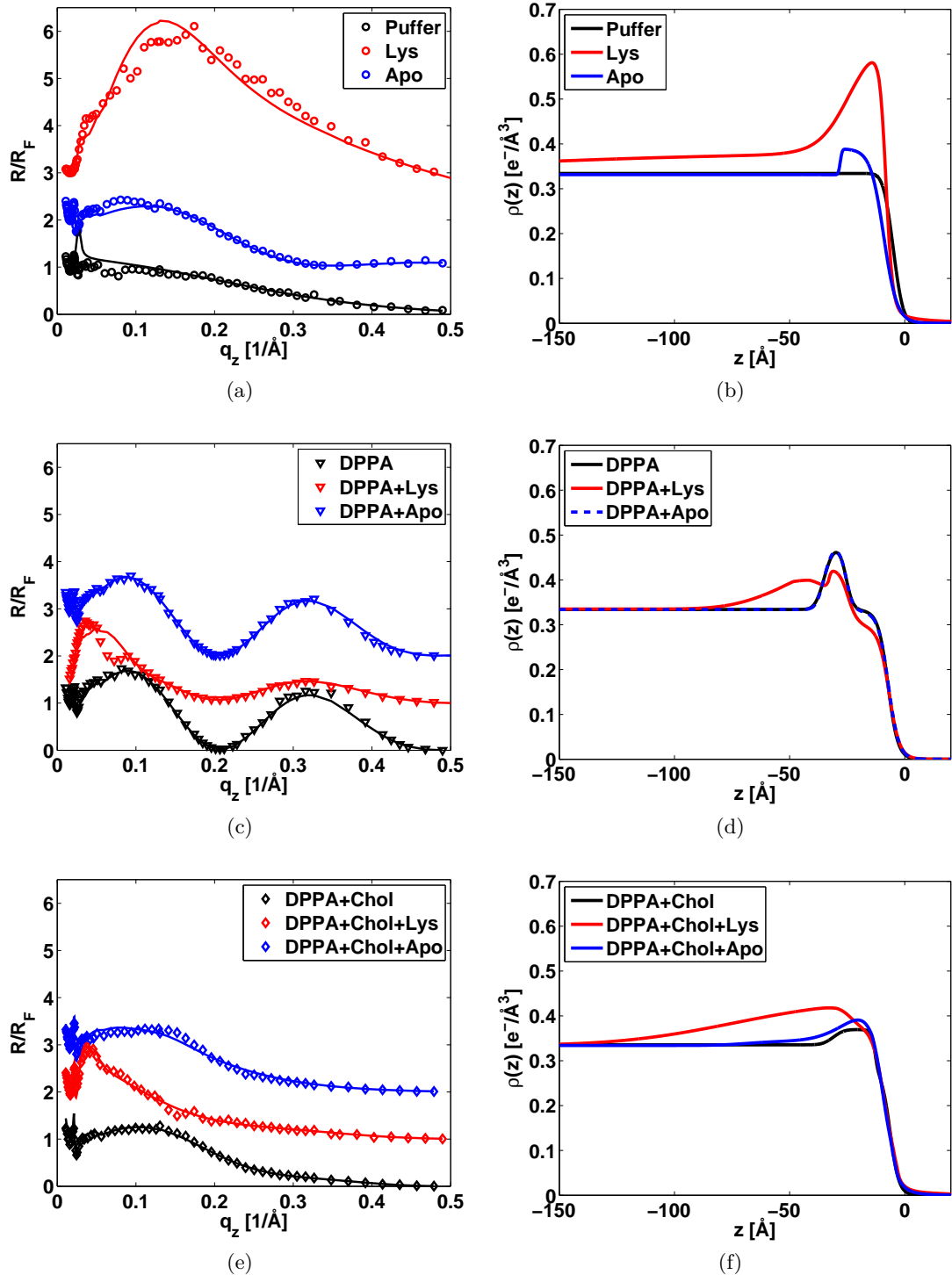


Abbildung 6.13: Fresnel-normierte Reflektivitäten (linke Spalte) und Elektronendichteprofile (rechte Spalte) an der Flüssig/Gas-Grenzfläche mit den Proteinen Lysozym und Apolipoprotein A1 an Puffer, unter DPPA und unter einer 46 mol% Mischung von DPPA und Cholesterol. Die durchgezogenen Linien in der linken Spalte entsprechen den berechneten Reflektivitäten aus den Elektronendichteprofilen in der rechten Spalte. Die Reflektivitäten und die Elektronendichteprofile sind jeweils um einem konstanten Wert relativ zueinander entlang der Ordinate verschoben.

zym, der 30 – 45 Å beträgt, sodass man annehmen kann, dass eine Monolage Lysozym adsorbiert ist. Das Elektronendichteprofil geht in der Wasserphase jedoch nicht sofort auf die Elektronendichte von Wasser zurück, sondern weist in einem großen Bereich eine leicht erhöhte Elektronendichte auf. Das lässt darauf zurückschließen, dass sich in der Nähe der Oberfläche eine Anreicherung des Proteins beobachten lässt. Ein ähnliches Verhalten von Lysozym an der Wasser/Luft-Grenzfläche wurde von *Yano et al.* [118] berichtet.

Beim Apolipoprotein A1 an der freien Puffer-Grenzfläche (siehe Abb. 6.14b, blau) ist ebenfalls eine Anlagerung zu sehen, die jedoch eine deutlich geringere Elektronendichte im Vergleich zu der Lysozym-Schicht aufweist. Ein Grund für die vergleichsweise geringere Elektronendichte kann in der ringförmigen Struktur des Proteins liegen, da innerhalb des Rings die Elektronendichte des Wassers vorliegt und somit die mittlere Elektronendichte von Apolipoprotein A1 vergleichsweise gering ist (siehe Tab. 4.1 in Abschnitt 4.1). In der nativen Form liegt Apolipoprotein A1 in einer ringförmigen Struktur vor, die leicht ineinander verdreht ist. Die tertiäre Struktur von Apolipoprotein A1 hat die Maße $135 \times 90 \times 60 \text{ \AA}^3$. Die Dicke der Adsorbatschicht entspricht mit etwa 20 Å der Dicke des Rings. Es ist dementsprechend naheliegend, dass sich der Ring möglichst flach an der Grenzfläche anlagert. Im Inneren des Ringes befinden sich die hydrophoben Bereiche des Proteins. Das Bestreben der hydrophoben Bereiche, den Kontakt zu der hydrophoben Flüssig/Gas-Grenzfläche herzustellen, ist eine Erklärung für die Verformung. Diese Beobachtung wurde auch im Rahmen der Diplomarbeit von Matthias Kampmann bestätigt [119].

Bei den Messungen mit Protein unter DPPA kann man bei Lysozym (siehe Abb. 2.1d, rot) eine Anlagerung unter der DPPA-Schicht erkennen. Da bei pH 7 DPPA negativ und Lysozym positiv geladen ist, kommt es zwischen der Lipidschicht und dem Protein zu einer elektrostatisch anziehenden Wechselwirkung. Apolipoprotein A1 ist hingegen bei pH 7 ebenso wie DPPA negativ geladen, sodass es zu einer elektrostatischen Abstoßung kommt. Im Elektronendichteprofil ist keine Änderung im Vergleich zur DPPA-Schicht ohne Protein zu erkennen (siehe Abb. 2.1d, blau). In einer elektrochemischen Studie von *Lecompte et al.* [21] wurde konzentrationsabhängig die Adsorption von Apolipoprotein A1 an polaren Lipidschichten untersucht. Dort wurde festgestellt, dass es bei Konzentrationen unterhalb von $10 \mu\text{g/mL}$ zu einer Anlagerung durch elektrostatische Wechselwirkung kommt, und erst oberhalb dieser Konzentration zu einem Eindringen der Proteine in die Lipidschicht. Da in dieser Arbeit eine Konzentration von $0.5 \mu\text{g/mL}$ verwendet wurde, und die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Apolipoprotein A1 und DPPA abstoßend ist, bestätigen die hier präsentierten Ergebnisse die Studie von Lecompte.

In den Elektronendichteprofilen mit Proteinen unter DPPA mit Cholesterol (siehe Abb. 2.1f) lassen sich Unterschiede sowohl zur Messung ohne Protein als auch zur freien Puffer/Gas-Grenzfläche feststellen. Beim Lysozym (rot) kann zwischen der Lipidschicht

und der Proteinschicht unterschieden werden. Beim Apolipoprotein A1 an DPPA mit Cholesterol ist eine klare Trennung der beiden Komponenten jedoch nicht mehr möglich. Dennoch ist im Elektronendichteprofil von Apolipoprotein A1 an DPPA mit Cholesterol (blau) eine Erhöhung der Elektronendichte im Bereich der Lipidschicht zu beobachten. Auch die Breite der Erhöhung ist im Vergleich zur Lipidschicht ohne Protein größer. Das spricht dafür, dass sich das Apolipoprotein A1 in der Lipidmembran einlagert und diese durchdringt. *Ibdah et al.* [19] haben mittels Oberflächenradioaktivität die Adsorption von Apolipoprotein A1 an verschiedenen Lipidschichten untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich Apolipoprotein A1 besser an weniger stark komprimierten Lipidschichten anlagert. Die Anwesenheit von Cholesterol soll in dieser Studie die Adsorption eher verringert haben. Nach dieser Untersuchung ist es wahrscheinlicher, dass es bei Apolipoproteins A1 unter DPPA mit Cholesterol eher zu einer Anlagerung kommt als unter DPPA, weil die elektrostatische Abstoßung durch die Zugabe von Cholesterol geschwächt wird.

Zusammenfassend lässt sich für die Untersuchung der Protein-Adsorption an der Flüssig-Gas-Grenzfläche sagen, dass die Adsorption an der freien Puffer/Gas-Grenzfläche für beide Proteine beobachtet wurde und sich im Wesentlichen auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückführen lässt. An der Grenzfläche zu DPPA sind hingegen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Protein und der Lipidschicht von Bedeutung. In den Experimenten mit DPPA und Cholesterol ist eine Anlagerung der Proteine an der Grenzfläche zu beobachten.

6.5.2 Laterale Ordnung von Proteinen an der Flüssig/Gas-Grenzfläche und an Modellmembranen

In bisherigen Studien zur lateralen Ordnung an der Flüssig/Gas-Grenzfläche wurde vor allem Diffraktion unter streifendem Einfall (GID) durchgeführt. Der wesentliche Unterschied zwischen GISAXS und GID liegt in der Größe des lateralen Wellenvektorübertrages parallel zur Probenoberfläche. Wie bereits im Abschnitt 3.2 erläutert wurde, lassen sich unter einem größeren Winkel (GID) kleinere Strukturen, wie die laterale Struktur von Lipidmonolagen, untersuchen.

In einem kleineren Winkelbereich, wie er bei GISAXS verwendet wird, lassen sich laterale Strukturen in der Größenordnung von Proteinen detektieren. Bisher sind, abgesehen von wenigen grundlegenden Experimenten im Rahmen einer Dissertation [120], noch keine *in situ* Untersuchungen zur lateralen Struktur von adsorbierten Proteinen an der Flüssig/Gas-Grenzfläche oder an Lipidschichten veröffentlicht worden. Dabei stellt sich die Frage, ob eine weitreichende laterale Ordnung der adsorbierten Proteine vorliegt, und ob diese durch die Anwesenheit einer Lipidschicht, mit und ohne Cholesterol, beeinflusst wird. Sollte es eine laterale Ordnung von Cholesterol in Lipidschichten geben, so wäre es möglich, dass diese auch die laterale Struktur von adsorbierten Proteinen beeinflusst. Die Experimente wurden mit Lysozym durchgeführt.

