

**Untersuchung der Wechselwirkung von Proteinen mit  
auf der Oberfläche von Polymerdispersionen  
aufgefropften, dicht gepackten Polyelektrolytbürsten**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)  
vorgelegte

**DISSERTATION**

von

Diplom-Chemiker  
**Alexander Wittemann**  
aus Philippsburg

Dekan: Prof. Dr. M. M. Kappes  
Referent: Prof. Dr. M. Ballauff  
Koreferent: Prof. Dr. W. Freyland

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2004



## Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2000 bis Oktober 2003 am Polymerinstitut der Universität Karlsruhe (TH) durchgeführt und von November 2003 bis März 2004 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Universität Bayreuth fortgesetzt.

Herrn Prof. Dr. M. Ballauff danke ich für die interessante Aufgabenstellung, sein Interesse an meiner Arbeit, viele Anregungen und seine stetige Diskussionsbereitschaft. Zudem danke ich ihm für die Ermöglichung zahlreicher Teilnahmen an Tagungen und Projektbesprechungen.

Bei allen Mitgliedern und Ehemaligen des Polymerinstituts möchte ich mich herzlich für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit sowie die Hilfsbereitschaft bei Fragen aller Art bedanken. An dieser Stelle möchte ich insbesondere Jürgen Blaul, Ines Pietsch, Mushtaq Patel und Geeta Sharma erwähnen, welche zahlreiche Aufgaben zur Aufrechterhaltung eines intakten Laborbetriebs übernahmen.

Björn Haupt danke ich für die enge Zusammenarbeit, die Aufnahme der TEM-Bilder, die Durchsicht dieser Arbeit und die Hilfe bei Computerproblemen. Bei Markus Rastätter und Thorsten Neumann bedanke ich mich für ihre engagierte Mitarbeit in der Proteingruppe während ihrer Diplomarbeit.

Eugenia Breininger, Sabine Rosenfeldt, Nico Dingenouts und Jörg Bolze danke ich für die SAXS-Mesungen, deren Auswertung und die Bereitschaft zur Diskussion.

Mein besonderer Dank gilt Julja Dikich und Michael Scharpf, die diese Arbeit während ihrer HiWi-Tätigkeit ein gutes Stück voran gebracht haben. Weiter möchte ich mich bei meinen Vertiefungspraktikanten Julia Lessant, Jochen Ring, Silvia Diewald und Maia Gelaschwili für ihren Fleiß und ihren Einsatz bedanken.

Unseren Sekretärinnen Manuela Winkler und Ilona Deger danke ich herzlich für ihr großes Engagement, die Abwicklung der Personalbelange sowie den reibungslosen Ablauf der Dienstgeschäfte. Herrn Dr. Horvath danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und die akribische Planung des Umzugs in den Neubau, Wolfgang Arbogast für seine Hilfe bei apparativen Problemen und Helena Hörig für ein offenes Ohr bei Problemen aller Art. Herrn Kühn danke ich für seinen unermüdlichen Einsatz bei der Verbesserung und der

Konstruktion neuer Ultrafiltrationsapparaturen, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Bei Herrn Martin Luft von der Firma Bruker Optik GmbH möchte ich mich für die Einweisung am Confocheck-System sowie für seine praktischen Ratschläge bei apparativen Schwierigkeiten bedanken.

Frau Prof. Dr. A. S. Ulrich danke für die Möglichkeit die Elektrophoreseapparaturen an ihrem Lehrstuhl nutzen zu können. Herrn Christian Weber gilt mein Dank für die geduldige und ausführliche Einführung in die Gelelektrophorese. Dr. Christian Lange danke ich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Eine besondere Bereicherung waren die externen Kooperationen während meiner Arbeit. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. Claus Czeslik von der Universität Dortmund für die Durchführung und Auswertung der CD- und Fluoreszenzspektroskopie sowie für die intensive Zusammenarbeit bedanken. Weiterhin gilt mein Dank Hartmut Gliemann und Thomas Koch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Schimmel am Institut für Nanotechnologie (INT) des Forschungszentrums Karlsruhe für die Durchführung der LCSM-Experimente. Hartmut Gliemann danke ich insbesondere für die ausgiebigen und interessanten Fachdiskussionen und Erklärungen. Prof. Dr. G. U. Nienhaus und Herrn Dr. Carlheinz Röcker von der Universität Ulm danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und den Einblick in biophysikalische Arbeitsmethoden.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mich in bewundernswerter Weise während meines Studiums unterstützt haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, wodurch ich mich voll auf meine Aufgaben konzentrieren konnte.

# Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung .....	1
II	Aufgabenstellung .....	6
III	Grundlagen und Theorie .....	7
III.1	Wechselwirkung von Proteinen mit Polyelektrolytbürsten.....	7
III.1.1	Polyelektrolytbürsten: Mikroumgebung für Biomoleküle .....	7
III.1.2	Proteine.....	10
III.1.3	Puffersystem.....	14
III.1.4	Adsorptive Immobilisierung von Proteinen auf <i>brushes</i> .....	16
III.1.5	Triebkräfte der Proteinadsorption auf Polyelektrolytbürsten / <i>counterion release force</i> .....	18
III.1.6	Theoretische Beschreibung der Proteinadsorption.....	21
III.2	Messmethoden.....	28
III.2.1	Sekundärstrukturanalyse von Proteinen .....	28
III.2.2	Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS).....	32
IV	Allgemeiner Teil .....	37
IV.1	Synthese der Polyelektrolytbürsten.....	37
IV.1.1	Prinzip und Vorgehensweise.....	37
IV.1.2	Synthese der PS-co-HMEM-Kernlatices .....	39
IV.1.3	Synthese der Kern-Schale-Latices .....	40
IV.2	Charakterisierung der Polyelektrolytbürsten.....	44
IV.3	Analyse der Proteinchargen .....	52
IV.4	Proteinadsorption auf <i>annealed</i> und <i>quenched brushes</i> .....	59
IV.4.1	Einfluss der Pufferkonzentration .....	62
IV.4.2	Einfluss der Ionenstärke – <i>annealed brushes</i> .....	63
IV.4.3	Einfluss der Ionenstärke – <i>quenched brushes</i> .....	67
IV.4.4	Einfluss des <i>pH</i> -Wertes.....	70
IV.4.5	Einfluss des Proteins .....	72
IV.5	Freisetzung adsorbierter Proteine.....	77

IV.6	Untersuchung der Konformation der adsorbierten Proteine .....	81
IV.6.1	Analyse der Sekundärstruktur mittels FT-IR-Spektroskopie.....	81
IV.6.1.1	Proteine in Pufferlösung .....	81
IV.6.1.2	BSA adsorbiert auf <i>annealed brushes</i> .....	84
IV.6.1.3	Proteine adsorbiert auf <i>quenched brushes</i> .....	89
IV.6.2	Temperaturinduzierte Entfaltung freier und adsorbierter RNase A.....	94
IV.6.3	Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie .....	105
IV.6.4	Analyse der Tertiärstruktur mittels Fluoreszenzspektroskopie.....	109
IV.7	Visualisierung der adsorbierten Proteine mittels Konfokalmikroskopie .....	114
IV.8	Lokalisierung der Proteine in der <i>brush</i> -Schicht mittels SAXS .....	119
IV.8.1	RNase A in Lösung.....	120
IV.8.2	Analyse des Trägersystems.....	122
IV.8.3	<i>Quenched brush</i> mit adsorbierter RNase A .....	126
IV.8.4	<i>Annealed brush</i> mit adsorbiertem BSA .....	131
IV.9	Kovalente Anbindung von BSA an <i>annealed brushes</i> .....	135
V	Zusammenfassung.....	140
VI	Experimenteller Teil.....	142
VI.1	Synthese und Reinigung der Trägerpartikel .....	142
VI.1.1	Chemikalien .....	142
VI.1.2	Synthese des Photoinitiators HMEM.....	142
VI.1.3	Zweistufenemulsionspolymerisation zur Darstellung der PS-co-HMEM- Kernlatices .....	144
VI.1.4	Photoemulsionspolymerisation z. Darstellung der Kern-Schale-Latices.	146
VI.1.5	Emulsionspolymerisation zur Darstellung des PS-co-AA-Latex PSAA .	148
VI.1.6	Reinigung der Latices .....	149
VI.1.7	Abspaltungsreaktion .....	150
VI.2	Adsorptive und kovalente Immobilisierung der Proteine .....	151
VI.2.1	Proteine und Puffersysteme .....	151
VI.2.2	Proteinadsorption auf den Latexpartikeln.....	152
VI.2.3	Freisetzung und Abtrennung adsorbierter Proteine .....	154
VI.2.4	Kovalente Proteinimmobilisierung.....	155