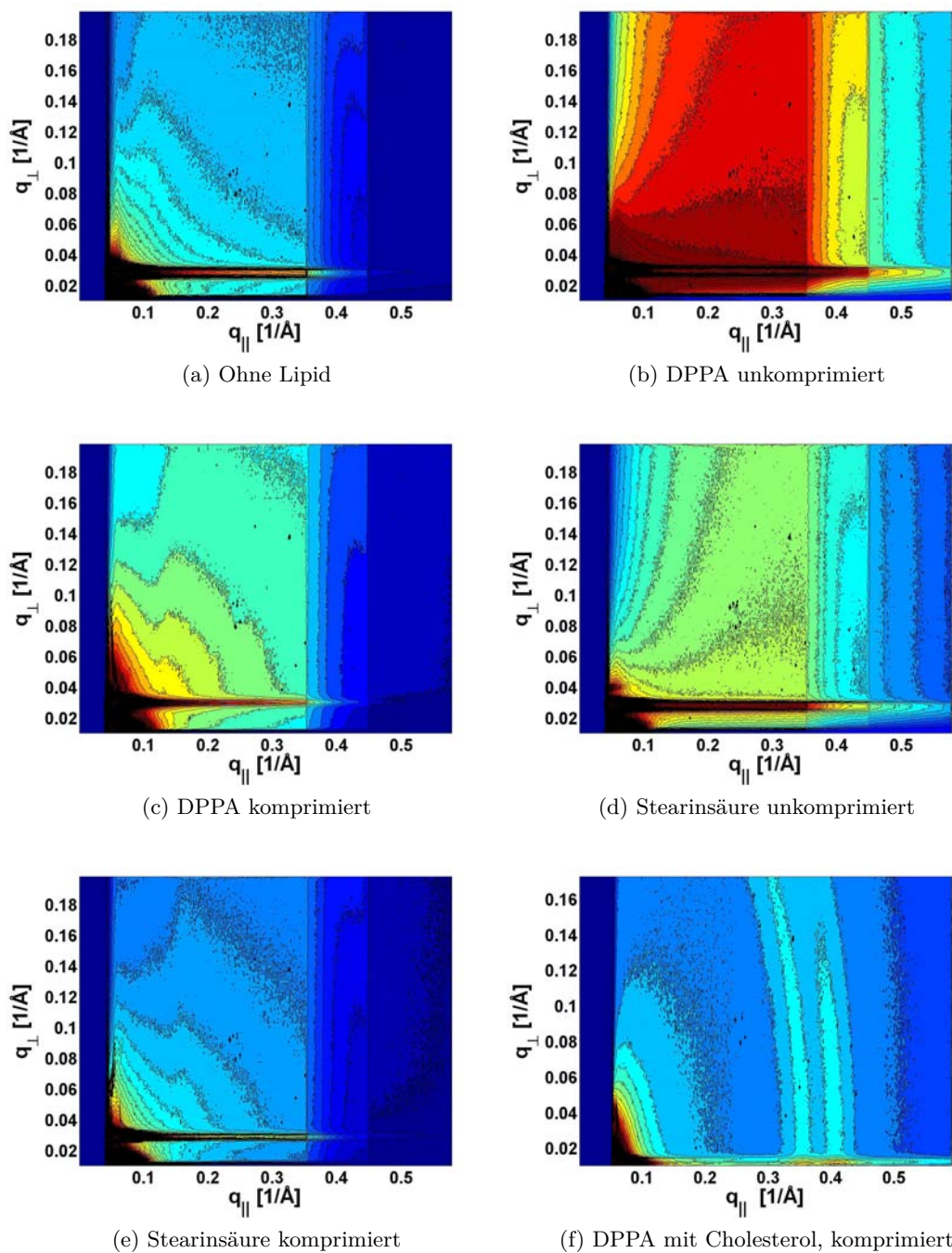


Abbildung 6.14: GISAXS-Aufnahmen von Lysozym an der Flüssig/Gas-Grenzfläche und an Modellmembranen.

Dazu werden nun die GISAXS-Aufnahmen an der Flüssig/Gas-Grenzfläche, die in Abbildung 6.14 dargestellt sind, diskutiert. Zur besseren Erkennbarkeit wurde ein Konturplot gewählt, wobei für jedes Bild individuell der beste Darstellungsbereich und die optimale Anzahl an Intensitätsstufen im Konturplot eingestellt wurde. Dies macht zwar quantitative Aussagen nicht mehr möglich, aber für die weitere Diskussion sind nur qualitative Aussagen anhand von lateralen Signalen notwendig.

In Abbildung 6.14a befindet sich die Aufnahme an der freien Grenzfläche mit Lysozym. Die erhöhte Intensität bei $q_{\perp} = 0.02 \text{ \AA}^{-1}$ ist der so genannte *Yoneda-Wing* [121], der am kritischen Winkel auftritt. Eine leichte Erhöhung der Intensität ist im Bereich von $q_{\parallel} = 0.10 \text{ \AA}^{-1}$ zu erkennen. Dieses Signal kann einer lateralen Größe von 60 \AA zugeordnet werden. Diese Größe entspricht etwa dem Doppelten der schmalen Achse von Lysozym. Das Signal ist jedoch stark verbreitert, was auf eine weniger gut ausgeprägte laterale Ordnung hinweist. Dementsprechend scheint sich Lysozym in einer relativ los geordneten Struktur an der freien Puffer/Gas-Oberfläche anzulagern. Die GISAXS Aufnahme von unkomprimiertem DPPA auf der Lysozymbilauflösung ist in Abbildung 6.14b dargestellt. Zu sehen ist eine allgemein verstärkte diffuse Streuung, jedoch kein laterales Signal, welches auf eine langreichweitige Ordnung in einer Proteinschicht hinweist. Bei dem komprimierten DPPA-Film mit Lysozym (siehe Abb. 6.14c) ist eine breite Erhöhung der Intensität bei $q_{\parallel} \approx 0.14 \text{ \AA}^{-1}$ vorhanden. Umgerechnet in eine laterale Länge von 45 \AA entspricht dies der längeren Achse von Lysozym. Dementsprechend scheint sich Lysozym unter der Lipidschicht ebenfalls lateral anzuordnen. Dazu muss gesagt werden, dass sich der Verlauf des Signals bei mehreren Aufnahmen hintereinander verändert hat, wobei das Maximum bei etwa dem selben Wert geblieben ist. Aus bisher unbekanntem Ursachen ließen sich diese Ergebnisse im Rahmen einer zweiten Messzeit leider nicht reproduzieren.

Zum Vergleich wurde neben DPPA auch Stearinsäure als Modellmembran verwendet. Ebenso wie bei DPPA wurden GISAXS-Aufnahmen am unkomprimierten Film (siehe Abb. 6.14d) und am komprimierten Film (siehe Abb. 6.14e) aufgenommen. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von DPPA, sodass am unkomprimierten Film keine laterale Ordnung festgestellt werden konnte und am komprimierten Film eine laterale Ordnung mit einer typischen Länge von 45 \AA bestimmt wurde.

Des Weiteren wurde die laterale Ordnung von Lysozym an einer 46 mol% Cholesterol-DPPA Mischung untersucht (siehe Abb. 6.14f). Diese zeigt bei höheren q_{\perp} -Werten eine leichte Erhöhung der Intensität bei etwa $q_{\parallel} = 0.09 \text{ \AA}^{-1}$ und würde damit der lateralen Korrelationslänge von 70 \AA entsprechen, die etwas größer ist als an der freien Puffer-Grenzfläche.

Zusammenfassend lässt sich zur Untersuchung der lateralen Struktur von Proteinschichten sagen, dass es erste Hinweise gibt, dass sich Proteine wie Lysozym sowohl an der freien Grenzfläche als auch an komprimierten Lipidschichten in einer losen lateralen Struktur anlagern können. Ebenso ist dies auch bei Anwesenheit von Cholesterol mög-

lich. Diese Struktur scheint dabei nicht unbedingt eindeutig zu sein, sodass auch die Reproduzierbarkeit eingeschränkt ist.

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse der Experimente an der Flüssig/Gas-Grenzfläche damit zusammenfassen, dass sowohl die vertikale Struktur als auch erste Erkenntnisse zur lateralen Struktur von Proteinschichten an der freien Flüssig/Gas-Grenzfläche, an Lipidschichten und an Lipidschichten mit Cholesterol ermittelt werden konnten. Dabei wurde vertikal für beide untersuchten Proteine eine Anlagerung an der freien Grenzfläche beobachtet, wobei bei Lysozym auch eine laterale Struktur festgestellt werden konnte. In ersten Testmessungen von Apolipoprotein A1 an der freien Grenzfläche konnte keine laterale Struktur beobachtet werden. Die Anlagerung an der freien Grenzfläche ist durch den hydrophoben Effekt bestimmt. Bei Lysozym ist eine Adsorption an der Lipidschicht aus DPPA vorhanden. Hier besteht zwischen der Lipidschicht und dem Protein eine elektrostatische Anziehung, die die Adsorption begünstigt. Dahingegen liegt eine elektrostatische Abstoßung zwischen DPPA und Apolipoprotein A1 vor, die einer Adsorption entgegen wirkt. Bei der Anlagerung von Lysozym an Lipidschichten kann, ähnlich wie an der freien Grenzfläche, eine laterale Struktur beobachtet werden. Der Einfluss von Cholesterol scheint vor allem darin zu liegen, dass es zu einer Störung der Filmstruktur kommt. Bei Lysozym wurden auch bei der Anwesenheit von Cholesterol Anzeichen auf eine laterale Ordnung nachgewiesen. Um generell die Ergebnisse zur lateralen Ordnung von Proteinen zu unterstützen, müssen weitere Studien durchgeführt werden.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proteinadsorption an Grenzflächen untersucht. Dazu wurden oberflächensensitive Röntgenstreuungsmethoden, im Einzelnen Röntgenreflektivität und Kleinwinkelstreuung unter streifendem Einfall, verwendet. Diese Methoden ermöglichen den Zugang zur vertikalen und lateralen Struktur von Proteinschichten *in situ*, sowohl an der Fest/Flüssig-Grenzfläche als auch an der Flüssig/Gas-Grenzfläche und an Modellmembranen.

Die Reflektivitäten verschiedener Modellproteine wurden temperaturabhängig an der Grenzfläche von Silizium in einer wässrigen Lösung gemessen. Dabei wurden als wässrige Lösung sowohl Puffer als auch Proteinlösung gewählt. Es wurde festgestellt, dass die Proteine mit steigender Temperatur in Puffer desorbieren, während sie in Proteinlösung adsorbieren. Die Desorption lässt sich dabei kinetisch über die Mobilität der Proteine an der Grenzfläche erklären. Die Adsorption mit steigender Temperatur in Proteinlösung ist hingegen ein entropischer Effekt, wobei die Entropie durch Konformationsänderungen vergrößert wird. Oberhalb der Denaturierungstemperatur ist dieser Effekt durch die Entfaltung der Proteine verstärkt. Durch die Wahl der umgebenden wässrigen Lösung, reiner Puffer oder Proteinlösung, lässt sich dabei zwischen kinetischen und thermodynamischen Mechanismen unterscheiden.

Neben den so genannten harten Proteinen, die eine hohe Konformationsstabilität aufweisen, wie Lysozym oder RNase A, wurden auch weiche Proteine mit einer geringeren Konformationsstabilität, wie BSA, Fibronectin oder Apolipoprotein A1, temperaturabhängig an der Fest/Flüssig-Grenzfläche in den beiden Umgebungen untersucht. Dabei wurden ähnliche Trends wie bei den harten Proteinen, Adsorption in Proteinlösung und Desorption in Puffer, festgestellt, die jedoch deutlich schwächer ausgeprägt waren. Weichere Proteine können sich stärker an die Oberfläche anpassen, die Kontaktfläche zu ihr erhöhen und sind damit weniger mobil. Als Folge wird eine geringere Desorption in Puffer beobachtet. Die entropiegetriebene Adsorption in Proteinlösung ist bei BSA ebenfalls abgeschwächt im Vergleich zu Lysozym und RNase A, was auf eine elektrostatische Abstoßung zwischen der negativ geladenen Wafer-Oberfläche und dem negativ geladenen BSA zurückzuführen ist. Dementsprechend haben sowohl die Konformationsstabilität als auch elektrostatische Wechselwirkungen einen Einfluss auf die Proteinadsorption und -desorption.

Es ist bekannt, dass Fibronectin in zwei verschiedenen Hauptkonformationen vorkommt. In den Elektronendichteprofilen konnte zwischen diesen beiden Konformationen in der adsorbierten Schicht unterschieden werden. Temperaturabhängig konnten zwar ähnliche Trends wie bei den einfacheren Modellproteinen gefunden werden, die jedoch maßgeblich durch das Zusammenspiel der verschiedenen Konformationen überlagert werden. Apolipoprotein A1 adsorbiert auf einem hydrophoben Substrat, wobei die Ergebnisse darauf hindeuten, dass sich der nativ leicht verdrillte Ring der Struktur an der Grenzfläche verformt, um die Kontaktfläche zu maximieren. Temperaturabhängig

konnte keine Desorption und Adsorption in Puffer oder Proteinlösung festgestellt werden. Lediglich die Form des Proteins an der Grenzfläche scheint temperaturabhängig leicht zu variieren. Somit sind die Mechanismen, die bei den einfacheren Modellproteinen gefunden wurden, nur teilweise auch auf komplexere Proteine übertragbar.

In Experimenten an der Flüssig/Gas-Grenzfläche wurde die Adsorption der beiden Proteine Lysozym und Apolipoprotein A1 untersucht. An der freien Grenzfläche konnte Adsorption beider Proteine beobachtet werden. Die Adsorption kann auf hydrophobe Effekte zurückgeführt werden. Dabei scheint sich, ähnlich wie an der Fest/Flüssig-Grenzfläche, der verdrillte Ring von Apolipoprotein A1 so zu verformen, sodass die Kontaktfläche zu der hydrophoben Grenzfläche maximiert wird. Bei Lysozym bildet sich unterhalb einer adsorbierten Monolage eine weitere Anreicherung an Proteinen aus.

An der untersuchten Phospholipidschicht, DPPA, wurde nur bei Lysozym eine Adsorption beobachtet. Dabei spielen offensichtlich elektrostatische Wechselwirkungen eine Rolle. Sowohl die Kopfgruppe von DPPA als auch Apolipoprotein A1 sind bei pH 7 negativ geladen, wohingegen Lysozym positiv geladen ist. Dementsprechend führt die attraktive elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Modellmembran und Lysozym zu einer Adsorption, wohingegen die repulsive elektrostatische Wechselwirkung bei Apolipoprotein A1 die Adsorption verhindert.

Da in natürlichen Membranen neben Lipiden auch Cholesterol vorkommt, und dieses eine wichtige Rolle bei der Stabilität von Membranen spielt, wurde ebenfalls die Adsorption der beiden Proteine Lysozym und Apolipoprotein A1 an einer Mischung aus DPPA und Cholesterol untersucht. Dabei wurde für beide Proteine eine Adsorption beobachtet, wobei sich das Apolipoprotein A1 insbesondere in die Lipidschicht einlagert. Ob sich Proteine an Grenzflächen lateral anordnen, ist bisher nicht systematisch untersucht worden. Dazu wurden in dieser Arbeit Experimente mit Kleinwinkelstreuung unter streifendem Einfall an der Flüssig/Gas-Grenzfläche durchgeführt. Bei Apolipoprotein A1 konnte bisher kein Hinweis auf eine laterale Anordnung gefunden werden. Bei Lysozym wurden in dieser Arbeit jedoch erste Hinweise darauf gefunden, dass es eine schwache laterale Anordnung der Proteine sowohl an der freien Flüssig/Gas-Grenzfläche als auch an Modellmembranen (DPPA und Stearinsäure) gibt.

Ausblick

In weiteren Studien zu Proteinen an Grenzflächen ist es im Hinblick auf die Anwendung von Proteinadsorption an Implantatoberflächen interessant, Substrate zu verwenden, die den Implantaten ähnlicher sind. Viele Implantate bestehen aus Titan mit einer Titandioxid-Oberfläche. Damit sind sie chemisch gesehen ähnlich wie Silizium mit einer Siliziumdioxidschicht. Ein Problem bei der Untersuchung mit Röntgenstreuungsmethoden ist dabei die Porosität der natürlichen Implantatoberflächen. Um dennoch

Experimente an Titandioxid-Oberflächen durchführen zu können, werden glatte Oberflächen benötigt. In ersten Versuchen mit Titandioxid-Einkristallen haben sich diese als zu gekrümmt herausgestellt. Eine andere Möglichkeit besteht in der Beschichtung von Silizium-Wafern mit Titandioxid mittels Spincoating. Auch dazu wurden bereits erste Messungen durchgeführt. Die optimalen Parameter für eine glatte Oberfläche und die optimale Dicke müssen dabei noch gefunden werden.

Des Weiteren gab es bereits in Kooperation mit der physikalischen Chemie der Uni Siegen (Prof. Schönherr) Versuche, schaltbare Oberflächen für die Proteinadsorption herzustellen und zu untersuchen [122–124]. Dabei wurden Polymerbürsten auf eine Goldschicht aufgebracht, die temperaturabhängig schwellen und kollabieren. Röntgenreflektivitätsmessungen an diesem System geben mehr Aufschlüsse über die vertikale Elektronendichteverteilung. Kombiniert mit den Erkenntnissen zur Adsorption und Desorption, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, ließe sich so gegebenenfalls Proteinadsorption an der Fest/Flüssig-Grenzfläche temperaturabhängig steuern.

Zur Überprüfung, ob sich die bereits untersuchten Mechanismen auch auf komplexere Proteine anwenden lassen, bietet es sich an, neben den häufig als Modell untersuchten Proteinen auch komplexere Proteine zu untersuchen. Dabei wäre es interessant, wie sich der Einfluss von verschiedenen Strukturen auf das Adsorptionsverhalten auswirkt, und ob die Proteine bei der Adsorption z.B. durch Verformung ihre Funktionalität verlieren.

Ein weiterer Punkt sind zeitabhängige Phänomene. So wurde bei der Proteinadsorption in Proteinelösung oberhalb der Denaturierungstemperatur kein Gleichgewicht erreicht, sodass sich die Schichtdicke während der Messung weiterhin verändert hat. Es wäre sinnvoll, bei der Auswertung von Reflektivitäten diese Zeitabhängigkeit mit berücksichtigen zu können. Dazu müsste in der Auswertungssoftware die zeitabhängige Veränderung implementiert werden.

Die Frage, ob sich Proteine lateral an der Flüssig/Gas-Grenzfläche anordnen, könnte weiter systematisch ergründet werden. Für diese Untersuchung wird jedoch ein spezieller experimenteller Aufbau benötigt, der nur an wenigen Synchrotronstrahlungsquellen zur Verfügung steht. Der in dieser Arbeit verwendete Aufbau an der Beamline BW1 existiert nicht mehr. Andere Synchrotronstrahlungsquellen, wie Petra III in Hamburg oder Diamond in England, haben zwar ähnliche Aufbauten, jedoch ist hier der Photonenfluss so hoch, dass mit Strahlenschäden an den Proteinen gerechnet werden muss.

Da im Bereich der Proteinadsorption an Flüssig/Gas-Grenzflächen bei Apolipoprotein A1 an der negativ geladenen Modellmembran aufgrund der elektrostatischen Abstoßung keine Adsorption beobachtet werden konnte, könnte die Adsorption von Proteinen an Membranen auch an ungeladenen oder positiv geladenen Lipiden untersucht werden. Erste Versuche wurden dabei bereits in der Diplomarbeit von Herrn Kampmann durchgeführt, wobei sich die Präparation der Modellmembran mit positiv geladenen Lipiden bisher noch als schwierig erweist [119]. Eine andere Möglichkeit ist die Veränderung der Ladung durch den pH-Wert. Der Einfluss von Cholesterol auf die Proteinadsorpti-

on könnte ebenfalls detaillierter untersucht werden, wobei bereits weitere Experimente mit Cholesterol in Planung sind.

A Anhang

A.1 Werte aus den Volumenbruchprofilen der temperaturabhängigen Messungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche

| T [°C] | d [Å] | Θ [%] | Γ mg/m ² |
|----------|---------|--------------|----------------------------|
| 30 | 33 | 50 | 2.6 |
| 55 | 30 | 43 | 2.0 |
| 65 | 30 | 41 | 2.1 |
| 75 | 31 | 40 | 1.8 |
| 84 | 30 | 35 | 1.5 |
| 84 | 28 | 34 | 1.4 |

(a) Lysozym Puffer

| T [°C] | d [Å] | Θ [%] | Γ mg/m ² |
|----------|---------|--------------|----------------------------|
| 25 | 44 | 46 | 3.3 |
| 50 | 62 | 46 | 4.3 |
| 68 | 81 | 40 | 5.0 |
| 80 | 179 | 41 | 11.4 |
| 80 | 309 | 41 | 19.4 |

(b) Lysozym Proteinlösung

| T [°C] | d [Å] | Θ [%] | Γ mg/m ² |
|----------|---------|--------------|----------------------------|
| 30 | 26 | 31 | 1.3 |
| 49 | 25 | 27 | 1.1 |
| 61 | 25 | 25 | 1.0 |
| 70 | 25 | 22 | 0.9 |
| 80 | 27 | 19 | 0.8 |

(c) RNase A Puffer

| T [°C] | d [Å] | Θ [%] | Γ mg/m ² |
|----------|---------|--------------|----------------------------|
| 23 | 32 | 32 | 1.6 |
| 40 | 39 | 34 | 2.0 |
| 70 | 44 | 32 | 2.2 |
| 80 | 56 | 24 | 2.5 |
| 80 | 70 | 23 | 3.0 |
| 90 | 77 | 23 | 3.3 |

(d) RNase A Proteinlösung

| T [°C] | d [Å] | Θ [%] | Γ mg/m ² |
|----------|---------|--------------|----------------------------|
| 21 | 34 | 65 | 0.8 |
| 30 | 37 | 64 | 0.8 |
| 30 | 39 | 63 | 0.8 |
| 40 | 43 | 58 | 0.8 |
| 60 | 39 | 57 | 0.7 |
| 69 | 38 | 58 | 0.7 |
| 79 | 37 | 58 | 0.7 |