VI.2.5	Quantifizierung der kovalent immobilisierten Proteinmenge .....	156
VI.3	Geräte und Untersuchungsmethoden .....	158
VI.3.1	Bestimmung des Feststoffgehaltes der Dispersionen.....	158
VI.3.2	Konduktometrische Titration .....	159
VI.3.3	Scheibenzentrifuge (DCP) .....	160
VI.3.4	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	162
VI.3.5	Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....	163
VI.3.6	Gelelektrophorese .....	164
VI.3.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	164
VI.3.6.2	Nativ-Elektrophorese .....	167
VI.3.6.3	Isoelektrische Fokussierung (IEF) .....	168
VI.3.7	UV/VIS-Absorptionsspektroskopie .....	169
VI.3.8	Infrarotspektroskopie .....	171
VI.3.9	Circulardichroismus (CD).....	173
VI.3.10	Fluoreszenzspektroskopie .....	174
VI.3.11	Laser-Scanning-Konfokalmikroskopie (LCSM).....	177
VI.3.12	Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS).....	178
VI.3.13	Sonstige Methoden.....	180
VI.4	Fehlerbetrachtung.....	181
VII	Literatur.....	185
VIII	Abkürzungen.....	192





## I Einleitung

Die Immobilisierung von Proteinen, insbesondere von Enzymen und Antikörpern, auf festen Oberflächen hat in den letzten Jahrzehnten eine fundamentale Bedeutung erlangt (*Proteins at Interfaces II* 1995). Zum einen soll häufig die Proteinadsorption gezielt unterdrückt werden, um die Biokompatibilität von Materialien, beispielsweise von Implantaten, heraufzusetzen (Ostuni *et al.* 2001). Hierzu ist eine entsprechende Modifizierung der Substratoberfläche erforderlich. Andererseits machen sich moderne biotechnologische Verfahren die Proteinadsorption für eine Vielzahl industrieller Anwendungen zunutze. Neben technischen Prozessen sind hierbei insbesondere diagnostische Verfahren anzuführen (Kawaguchi 2000).