(e) BSA Puffer

| T [°C] | d [Å] | Θ [%] | Γ mg/m ² |
|----------|---------|--------------|----------------------------|
| 30 | 28 | 49 | 0.5 |
| 40 | 29 | 50 | 0.5 |
| 60 | 34 | 57 | 0.6 |
| 69 | 40 | 59 | 0.8 |
| 80 | 39 | 60 | 0.7 |
| 80 | 44 | 58 | 0.8 |

(f) BSA Proteinlösung

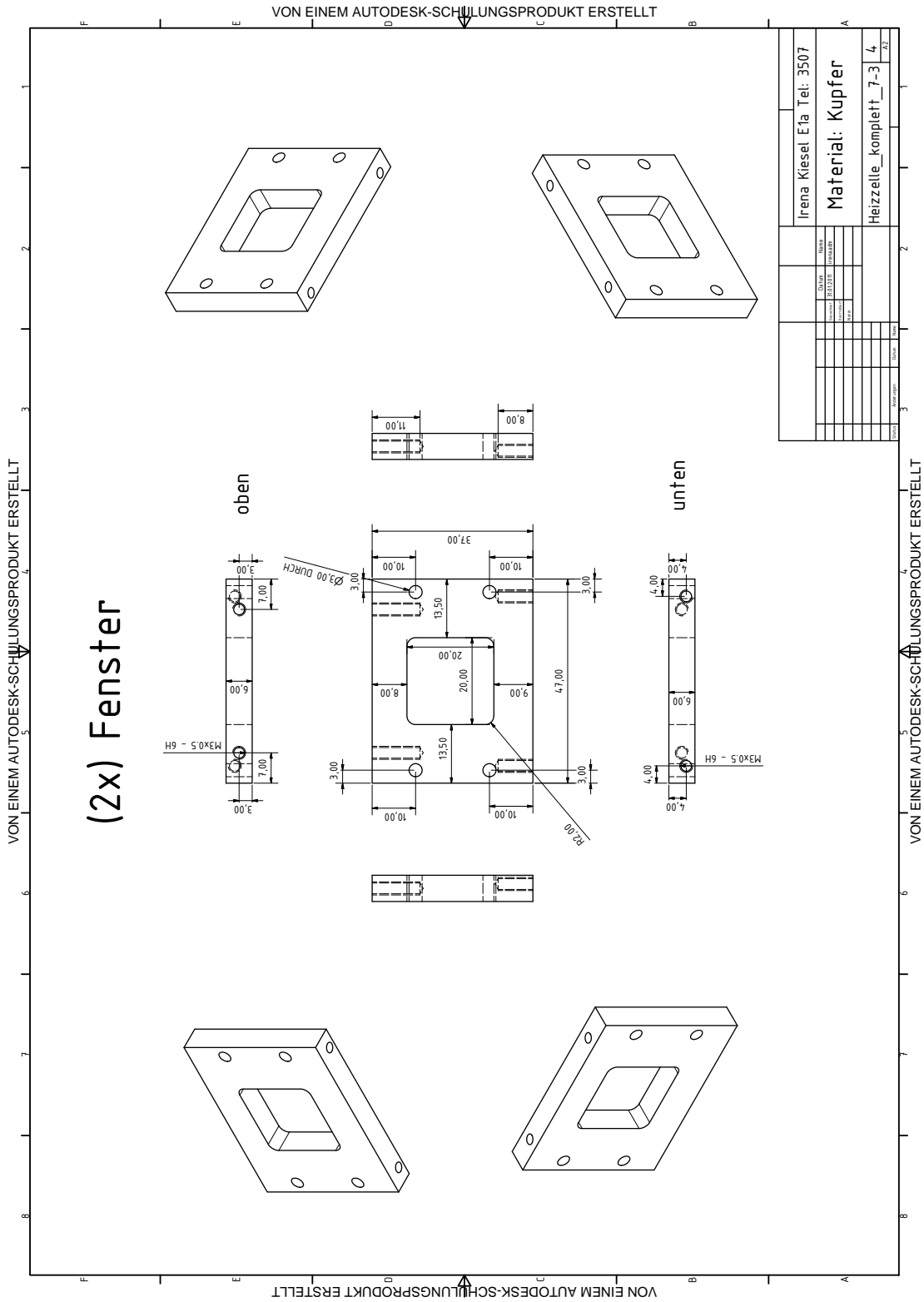
| T [°C] | Γ mg/m ² |
|----------|----------------------------|
| 25 | 11.3 |
| 40 | 8.4 |
| 60 | 9.2 |
| 60 | 8.4 |
| 70 | 9.3 |
| 70 | 1.1 |
| 80 | 1.3 |
| 80 | 1.1 |
| 25 | 1.0 |

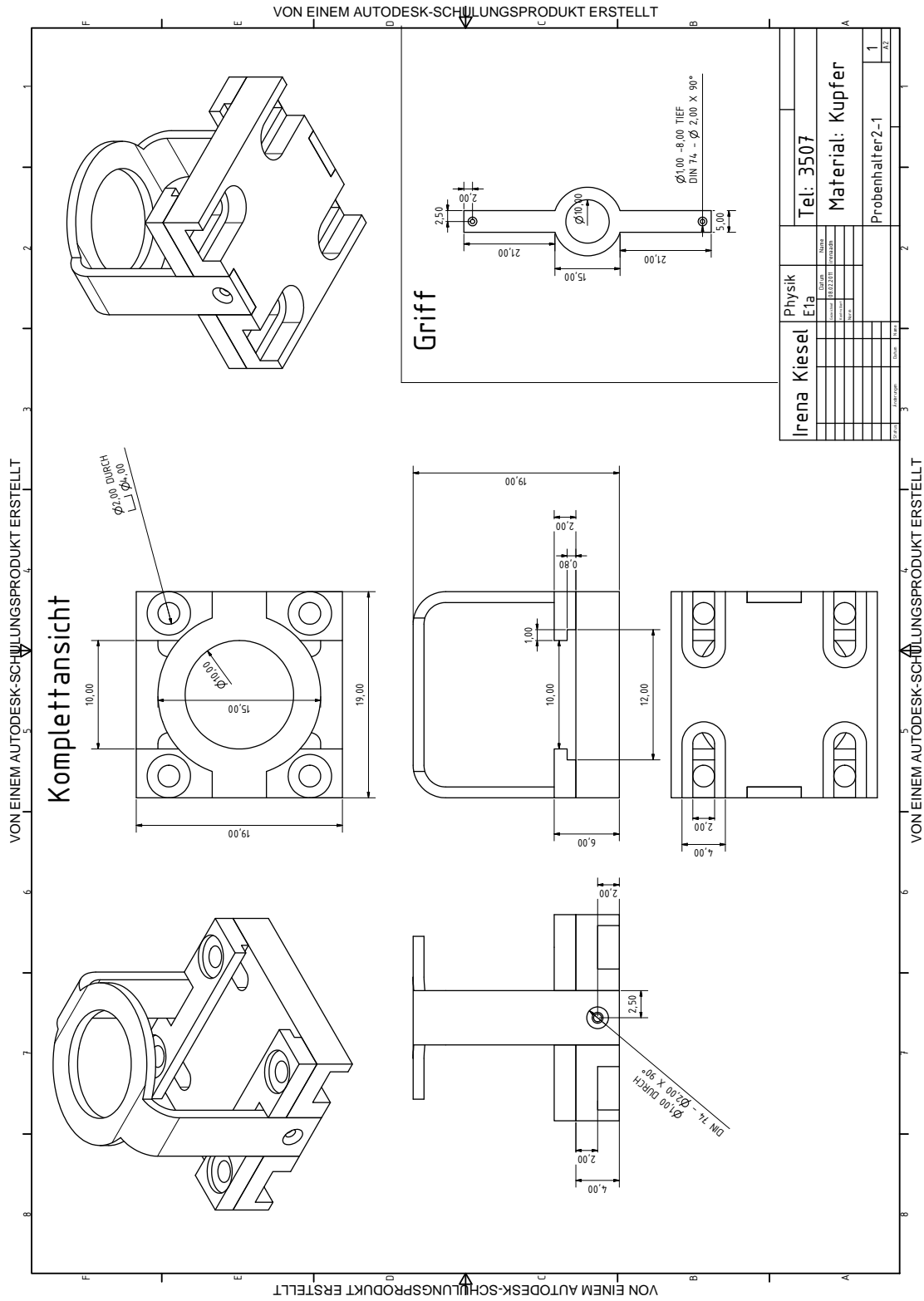
(g) Fibronectin Puffer

| T [°C] | Γ mg/m ² |
|----------|----------------------------|
| 25 | 12.7 |
| 40 | 12.5 |
| 60 | 15.8 |
| 70 | 18.9 |
| 70 | 18.0 |
| 80 | 12.7 |
| 80 | 14.2 |
| 25 | 14.6 |

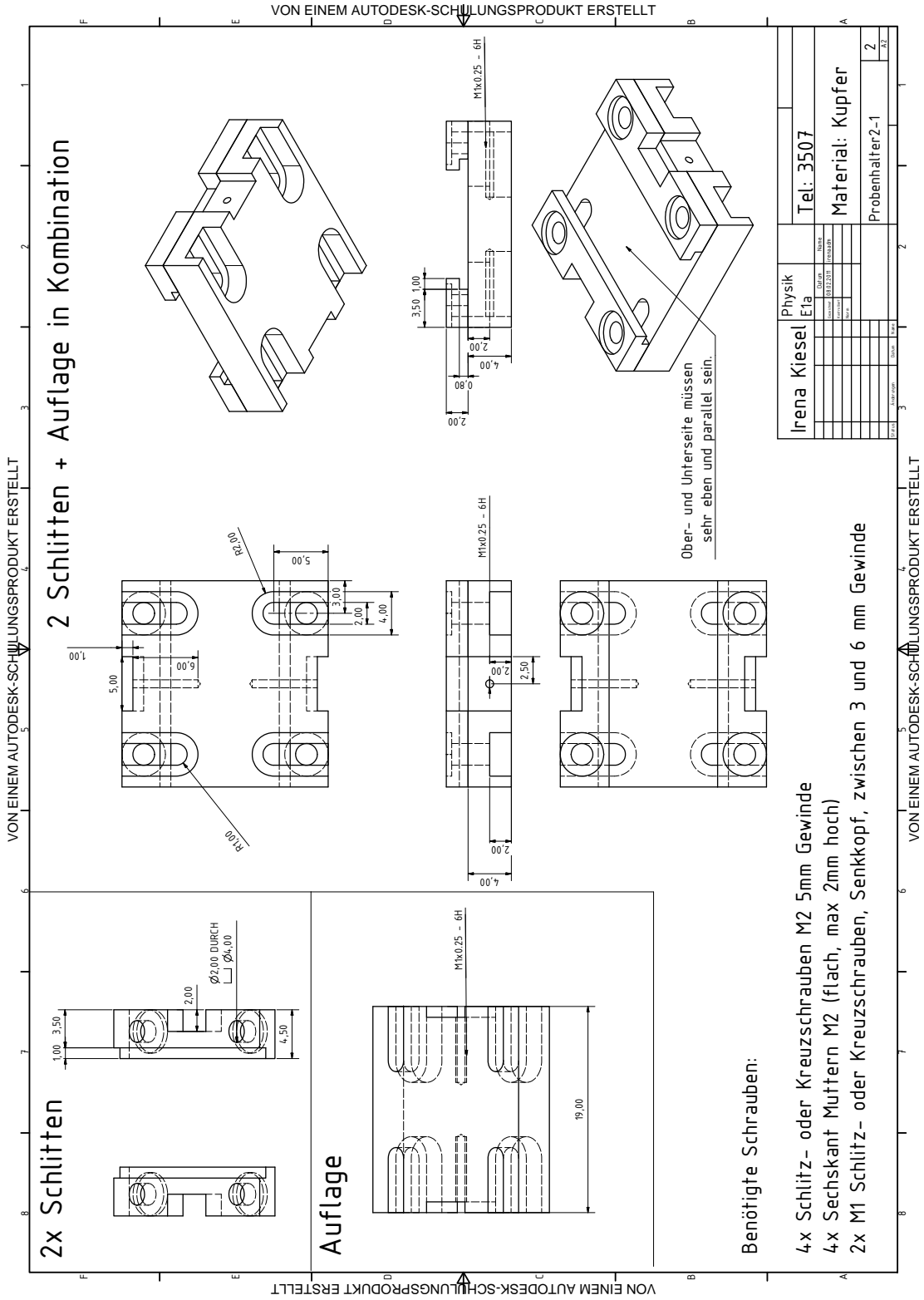
(h) Fibronectin Proteinlösung

Tabelle A1: Werte aus den Volumenbruchprofilen der temperaturabhängigen Messungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche in Puffer und Proteinlösung mit Silizium als Substrat. Die abgeschätzten Fehler aus wiederholten Messungen betragen $\Delta d = \pm 1$ Å, $\Delta \Theta = \pm 1\%$ und $\Delta \Gamma = \pm 0.1$ mg/m².