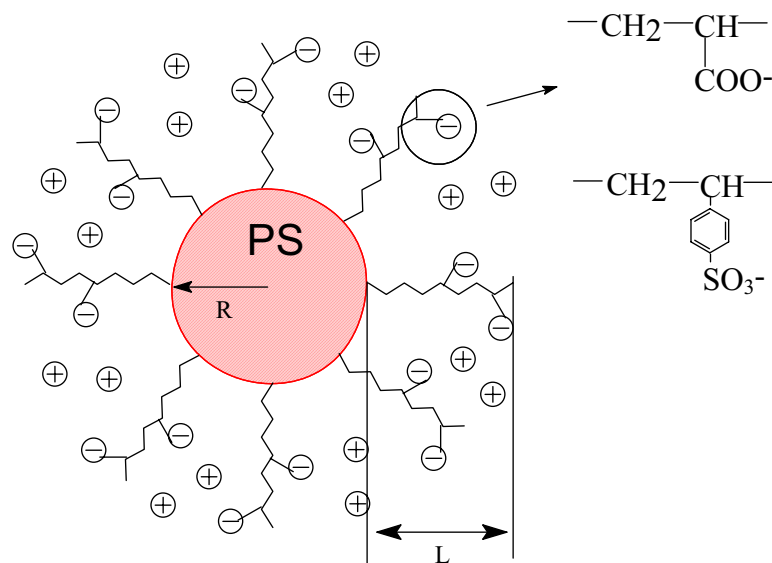
Die große technische Bedeutung hat zu einer schwer überschaubaren Anzahl an Literaturarbeiten auf diesem Gebiet geführt. Ein umfassendes Verständnis zur Vorhersage, ob ein bestimmtes Protein auf einem Substrat adsorbiert oder nicht, steht bisher allerdings aus. Ein möglicher Ansatz hierzu ist die Untersuchung der Wechselwirkung von Proteinen mit definiert strukturierten Substratoberflächen. Hierzu bieten sich insbesondere kolloidale Partikel von wenigen 100 nm Durchmesser an. Kolloidale Teilchen weisen in Suspension eine große Oberfläche an und lassen sich zudem mit zahlreichen physikalischen Methoden untersuchen. Der Adsorptionsvorgang lässt sich somit sowohl zeitaufgelöst, als auch in bezug auf äußere Einflüsse wie *pH*, Ionenstärke oder Temperatur verfolgen. Zahlreiche experimentelle Studien stützen sich daher auf Silikapartikel (Czeslik *et al.* 2001, Giacomelli *et al.* 2001), Latexpartikel (Kawaguchi *et al.* 1985, 2000, Oh *et al.* 2000, Yoon *et al.* 1996, 1999, Shirahama *et al.* 1989, 1991, Suzawa *et al.* 1982, 1983, 1985, 1991, Norde *et al.* 1994, Elgersma *et al.* 1990, Galisteo-González *et al.* 1994, Kondo *et al.* 1992, Lewis *et al.* 1988, Leaver *et al.* 1996) oder Silberiodid-Teilchen (Vermonden *et al.* 2001). Allgemein wird der komplexe Vorgang der Proteinadsorption in der Literatur auf verschiedenste Triebkräfte insbesondere hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen zurückgeführt (Andrade 1985, Yoon *et al.* 1999). Bisher steht jedoch ein klares Verständnis darüber aus, wie die Triebkräfte des Adsorptionsvorgangs gezielt genutzt werden können, um den Adsorptionsvorgang in vorhersehbarer Weise beeinflussen zu können.

Die Immobilisierung kann durch eine direkte Adsorption gelöster Proteinmoleküle erfolgen. Proteinmoleküle reagieren oft mit Konformationsänderungen auf äußere Veränderungen. Die Adsorption auf festen Oberflächen, beispielsweise auf Polystyrol- oder Silikapartikeln, ist daher mit einer Teilentfaltung bzw. Deformation der Proteinstruktur

verbunden (Wertz *et al.* 2001, 2002, Czeslik *et al.* 2001, 2003, Jackler *et al.* 2002, Fragneto *et al.* 2000). Diese Denaturierung bringt einen Verlust an Sekundär- und Tertiärstruktur mit sich und bewirkt die Irreversibilität des Adsorptionsvorgangs (Wertz *et al.* 2001).

Verschiedene Studien gingen der Ausbildung von Komplexen zwischen Proteinen und Polyelektrolyten nach (Dikov *et al.* 1980, Andersson *et al.* 1999, Xia *et al.* 1994, 1997, Mattison *et al.* 1999, Hattori *et al.* 2000, Porcar *et al.* 1998, Borrega *et al.* 1999). Durch den Zusatz der Polyelektrolytketten wurde eine höhere Lagerungsstabilität von Proteinlösungen erzielt. Zudem konnte eine Aggregation der Proteinmoleküle untereinander unterdrückt werden (Andersson *et al.* 1999). Xia *et al.* (1997) konnten zeigen, dass mit Polyelektrolytketten komplexierte Enzyme in ihrer Aktivität unbeeinträchtigt blieben. In diesen Fällen handelt es sich aber um keine definierte Träger-gebundene Immobilisierung. Ausgehend von kolloidalen Trägerpartikeln lassen sich jedoch gezielt Polyelektrolytmultischichten durch wechselseitige Adsorption kationischer und anionischer Polyelektrolytketten aufbauen (Decher 1997). Auf bzw. zwischen diesen Schichten können Proteinmoleküle eingelagert werden (Caruso *et al.* 2000, Lvov *et al.* 2001, Jin *et al.* 2001). Caruso *et al.* (2001) stellten fest, dass die Enzymaktivität bei der Einlagerung in die Polyelektrolytmultischichten weitgehend erhalten bleibt. Zudem konnte für vergleichbar aufgebaute Systeme auf planaren Substraten gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur der Proteine erhalten bleibt (Schwinté *et al.* 2001, 2002, Szyk *et al.* 2001, Müller *et al.* 2001).

In der vorliegenden Arbeit soll erstmalig die Wechselwirkung von Proteinen mit überlangen, dicht gepackten Polyelektrolytketten elektrosterisch stabilisierten Polystyrol-Latices (s. Abb. I.1) untersucht werden. Guo *et al.* (1999, 2000) entwickelten eine Technik zum gezielten Aufbau derartiger Systeme mit definierter Kern-Schale-Morphologie. Bei dem als Photoemulsionspolymerisation bezeichneten Verfahren erfolgt die Aufpolymerisation der Polyelektrolytketten über Radikale, welche unter UV-Initiierung auf Polystyrol-Partikeln von etwa 100 nm Durchmesser erzeugt werden. Man erhält auf diese Weise dicht gepackte Polyelektrolytketten, welche kovalent an die kolloidalen Trägerpartikel angeknüpft sind (s. Abb. I.1). Die mittleren Abstände der Anknüpfungspunkte der Polyelektrolytketten an die Kernoberfläche sind wesentlich kleiner als die Konturlänge der Polyelektrolytketten. Daher ist dieses System als sogenannter *brush* einzuordnen (Guo *et al.* 2000, 2001). Die *brushes* sind entweder aus dem starken Elektrolyten Polystyrolsulfonat oder dem schwachen Elektrolyten Polyacrylsäure aufgebaut. Bei niedriger Ionenstärke ist die Polyelektrolytschicht bedingt durch den osmotischen Druck der Gegenionen der Polyanionen stark gestreckt (Guo *et al.* 2001, Das *et al.* 2002).

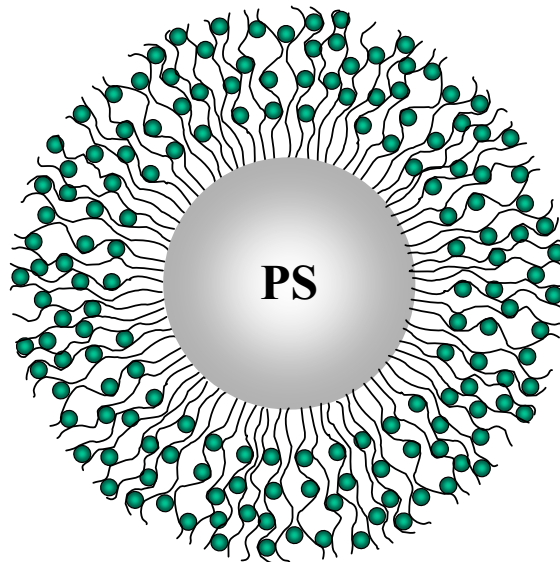


**Abb. I.1:** Schematische Darstellung der erstmalig von Guo *et al.* (1999) synthetisierten Kern-Schale-Latices: An einen festen Polystyrol-Kern (Radius  $R \approx 50$  nm) sind lineare anionische Polyelektrolytketten hoher Packungsdichte angeknüpft. Die Polyelektrolytschale (Dicke  $L$  zwischen 10 und 200 nm) besteht entweder aus dem schwachen Elektrolyten Polyacrylsäure oder dem starken Elektrolyten Polystyrolsulfonat.