| | | | |
|------------------|--|------------------|--|
| Irena Kiesel | | Physik | |
| Ela | | Ela | |
| Tel: 3507 | | Material: Kupfer | |
| Probenthaler 2-1 | | 1 | |



Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|--|----|
| 2.1 | Aminosäuren und Peptidbindungen | 6 |
| 2.2 | Übersicht über die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren. | 6 |
| 2.3 | Die Sekundärstruktur beinhaltet typische Strukturen wie die α -Helix und das β -Faltblatt | 7 |
| 2.4 | Proteinadsorption nach dem Zwei-Zustands Modell | 10 |
| 2.5 | Vereinfachter Aufbau einer Zellmembran | 12 |
| 2.6 | Oberflächendruck einer Monolage Lipid | 13 |
| 2.7 | Phasenübergänge für Lipidmonolagen in Abhängigkeit des Oberflächen- druckes und der Fläche pro Molekül. | 14 |
| 2.8 | Streugeometrie für Reflektivitäten (XRR) und Kleinwinkelstreuung un- ter streifendem Einfall (GISAXS) | 15 |
| 2.9 | Reflektierte und transmittierte Welle | 17 |
| 2.10 | Fresnelreflektivität | 19 |
| 2.11 | Reflexion und Transmission an Schichten nach dem Parratt-Algorithmus | 20 |
| 2.12 | Reflektivität für ein Schichtsystem mit einer Schicht und ideal glatten Grenzflächen mit dem dazugehörigen Elektronendichteprofil. | 20 |
| 2.13 | Rauigkeit einer Grenzfläche | 21 |
| 2.14 | Effektives Dichtemodell | 22 |
| 3.1 | Schema zur Dortmunder Elektronenspeicherringanlage (DELTA) | 25 |
| 3.2 | Aufbau der Strahllinie BL9 | 26 |
| 3.3 | Streuquerschnitte in Abhängigkeit der Energie | 26 |
| 3.4 | Aufbau der Beamline BW1 mit der Strahloptik | 27 |
| 3.5 | Skizze des verwendeten Langmuirtrogs | 28 |
| 3.6 | Foto der heizbaren Probenzelle im Diffraktometer | 29 |
| 4.1 | Lysozym | 31 |
| 4.2 | Ribonuklease A | 31 |
| 4.3 | Rinderserum-Albumin | 32 |
| 4.4 | Apolipoprotein A1 | 33 |
| 4.5 | Struktur der beiden verwendeten Amphiphile | 36 |
| 4.6 | Cholesterol | 36 |
| 6.1 | Beispiel für die Darstellung der Reflektivität an einer Lysozimschicht auf Silizium in Puffer bei 55 °C | 42 |
| 6.2 | Elektronendichteprofil und Volumenbruchprofil von Lysozym auf Silizi- um in Puffer bei 55 °C. | 44 |
| 6.3 | Fresnel-normierte Reflektivitäten der Proteinschichten auf Silizium bei verschiedenen Temperaturen in Puffer und in Proteinlösung | 48 |
| 6.4 | Temperaturabhängige Volumenbruchprofile von Proteinschichten auf Si- lizium in Puffer und in Proteinlösung. | 49 |

| | | |
|------|--|----|
| 6.5 | Schichtdicke d und Bedeckungsgrad Θ von Proteinen auf Silizium in Puffer und in Proteinlösung in Abhängigkeit der Temperatur T | 51 |
| 6.6 | Adsorbierte Menge Γ von Proteinen auf Silizium in Puffer und in Proteinlösung in Abhängigkeit der Temperatur T | 54 |
| 6.7 | Untersuchung zur zeitabhängigen Desorption von Lysozym auf Silizium in Puffer | 55 |
| 6.8 | Modell zur Temperatur-induzierten Adsorption und Desorption in Puffer und Proteinlösung von verschiedenen Proteinen. | 56 |
| 6.9 | Fresnel-normierte Reflektivität der mit OTS beschichtete Siliziumwafer und die zugehörigen Elektronendichteprofile. | 57 |
| 6.10 | Temperaturabhängige Fresnel-normierte Reflektivitäten von Apolipoprotein A1 Schichten auf hydrophoben Si/OTS-Wafern in Puffer und Proteinlösung. | 59 |
| 6.11 | Elektronendichteprofile von Apolipoprotein A1 auf Siliziumwafern, die mit OTS hydrophobiert wurden, in Puffer und in Proteinlösung. | 59 |
| 6.12 | Fresnel-normierte Reflektivitäten von Apolipoprotein A1 auf Silizium. | 60 |
| 6.13 | Fresnel-normierte Reflektivitäten und Elektronendichteprofile an der Flüssig/Gas-Grenzfläche. | 63 |
| 6.14 | GISAXS-Aufnahmen von Lysozym an der Flüssig/Gas-Grenzfläche und an Modellmembranen. | 66 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 4.1 | Zusammenfassung einiger wichtiger Parameter der untersuchten Proteine | 35 |
| 5.1 | Oberflächendrücke Π bei den gemessenen Reflektivitäten | 40 |
| A1 | Werte aus den Volumenbruchprofilen der temperaturabhängigen Messungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche in Puffer und Proteinlösung. | 73 |

Literatur

- [1] B. Kasemo (2002) *Biological surface science*. Surf. Sci., 500(1-3), pp. 656–677. doi:10.1016/S0039-6028(01)01809-X
- [2] W. Norde (2008) *My voyage of discovery to proteins in flatland ... and beyond*. Colloids Surf., B, 61(1), pp. 1–9. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.09.029. WOS:000252584300001
- [3] W. Norde (1996) *Driving forces for protein adsorption at solid surfaces*. Macromolecular Symposia, 103(1), . 5–18. doi:10.1002/masy.19961030104
- [4] W. Norde und J. Lyklema (2012) *Interfacial behaviour of proteins, with special reference to immunoglobulins. A physicochemical study*. Advances in Colloid and Interface Science, 179-182, pp. 5–13. doi:10.1016/j.cis.2012.06.011
- [5] A. Baszkin, W. Norde, J. R. Lu, und R. K. Thomas (1999) *Physical Chemistry of Biological Interfaces*. p. 609-650. Marcel Dekker Inc
- [6] C. Czeslik (2004) *Factors Ruling Protein Adsorption*. Zeitschrift für Physikalische Chemie, 218(7-2004), pp. 771–801. doi:10.1524/zpch.218.7.771.35722
- [7] M. Tirrell, E. Kokkoli, und M. Biesalski (2002) *The role of surface science in bioengineered materials*. Surface Science, 500(1-3), pp. 61–83. doi:10.1016/S0039-6028(01)01548-5
- [8] C. Czeslik (2006) *Proteinadsorption an festen Grenzflächen. Erwünscht und unerwünscht*. Chem. Unserer Zeit, 40(4), pp. 238–245. doi:10.1002/ciuz.200600352
- [9] P. S. Stewart und J. W. Costerton (2001) *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*. Lancet, 358(9276), pp. 135–138. PMID: 11463434
- [10] T. Mattila-Sandholm und G. Wirtanen (1992) *Biofilm formation in the industry: A review*. Food Reviews International, 8(4), pp. 573–603. doi:10.1080/87559129209540953
- [11] L. D. Chambers, K. R. Stokes, F. C. Walsh, und R. J. K. Wood (2006) *Modern approaches to marine antifouling coatings*. Surface and Coatings Technology, 201(6), pp. 3642–3652. doi:10.1016/j.surfcoat.2006.08.129
- [12] J. H. H. Bongaerts, D. Rossetti, und J. R. Stokes (2007) *The Lubricating Properties of Human Whole Saliva*. Tribol Lett, 27(3), pp. 277–287. doi:10.1007/s11249-007-9232-y
- [13] K. J. Siebert und P. Y. Lynn (1997) *Mechanisms of beer colloidal stabilization*. American Society of Brewing Chemists (USA)

- [14] E. Dickinson (1999) *Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15(2), pp. 161–176. doi:10.1016/S0927-7765(99)00042-9
- [15] S. D. Conner und S. L. Schmid (2003) *Regulated portals of entry into the cell*. *Nature*, 422(6927), pp. 37–44
- [16] D. S. Fredrickson, R. I. Levy, und R. S. Lees (1967) *Fat Transport in Lipoproteins — An Integrated Approach to Mechanisms and Disorders*. *New England Journal of Medicine*, 276(5), pp. 273–281. doi:10.1056/NEJM196702022760507
- [17] I. S. Wood und P. Trayhurn (2003) *Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins*. *British Journal of Nutrition*, 89(01), pp. 3–9. doi:10.1079/BJN2002763
- [18] S. Tiemeyer, M. Paulus, und M. Tolan (2010) *Effect of Surface Charge Distribution on the Adsorption Orientation of Proteins to Lipid Monolayers*. *Langmuir*, 26(17), pp. 14064–14067. doi:10.1021/la102616h
- [19] J. A. Ibdah und M. C. Phillips (1988) *Effects of lipid composition and packing on the adsorption of apolipoprotein A-I to lipid monolayers*. *Biochemistry*, 27(18), pp. 7155–7162. doi:10.1021/bi00418a073
- [20] J. Killian und G. von Heijne (2000) *How proteins adapt to a membrane–water interface*. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(9), pp. 429–434. doi:10.1016/S0968-0004(00)01626-1
- [21] M.-F. Lecompte, A.-C. Bras, N. Dousset, I. Portas, R. Salvayre, und M. Ayrault-Jarrier (1998) *Binding Steps of Apolipoprotein A-I with Phospholipid Monolayers: Adsorption and Penetration*. *Biochemistry*, 37(46), pp. 16165–16171. doi:10.1021/bi9813072
- [22] H. Moehwald (1990) *Phospholipid and Phospholipid-Protein Monolayers at the Air/Water Interface*. *Annual Review of Physical Chemistry*, 41, pp. 441–476. doi:10.1146/annurev.pc.41.100190.002301
- [23] M. Rabe, D. Verdes, und S. Seeger (2011) *Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces*. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 162(1-2), pp. 87–106. doi:10.1016/j.cis.2010.12.007. PMID: 21295764
- [24] F. Evers, K. Shokuie, M. Paulus, C. Sternemann, C. Czeslik, und M. Tolan (2008) *Exploring the interfacial structure of protein adsorbates and the kinetics of protein adsorption: an in situ high-energy X-ray reflectivity study*. *Langmuir*, 24(18), pp. 10216–10221. doi:10.1021/la801642s. PMID: 18715021