Die adsorptive Immobilisierung von Proteinen auf den in Abbildung I.1 gezeigten Modellsystemen stand im Vordergrund der vorliegenden Arbeit. Dabei ließen sich bedingt durch das hohe effektive Volumen der Polyelektrolytschale teilweise über 1000 mg Protein pro Gramm der Latexpartikel adsorptiv binden (s. Abb. I.2). Hierbei stellte sich die Frage nach der Triebkraft der Proteinadsorption auf derartigen sphärischen Polyelektrolytbürsten. Im Falle der hier beschriebenen Systemen aus anionischen Polyelektrolytketten wäre eigentlich eine elektrostatische Abstoßung zwischen Protein und *brush* zu erwarten gewesen, da beide unter den in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen gleichnamig geladen sind. Hinzu kommt, dass aus neutralen Polymerketten, insbesondere Polyethylenglykol, bestehende Polymerbürsten als Protein-resistente Oberflächen (Jeon *et al.* 1991, Malmsten *et al.* 1998) gelten. Dies wird über eine sterische Repulsion zwischen Protein und *brush*-Schicht begründet (Halperin 1999).

Bisher gibt es nur wenige Arbeiten zur Untersuchung der Wechselwirkung von Proteinen mit geladenen *brushes*. Die einzige Studie auf definiert aufgebauten Systemen wurde von Tran *et al.* (1999) vorgestellt. Die Autoren untersuchten die Adsorption von Lysozym und Fibrinogen auf einem planaren *brush* aus dem starken Polyelektrolyten Polystyrolsulfonat mittels Neutronenreflektivität. Das positiv geladene Lysozym wird dabei erwartungsgemäß auf dem negativ geladenen Substrat adsorbiert. Überraschenderweise wird allerdings ebenfalls negativ geladenes Fibrinogen stark adsorbiert. Die Autoren vermuteten eine Wechselwirkung von Fibrinogen mit den Sulfonatgruppen des *brush* als Ursache dieser

unerwarteten Beobachtung. Die von den Reflektivitätsmessungen abgeleiteten Dichteprofile ließen auf eine Adsorption des Proteins in der Peripherie des planaren *brush* schließen (Tran *et al.* 1999).



**Abb. I.2:** Schematische Darstellung der Wechselwirkung von Proteinen mit sphärischen Polyelektrolytbürsten: Die Zeichnung gibt annähernd maßstabsgetreu die Dimensionen eines typischen, mit Hilfe der von Guo *et al.* (1999) entwickelten Photoemulsionspolymerisation hergestellten Polystyrol/Polyelektrolyt-Kern-Schale-Partikel (vgl. Abb. I.1) wieder. Bedingt durch die große Oberfläche des Polystyrol-Kerns von etwa 100 nm Durchmesser und des über die stark gestreckten Polyelektrolytketten aufgebauten Volumens steht ein großes potentiell Volumen zur adsorptiven Aufnahme von Proteinmolekülen zur Verfügung.

Saito und Mitarbeiter (Kawai *et al.* 2000, Nakamura *et al.* 1999, Koguma *et al.* 2000, Kim *et al.* 1998, Tsuneda *et al.* 1994) publizierten mehrere Arbeiten zur Proteinadsorption auf in Hohlfasern verankerten Polymerketten. Die Autoren konnten zeigen, dass sich mit Polyelektrolytketten modifizierte Hohlfasern zur Trennung von Proteingemischen eignen (Saito *et al.* 2002, Tsuneda, Saito *et al.* 1995). Nach adsorptiver Immobilisierung von Enzymen in den modifizierten Hohlfasermembranen konnten diese zur enzymatischen Katalyse genutzt werden (Kawai *et al.* 2001, Miura *et al.* 2002). Zudem wurde bei Erhöhung der Ionenstärke ein geringerer Adsorptionsgrad festgestellt (Tsuneda, Kagawa *et al.* 1995), was darauf schließen lässt, dass die Proteinadsorption auf derartigen Systemen nicht allein auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführt werden kann. Eine weitergehende Untersuchung dieses Effekts scheitert allerdings an der schwierigen Untersuchung des an Hohlfasern gebundenen Systems.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die erste Untersuchung der Proteinwechselwirkung mit den in Abbildung I.1 gezeigten *brushes*. Hierbei wurde das Adsorptionsverhalten verschiedener Proteine mit sowohl aus starken (*quenched brush*, Guo *et al.* 2000), wie auch aus schwachen Polyelektrolyten (*annealed brush*, Guo *et al.* 2000) aufgebauten Systemen untersucht. Suspensionen dieser kolloidalen Partikel sind bedingt durch die elektrostatische Stabilisierung über die Polyelektrolytketten bis zu relativ hohen Ionenstärken stabil. Daher kann die Abhängigkeit der Adsorption von der Ionenstärke systematisch untersucht werden.