- [25] R. Tilton, A. Gast, und C. Robertson (1990) *Surface diffusion of interacting proteins. Effect of concentration on the lateral mobility of adsorbed bovine serum albumin*. Biophys. J., 58(5), pp. 1321–1326. doi:10.1016/S0006-3495(90)82473-5
- [26] J. Lu, T. Su, P. Thirtle, R. Thomas, A. Rennie, und R. Cubitt (1998) *The Denaturation of Lysozyme Layers Adsorbed at the Hydrophobic Solid/Liquid Surface Studied by Neutron Reflection*. J. Colloid Interface Sci., 206(1), pp. 212–223. doi:10.1006/jcis.1998.5680
- [27] Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, Y. Terada, und H. Yamada (2011) *Protein Salting Out Observed at an Air-Water Interface*. J. Phys. Chem. Lett., 2(9), pp. 995–999. doi:10.1021/jz200111q
- [28] F. Höök, M. Rodahl, B. Kasemo, und P. Brzezinski (1998) *Structural changes in hemoglobin during adsorption to solid surfaces: Effects of pH, ionic strength, and ligand binding*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95(21), pp. 12 271–12 276. doi:10.1073/pnas.95.21.12271. PMID: 9770476
- [29] C. Postel, O. Abillon, und B. Desbat (2003) *Structure and denaturation of adsorbed lysozyme at the air-water interface*. J. Colloid Interface Sci., 266(1), pp. 74–81. doi:10.1016/S0021-9797(03)00571-X
- [30] A. K. Hüsecken, F. Evers, C. Czeslik, und M. Tolan (2010) *Effect of Urea and Glycerol on the Adsorption of Ribonuclease A at the Air-Water Interface*. Langmuir, 26(16), pp. 13 429–13 435. doi:10.1021/la102222z
- [31] F. J. Wirkert, M. Paulus, J. Nase, J. Möller, S. Kujawski, C. Sternemann, und M. Tolan (2013) *X-ray reflectivity measurements of liquid/solid interfaces under high hydrostatic pressure conditions*. J. Synchrotron Radiat., . accepted
- [32] C. Czeslik und R. Winter (2000) *Effect of temperature on the conformation of lysozyme adsorbed to silica particles*. Phys. Chem. Chem. Phys., 3(2), pp. 235–239. doi:10.1039/B005900P
- [33] G. Jackler, R. Steitz, und C. Czeslik (2002) *Effect of Temperature on the Adsorption of Lysozyme at the Silica/Water Interface Studied by Optical and Neutron Reflectometry*. Langmuir, 18(17), pp. 6565–6570. doi:10.1021/la025605i
- [34] H. Hähl, F. Evers, S. Grandthyll, M. Paulus, C. Sternemann, P. Loskill, M. Lessel, A. K. Hüsecken, T. Brenner, M. Tolan, und K. Jacobs (2012) *Subsurface influence on the structure of protein adsorbates revealed by in situ X-ray reflectivity*. Langmuir. doi:10.1021/la300850g
- [35] M. Schroer, J. Markgraf, D. Wieland, C. Sahle, J. Möller, M. Paulus, M. Tolan, und R. Winter (2011) *Nonlinear Pressure Dependence of the Interaction Potential*

- of Dense Protein Solutions*. Phys. Rev. Lett., 106(17). doi:10.1103/PhysRevLett.106.178102
- [36] F. Höök (2002) *A comparative study of protein adsorption on titanium oxide surfaces using in situ ellipsometry, optical waveguide lightmode spectroscopy, and quartz crystal microbalance/dissipation*. Colloids Surf., B, 24(2), pp. 155–170. doi:10.1016/S0927-7765(01)00236-3
- [37] I. Svendsen, L. Lindh, und T. Arnebrant (2006) *Adsorption behaviour and surfactant elution of cationic salivary proteins at solid/liquid interfaces, studied by in situ ellipsometry*. Colloids Surf., B, 53(2), pp. 157–166. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.08.016
- [38] M. Bellion, L. Santen, H. Mantz, H. Hähl, A. Quinn, A. Nagel, C. Gilow, C. Weitenberg, Y. Schmitt, und K. Jacobs (2008) *Protein adsorption on tailored substrates: long-range forces and conformational changes*. J. Phys.: Condens. Matter, 20(40), . 404 226. doi:10.1088/0953-8984/20/40/404226
- [39] Y.-W. Huang und V. K. Gupta (2004) *A SPR and AFM study of the effect of surface heterogeneity on adsorption of proteins*. J. Chem. Phys., 121(5), pp. 2264–2271. doi:doi:10.1063/1.1768155
- [40] M. Lehnert, M. Gorbahn, C. Rosin, M. Klein, I. Koeper, B. Al-Nawas, W. Knoll, und M. Veith (2011) *Adsorption and Conformation Behavior of Biotinylated Fibronectin on Streptavidin-Modified TiOX Surfaces Studied by SPR and AFM*. Langmuir, 27(12), pp. 7743–7751. doi:10.1021/la200908h
- [41] C. A. Siedlecki und R. E. Marchant (1998) *Atomic force microscopy for characterization of the biomaterial interface*. Biomaterials, 19(4–5), pp. 441–454. doi:10.1016/S0142-9612(97)00222-6
- [42] K. Xu, M. Ouberaï, und M. Welland (2013) *A comprehensive study of lysozyme adsorption using dual polarization interferometry and quartz crystal microbalance with dissipation*. Biomaterials, 34(5), pp. 1461–1470. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.078
- [43] M. Al-Jawad, G. Fragneto, J. Liu, S. R. Chang, und B. Clarkson (2009) *Fibronectin adsorption studied using neutron reflectometry and complementary techniques*. Eur. Phys. J. E, 30(2), pp. 175–179. doi:10.1140/epje/i2009-10472-0
- [44] J. A. Ibdah, K. E. Krebs, und M. C. Phillips (1989) *The surface properties of apolipoproteins A-I and A-II at the lipid/water interface*. Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab, 1004(3), pp. 300–308. doi:10.1016/0005-2760(89)90077-5
- [45] D. J. Fink, T. B. Hutson, K. K. Chittur, und R. M. Gendreau (1987) *Quantitative surface studies of protein adsorption by infrared spectroscopy. II. Quantification*

- of adsorbed and bulk proteins.* Anal. Biochem., 165(1), pp. 147–154. PMID: 3688429
- [46] J. Als-Nielsen, D. Jacquemain, K. Kjaer, F. Leveiller, M. Lahav, und L. Leiserowitz (1994) *Principles and applications of grazing incidence X-ray and neutron scattering from ordered molecular monolayers at the air-water interface.* Physics Reports, 246(5), pp. 251–313. doi:10.1016/0370-1573(94)90046-9
- [47] F. Evers (2010) *Proteins at interfaces - Protein adsorption studied by X-ray and neutron reflectometry.* Dissertation, TU Dortmund, Dortmund
- [48] J. R. Lu, X. Zhao, und M. Yaseen (2007) *Protein adsorption studied by neutron reflection.* Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 12(1), pp. 9–16. doi:10.1016/j.cocis.2007.02.001
- [49] C. E. Miller, J. Majewski, T. Gog, und T. L. Kuhl (2005) *Characterization of Biological Thin Films at the Solid-Liquid Interface by X-Ray Reflectivity.* Phys. Rev. Lett., 94(23), . 238 104. doi:10.1103/PhysRevLett.94.238104
- [50] A. G. Richter und I. Kuzmenko (2013) *Using in Situ X-ray Reflectivity to Study Protein Adsorption on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces: Benefits and Limitations.* Langmuir, 29(17), pp. 5167–5180. doi:10.1021/la3049532
- [51] N. Willem (1986) *Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface.* Advances in Colloid and Interface Science, 25, pp. 267–340. doi: 10.1016/0001-8686(86)80012-4
- [52] (2014). *Aminosäuren.* URL <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Aminos%C3%A4uren&oldid=128176087>. Page Version ID: 128176087
- [53] S. M. Carr (2014). URL http://www.mun.ca/biology/scarr/MGA2_03-18b.html
- [54] J. M. Berg, L. Stryer, und J. L. Tymoczko (2003) *Biochemie.* Spektrum Akad. Verl, Heidelberg Berlin
- [55] D. J. Voet, J. G. Voet, und C. W. Pratt (2002) *Lehrbuch der Biochemie.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2. Edt.
- [56] M. Malmsten (1998) *Formation of Adsorbed Protein Layers.* J. Colloid Interface Sci., 207(2), pp. 186–199. doi:10.1006/jcis.1998.5763
- [57] J. L. Brash (1987) *Proteins at Interfaces: Physicochemical and Biochemical Studies.* American Chemical Society
- [58] D. Chandler (2005) *Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly.* Nature, 437(7059), pp. 640–647. doi:10.1038/nature04162

- [59] S. Raffy und J. Teissié (1999) *Control of Lipid Membrane Stability by Cholesterol Content*. Biophysical Journal, 76(4), pp. 2072–2080. doi:10.1016/S0006-3495(99)77363-7. PMID: 10096902
- [60] (2014). *Cell membrane*. URL http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cell_membrane&oldid=593124225. Page Version ID: 593124225
- [61] D. Marsh (1996) *Lateral pressure in membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes, 1286(3), pp. 183–223. doi:10.1016/S0304-4157(96)00009-3
- [62] V. M. Kaganer, H. Möhwald, und P. Dutta (1999) *Structure and phase transitions in Langmuir monolayers*. Rev. Mod. Phys., 71(3), pp. 779–819. doi:10.1103/RevModPhys.71.779
- [63] L. Wilhelmly (1863) *Annalen der Physik*, Bnd. 119 von 6. Joh. Ambr. Barth (Leipzig). URL <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/cb34462944f/date>
- [64] A. Meyer (2014). *GISAXS.DE*. URL <http://www.gisaxs.de>
- [65] M. Tolan (1998) *X-Ray Scattering from Soft-Matter Thin Films: Materials Science and Basic Research*. Springer, 1. Edt.
- [66] L. G. Parratt (1954) *Surface Studies of Solids by Total Reflection of X-Rays*. Phys. Rev., 95(2), pp. 359–369. doi:10.1103/PhysRev.95.359
- [67] H. Kiessig (1931) *Untersuchungen zur Totalreflexion von Röntgenstrahlen*. Annalen der Physik, 402(6), . 715–768. doi:10.1002/andp.19314020607
- [68] S. K. Sinha, E. B. Sirota, S. Garoff, und H. B. Stanley (1988) *X-ray and neutron scattering from rough surfaces*. Phys. Rev. B, 38(4), pp. 2297–2311. doi:10.1103/PhysRevB.38.2297
- [69] R. Lazzari (2014). *IsGISAXS - Version 2.6*. URL <http://ln-www.insp.upmc.fr/axe4/0xydes/IsGISAXS/figures/doc/manual.html>
- [70] D.-M. Smilgies (2014). *GISAXS*. URL <http://staff.chess.cornell.edu/~smilgies/gisaxs/GISAXS.php>
- [71] (2014). *TU Dortmund - Delta - Beschleuniger*. URL <http://www.delta.tu-dortmund.de/cms/de/Beschleuniger/index.html>
- [72] M. Tolan, T. Weis, C. Westphal, und K. Wille (2003) *DELTA: Synchrotron light in nordrhein-westfalen*. Synchrotron Radiation News, 16(2), pp. 9–11. doi:10.1080/08940880308603005

- [73] M. Paulus, R. Fendt, C. Sternemann, C. Gutt, H. Hövel, M. Volmer, M. Tolan, und K. Wille (2005) *An internet-based synchrotron experiment for students measuring the X-ray magnetic circular dichroism of a PtFe alloy*. Journal of Synchrotron Radiation, 12(2), pp. 246–250. doi:10.1107/S0909049504030742
- [74] M. Paulus, D. Lietz, C. Sternemann, K. Shokuie, F. Evers, M. Tolan, C. Czeslik, und R. Winter (2008) *An access to buried interfaces: the X-ray reflectivity set-up of BL9 at DELTA*. J. Synchrotron Radiat., 15(6), pp. 600–605. doi:10.1107/S0909049508026745
- [75] C. Krywka, M. Paulus, C. Sternemann, M. Volmer, A. Remhof, G. Nowak, A. Nefedov, B. Pöter, M. Spiegel, und M. Tolan (2005) *The new diffractometer for surface X-ray diffraction at beamline BL9 of DELTA*. Journal of Synchrotron Radiation, 13(1), pp. 8–13. doi:10.1107/S0909049505035685
- [76] C. Reich, M. B. Hochrein, B. Krause, und B. Nickel (2005) *A microfluidic setup for studies of solid-liquid interfaces using x-ray reflectivity and fluorescence microscopy*. Rev. Sci. Instrum., 76(9), . 095 103
- [77] R. Frahm, J. Weigelt, G. Meyer, und G. Materlik (1995) *X-ray undulator beamline BW1 at DORIS III*. Review of Scientific Instruments, 66(2), pp. 1677–1680. doi: 10.1063/1.1146466
- [78] D. C. F. Wieland (2012) *Formation of organic and inorganic thin films at the aqueous solution-gas interface*. Dissertation, TU Dortmund
- [79] H. Stöcker (2004) *Taschenbuch der Physik: Formeln, Tabellen, Übersichten*. Deutsch, Thun; Frankfurt am Main, 5. Edt.
- [80] R. Diamond (1975) *Real-space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme*. J.Mol.Biol., 82, pp. 371–391. doi:10.1016/0022-2836(74)90598-1. PMID: 4856347
- [81] P. G. Righetti, G. Tudor, und K. Ek (1981) *Isoelectric points and molecular weights of proteins : A new table*. J. Chromatogr., A, 220(2), pp. 115–194. doi: 10.1016/S0021-9673(00)88456-3
- [82] J. F. Back, D. Oakenfull, und M. B. Smith (1979) *Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols*. Biochemistry, 18(23), pp. 5191–5196. doi:10.1021/bi00590a025
- [83] E. Chatani, R. Hayashi, H. Moriyama, und T. Ueki (2000) *Conformational strictness required for maximum activity and stability of bovine pancreatic ribonuclease A as revealed by crystallographic study of three Phe120 mutants at 1.4 Å resolution*. Protein Sci., 11, pp. 72–81. doi:10.1110/ps.ps.31102. PMID: 11742124

- [84] N. Ul (1971) *Isoelectric points and conformation of proteins: I. Effect of urea on the behavior of some proteins in isoelectric focusing*. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct.*, 229(3), pp. 567–581. doi:10.1016/0005-2795(71)90272-8
- [85] A. C. Koch-Schmidt und K. Mosbach (1977) *Studies on conformation of soluble and immobilized enzymes using differential scanning calorimetry. 2. Specific activity and thermal stability of enzymes bound weakly and strongly to Sepharose CL 4B*. *Biochemistry*, 16(10), pp. 2105–2109. doi:10.1021/bi00629a009
- [86] K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart, M. Chruszcz, und W. Minor (2011) *Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins*. *Mol.Immunol.*, 52, pp. 174–182. doi:10.1016/j.molimm.2012.05.011. PMID: 22677715
- [87] W. Norde und C. E. Giacomelli (2000) *BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states*. *J. Biotechnol.*, 79(3), pp. 259–268. doi:10.1016/S0168-1656(00)00242-X
- [88] D. C. Carter und J. X. Ho (1994) *Advances in Protein Chemistry*, Bnd. 45 von *Lipoproteins, Apolipoproteins, and Lipases*. Academic Press
- [89] D. W. Borhani, D. P. Rogers, J. A. Engler, und C. G. Brouillette (1997) *Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 94, pp. 12 291–12 296. doi:10.1073/pnas.94.23.12291. PMID: 9356442
- [90] L. I. Gidez, J. B. Swaney, und S. Murnane (1977) *Analysis of rat serum apolipoproteins by isoelectric focusing. I. Studies on the middle molecular weight subunits*. *J. Lipid Res.*, 18(1), pp. 59–68. PMID: 188960
- [91] O. Gursky und D. Atkinson (1996) *Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state*. *PNAS*, 93(7), pp. 2991–2995. PMID: 8610156
- [92] Proteindatenbank <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- [93] J. Engel, E. Odermatt, A. Engel, J. A. Madri, H. Furthmayr, H. Rohde, und R. Timpl (1981) *Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix*. *J. Mol. Biol.*, 150(1), pp. 97–120. doi:10.1016/0022-2836(81)90326-0
- [94] V. E. Koteliansky, M. A. Glukhova, M. V. Benjamin, V. N. Smirnov, V. V. Filimonov, O. M. Zalite, und S. Y. Venyaminov (1981) *A Study of the Structure of Fibronectin*. *Eur. J. Biochem.*, 119(3), pp. 619 – 624. doi:10.1111/j.1432-1033.1981.tb05652.x

- [95] N. M. Tooney, M. W. Mosesson, D. L. Amrani, J. F. Hainfeld, und J. S. Wall (1983) *Solution and surface effects on plasma fibronectin structure*. J. Cell. Biol., 97(6), pp. 1686–1692. doi:10.1083/jcb.97.6.1686. PMID: 6417145
- [96] E. C. Williams, P. A. Janmey, J. D. Ferry, und D. F. Mosher (1982) *Conformational states of fibronectin. Effects of pH, ionic strength, and collagen binding*. J. Biol. Chem., 257(24), pp. 14973–14978. PMID: 7174679
- [97] *Avanti Polar Lipids*. URL <http://avantilipids.com/>
- [98] (2014). *Cholesterol*. URL <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cholesterol&oldid=604092590>. Page Version ID: 604092590
- [99] A. Ivankin, I. Kuzmenko, und D. Gidalevitz (2010) *Cholesterol-Phospholipid Interactions: New Insights from Surface X-Ray Scattering Data*. Phys. Rev. Lett., 104(10), . 108 101. doi:10.1103/PhysRevLett.104.108101
- [100] W. Kern (1993) *Handbook of semiconductor wafer cleaning technology: science, technology, and applications*. Noyes, Park Ridge (N.J.)
- [101] M. Mezger, H. Reichert, S. Schöder, J. Okasinski, H. Schröder, H. Dosch, D. Palms, J. Ralston, und V. Honkimäki (2006) *High-resolution in situ x-ray study of the hydrophobic gap at the water–octadecyl-trichlorosilane interface*. PNAS, 103(49), pp. 18 401–18 404. doi:10.1073/pnas.0608827103. PMID: 17116878
- [102] (2014). *Hellma Analytics*. URL <http://www.hellma-analytics.com/text/839/de/kuevettenreinigung-mit-hellmanex-iii.html>
- [103] I. Kiesel, M. Paulus, J. Nase, S. Tiemeyer, C. Sternemann, K. Rüster, F. J. Wirkert, K. Mende, T. Büning, und M. Tolan (2014) *Temperature-Driven Adsorption and Desorption of Proteins at Solid–Liquid Interfaces*. Langmuir, 30(8), pp. 2077–2083. doi:10.1021/la404884a
- [104] J. D. Bryers (2008) *Medical biofilms*. Biotechnology and Bioengineering, 100(1), pp. 1–18. doi:10.1002/bit.21838
- [105] C. G. Kumar und S. K. Anand (1998) *Significance of microbial biofilms in food industry: a review*. International Journal of Food Microbiology, 42(1–2), pp. 9–27. doi:10.1016/S0168-1605(98)00060-9
- [106] J. Talbot, G. Tarjus, P. Van Tassel, und P. Viot (2000) *From car parking to protein adsorption: an overview of sequential adsorption processes*. Colloids Surf., A, 165(1–3), pp. 287–324. doi:10.1016/S0927-7757(99)00409-4
- [107] Y. Tie, C. Calonder, und P. R. Van Tassel (2003) *Protein adsorption: Kinetics and history dependence*. J. Colloid Interface Sci., 268(1), pp. 1–11. doi:10.1016/S0021-9797(03)00516-2

- [108] S. I. Mamatkulov, P. K. Khabibullaev, and R. R. Netz (2004) *Water at Hydrophobic Substrates: Curvature, Pressure, and Temperature Effects*. *Langmuir*, 20(11), pp. 4756–4763. doi:10.1021/la036036x
- [109] T. R. Jensen, M. Østergaard Jensen, N. Reitzel, K. Balashev, G. H. Peters, K. Kjaer, and T. Bjørnholm (2003) *Water in Contact with Extended Hydrophobic Surfaces: Direct Evidence of Weak Dewetting*. *Phys. Rev. Lett.*, 90(8), . 086 101. doi:10.1103/PhysRevLett.90.086101
- [110] K. Lum, D. Chandler, and J. D. Weeks (1999) *Hydrophobicity at Small and Large Length Scales*. *J. Phys. Chem. B*, 103(22), pp. 4570–4577. doi:10.1021/jp984327m
- [111] D. A. Doshi, E. B. Watkins, J. N. Israelachvili, and J. Majewski (2005) *Reduced water density at hydrophobic surfaces: Effect of dissolved gases*. *PNAS*, 102(27), pp. 9458–9462. doi:10.1073/pnas.0504034102. PMID: 15976022
- [112] D. Schwendel, T. Hayashi, R. Dahint, A. Pertsin, M. Grunze, R. Steitz, and F. Schreiber (2003) *Interaction of Water with Self-Assembled Monolayers: Neutron Reflectivity Measurements of the Water Density in the Interface Region*. *Langmuir*, 19(6), pp. 2284–2293. doi:10.1021/la026716k
- [113] R. Steitz, T. Gutberlet, T. Hauss, B. Klösgen, R. Krastev, S. Schemmel, A. C. Simonsen, and G. H. Findenegg (2003) *Nanobubbles and Their Precursor Layer at the Interface of Water Against a Hydrophobic Substrate*. *Langmuir*, 19(6), pp. 2409–2418. doi:10.1021/la026731p
- [114] A. C. Simonsen, P. L. Hansen, and B. Klösgen (2004) *Nanobubbles give evidence of incomplete wetting at a hydrophobic interface*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273(1), pp. 291–299. doi:10.1016/j.jcis.2003.12.035
- [115] Q. Du, E. Freysz, and Y. R. Shen (1994) *Surface Vibrational Spectroscopic Studies of Hydrogen Bonding and Hydrophobicity*. *Science*, 264(5160), pp. 826–828. doi:10.1126/science.264.5160.826. PMID: 17794723
- [116] C.-Y. Lee, J. A. McCammon, and P. J. Rossky (1984) *The structure of liquid water at an extended hydrophobic surface*. *The Journal of Chemical Physics*, 80(9), pp. 4448–4455. doi:10.1063/1.447226
- [117] M. J. Thomas, S. Bhat, and M. G. Sorci-Thomas (2008) *Three-dimensional models of HDL apoA-I: implications for its assembly and function*. *J. Lipid Res.*, 49(9), pp. 1875–1883. doi:10.1194/jlr.R800010-JLR200. PMID: 18515783
- [118] Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, M. Takagaki, and H. Yamada (2009) *Driving Force Behind Adsorption-Induced Protein Unfolding: A Time-Resolved X-ray Reflectivity Study on Lysozyme Adsorbed at an Air/Water Interface*. *Langmuir*, 25(1), pp. 32–35. doi:10.1021/la803235x

-
- [119] M. Kampmann (2014) *Diplomarbeit, Adsorption von Apolipoprotein an der Flüssigkeits-Gas-Grenzfläche*. TU Dortmund
- [120] V. Mitropoulos und A. Suisse), Erich Josef Windhab (Ingénieur en science alimentaire (2012) *Structure and Mechanics of Protein Stabilized Interfaces*. Dissertation, ETH / Laboratory of Food Process Engineering
- [121] Y. Yoneda (1963) *Anomalous Surface Reflection of X-Rays*. Phys. Rev., 131(5), pp. 2010–2013. doi:10.1103/PhysRev.131.2010
- [122] I. Lilge und H. Schönherr (2013) *Covalently cross-linked poly(acrylamide) brushes on gold with tunable mechanical properties via surface-initiated atom transfer radical polymerization*. European Polymer Journal, 49(8), pp. 1943–1951. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2013.02.023
- [123] I. Lilge, M. Steuber, D. Tranchida, E. Sperotto, und H. Schönherr (2013) *Tailored (Bio)Interfaces via Surface Initiated Polymerization: Control of Grafting Density and New Responsive Diblock Copolymer Brushes*. Macromol. Symp., 328(1), pp. 64–72. doi:10.1002/masy.201350607
- [124] D. Tranchida, E. Sperotto, T. Staedler, X. Jiang, und H. Schönherr (2011) *Nanomechanical Properties of Oligo(ethylene glycol methacrylate) Polymer Brush-Based Biointerfaces*. Advanced Engineering Materials, 13(10), . B369–B376. doi: 10.1002/adem.201080129

Publikationen

- I.Kiesel, M. Paulus, J. Nase, S. Tiemeyer, C. Sternemann, K. Rüster, F. J. Wirkert, K. Mende, T. Büning, and M. Tolan
Temperature-Driven Adsorption and Desorption of Proteins at Solid-Liquid Interfaces
Langmuir **30** (8) (2014) 2077-2083
- Hendrik Hähl, Isabelle Möller, Irena Kiesel, Dorinel Verdes, and Stefan Seeger
 α -synuclein insertion into supported lipid bilayers as seen by in situ X-ray reflectivity
eingereicht bei ACS Chemical Neuroscience
- D. Bruns, I. Kiesel, S. Jentsch, S. Lindemann, C. Otte, and J. Wollschläger
Structural analysis of FeO(111)/Ag(001): Undulation of hexagonal oxide monolayers due to square lattice metal substrates
eingereicht bei J. Phys.: Condens. Matter

Konferenzbeiträge

- 8th Autumn School on X-ray Scattering from Surfaces and Thin Layers, Oktober 2011, Smolenice (Slowakei)
Vortrag, Temperature-induced denaturation of protein layers at solid-liquid interfaces - an x-ray reflectivity study
- Deutsche Physikerinnen Tagung, November 2011, Saarbrücken
Vortrag, Temperaturinduzierte Denaturierung von Proteinen an fest/flüssig Grenzflächen - eine Röntgenreflektivitätsstudie
- DELTA User Meeting, November 2011, Dortmund
Poster, Temperature-induced denaturation of protein layers at solid-liquid interfaces
- DPG Frühjahrstagung, März 2012, Berlin
Vortrag, Temperature-induced denaturation of protein layers at solid-liquid interfaces - an x-ray reflectivity study
- Synchrotron-based Biomedical research (Workshop), Mai 2012, Hamburg
Vortrag, Proteins at interfaces of liquids: adsorption, order and denaturation
- Gordon Research Conference and Gordon Research Seminar Biointerface Science, Mai 2012, Les Diablerets (Schweiz)
Poster, Proteins at interfaces of liquids: adsorption, order and denaturation
- Seminar Physikalische Chemie Siegen (Prof. Schönherr), Juli 2012, Siegen
Vortrag, X-ray scattering as a tool to investigate thin biofilms

- SXNS 2012, Juli 2012, Kalkutta (Indien)
Poster, Proteins at liquid-solid and liquid-membrane interfaces: adsorption, order and denaturation
- DELTA User Meeting, November 2012, Dortmund
Poster, Proteins at liquid-solid interfaces: adsorption, order and denaturation
- DPG Frühjahrstagung, März 2013, Regensburg
Poster, Temperature treatment of protein layers at the solid/liquid interface in different environments - an x-ray reflectivity study
- BioMat 2013, April 2013, Weimar
Poster, X-Ray Scattering as a tool to investigate thin biofilms
- Biology and synchrotron radiation, September 2013, Hamburg
Poster, Heat induced structural changes of protein layers at the solid-liquid interface - an x-ray reflectivity study
- 9th Autumn School on X-ray Scattering from Surfaces and Thin Layers, September 2013, Smolenice (Slowakei)
Vortrag, Investigation of heat induced protein ad- and desorption at silicon surfaces in aqueous solution with x-ray reflectivity
- DELTA User Meeting, November 2013, Dortmund
Poster, Heat induced de- and adsorption of proteins at the solid-liquid interface
- Resolv Cluster C Treffen, November 2013, Bochum
Poster, X-ray reflectivity studies at soft matter interfaces

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Metin Tolan für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit bedanken. Dabei bin ich besonders dankbar dafür, dass ich mit meinen eigenen Vorstellungen und Ideen maßgeblich diese Arbeit gestalten konnte und dabei jegliche Unterstützung bekommen habe. Auch die zahlreichen Konferenzbesuche, die ich durchführen durfte, wurden durch Prof. Tolan gefördert.

Prof. Dr. Jan Kierfeld danke ich dafür, dass er meine Arbeit begutachtet hat.

Außerdem möchte ich besonders Dr. Michael Paulus und Dr. Julia Nase danken, da sie in großem Maße an dem Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren. Jederzeit konnte ich mich mit Fragen an sie wenden, da sie immer für Diskussionen und Anregungen offen waren. Insbesondere für die Korrekturen und Anmerkungen zu meinen Veröffentlichungen, Abstracts, Postern und Vorträgen möchte ich mich bedanken.

Für das Gelingen der Messzeiten sind viele Personen verantwortlich, denen ich ebenfalls danken möchte. Zunächst zu nennen sind die Beamline Scientists Dr. Michael Paulus (BL9), Dr. Christian Sternemann (BL9) und Dr. Bernd Struth (BW1). Ohne ihren Support an den Beamlines wären dort keine Experimente möglich. Insbesondere möchte ich mich auch bei all denjenigen bedanken, die mich bei den Messungen unterstützt und zum Teil auch Nachtschichten für mich durchgeführt haben. Dabei möchte ich namentlich erwähnen: Dr. Sebastian Tiemeyer, Dr. Julia Nase, Dr. Johannes Möller, Friederike Giebel, Kolja Mende, Karin Rüster, Florian J. Wirkert, Dr. Patrick Degen und Dr. D. C. Florian Wieland. Außerdem danke ich Ihnen für ihre Unterstützung, Ideen und Diskussionen. Des Weiteren möchte ich den gesamten Beschleunigerteams von DELTA und HASYLAB für die Bereitstellung der Synchrotronstrahlung danken. Ebenfalls danke ich Dr. Hendrik Hähl aus Saarbrücken für zahlreiche Diskussionen zur Auswertung von Röntgenreflektivitätsmessungen an Proteinschichten.

Ich danke auch Frau Kralemann und ihrem Team aus der mechanischen Werkstatt für die Anfertigung der Heizzelle, des Probenhalters und der Adapterplatte und für die Beratung bei der Konstruktion.

Weiterhin bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe E1a für die gute Arbeitssphäre und die Offenheit, sich auf jegliche Fragen, die auch zum Teil weit über die Forschungsthemen hinausgingen, einzulassen. Dabei danke ich auch für die Einblicke in die Welt des Fußballs. Viel Freude hat mir die Organisation der Betriebsausflüge in dieser Arbeitsgruppe gemacht. Insbesondere möchte ich gerne meinen Bürokollegen danken. Zum einen Thorsten Brenner, der mir jederzeit bei Problemen in Matlab zur Seite stand, und geduldig jedes Problem mit mir besprochen hat. Zum anderen Anne K. Hüsecken, die mir gerne bei Fragen zur Proteinadsorption und zu Reflektivitäten geholfen hat. Aber auch die gemeinsamen Freizeitaktivitäten, insbesondere das Segeln,

hat mir viel Spaß gemacht. Des Weiteren möchte ich Karin Rüster danken, die sich, neben Zerstreuung bei Tee und Gesprächen übers Tanzen, auch gerne meine aktuellsten Probleme oder Erfolge in der Wissenschaft angehört hat. Auch Kolja Mende hatte stets ein offenes Ohr für mich, wobei ich besonders seinen trockenen Humor zu schätzen weiß. Steffen Bieder möchte ich als ruhigen Pol in den beiden "DELTA-Büros" danken, und für Ratschläge insbesondere beim Zusammenschreiben der Doktorarbeit.

Einen wichtigen Part haben in dieser Arbeit die Korrekturleser. An dieser Stelle möchte ich Dr. Julia Nase, Dr. Michael Paulus und Dr. Sven A.H. Müller für ihre Anmerkungen und Verbesserungsvorschläge danken.

Meiner besten Freundin und Studienkollegin Anna K. Schuppert danke ich für unsere wunderbare gemeinsame Zeit, die bereits in der Oberstufe begann und das gesamte Studium anhielt. Auch wenn unsere Doktorarbeit uns räumlich voneinander trennte, so hatte sie dennoch immer noch ein offenes Ohr für meine Probleme und Erfolge sowohl in der Wissenschaft als auch privat. Unsere Wege und wissenschaftlichen Karrieren werden sich weiter trennen, doch unsere Freundschaft hoffentlich nicht.

Außerdem möchte ich meiner Familie für ihre Unterstützung und Bestärkung auf meinem Werdegang bis hierher bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz besonders bei meinem Freund Dr. Sven A. H. Müller bedanken, der alle Höhen und Tiefen mitgemacht hat. Ich freue mich besonders über sein Interesse an meiner Arbeit und seine Ideen und Vorschläge. Aber auch für die Zerstreuung bin ich ihm dankbar, sodass ich immer wieder mit neuer Kraft an meine Arbeit gehen konnte.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst habe. Anderer als der von mir angegebenen Hilfsmittel und Schriften habe ich mich nicht bedient. Alle wörtlich oder sinngemäß den Schriften anderer Autoren entnommenen Stellen habe ich kenntlich gemacht.

Dortmund, den 16. April 2014

(Irena Kiesel)