Die Systeme unterscheiden sich klar von bisher untersuchten Latices, da die Oberflächeneigenschaften von den langen Polyelektrolytketten bestimmt werden. Zudem ist die mittlere Anknüpfungsdichte der Polyelektrolytketten kleiner als der Durchmesser der Proteine. Eine Wechselwirkung der Proteine ist somit ausschließlich über die Polyelektrolytbürsten möglich (s. Abb. I.2). Somit stellen die vorgestellten Polystyrol/Polyelektrolyt-Kern-Schale-Latices ein neuartiges kolloidales Trägersystem zur Adsorption bzw. Immobilisierung von Proteinen dar, welches zudem zu einem tiefergehenden Verständnis der Adsorptionsvorgänge auf geladenen Substraten beitragen kann. Für eine eventuelle technische Nutzung derartiger Systeme, darf die biologische Funktion der Proteine durch die Wechselwirkung mit den Polyelektrolytketten nicht beeinträchtigt werden. Ein weiterer zentraler Punkt der vorliegenden Arbeit stellte daher die Untersuchung der Konformation der adsorbierten Proteine dar.

## II Aufgabenstellung

Zunächst sollten Modelldispersionen über die von Guo *et al.* (1999) entwickelte Photoemulsionspolymerisation dargestellt und eingehend charakterisiert werden. Es sollte hierzu ein neuartiges Reaktorsystem erprobt werden, welches die Bereitstellung ausreichender Partikel definierter Morphologie ermöglichen sollte.

Die Untersuchung der Proteinadsorption auf den Modelldispersionen stand im Vordergrund. Hierzu sollte die Abhängigkeit des Adsorptionsgrades von zentralen äußeren Einflussgrößen wie Ionenstärke und *pH* anhand von Rinderserumalbumin (BSA) als Modellprotein gezielt studiert werden und in einem theoretischen Modell erfasst werden.

Neben einem Vergleich des Adsorptionsverhaltens verschiedener Proteine sowohl mit *brushes* bestehend aus starken, als auch schwachen Polyelektrolytbürsten, sollten Referenzexperimente an einem elektrostatisch stabilisierten Polystyrol-Latex durchgeführt werden. Hierbei sollten besondere Vorteile der Latexpartikel mit strukturierter Polymerschale im Vergleich zu kommerziellen Systemen zu Tage treten.

Die Sekundärstruktur der auf den Latexpartikeln adsorbierten Proteine sollte mit Hilfe eines speziell zur Proteinanalyse entwickelten FT-IR-Spektrometernaufbaus untersucht werden. Neben der Sekundärstrukturanalyse adsorbierter Proteine bei Raumtemperatur, sollte ebenfalls der Einfluss der Adsorption auf das Faltungs-/Entfaltungsverhalten von Ribonuklease A studiert werden. In Kooperation mit dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Dortmund sollten ergänzende Konformationsanalysen mittels CD-Spektroskopie sowie Fluoreszenzstudien an markierten Proteinen durchgeführt werden.

Untersuchungen mittels Röntgenkleinwinkelstreuung sollten darüber Aufschluss geben, in welchen Bereichen des *brush* die Proteine adsorbiert werden.

Eine weitere Kooperation mit dem Institut für Nanotechnologie (INT) des Forschungszentrums Karlsruhe hatte zum Ziel zu prüfen, inwiefern konfokalmikroskopische Untersuchungen zum Nachweis der Proteine auf den Latexpartikeln eingesetzt werden können.

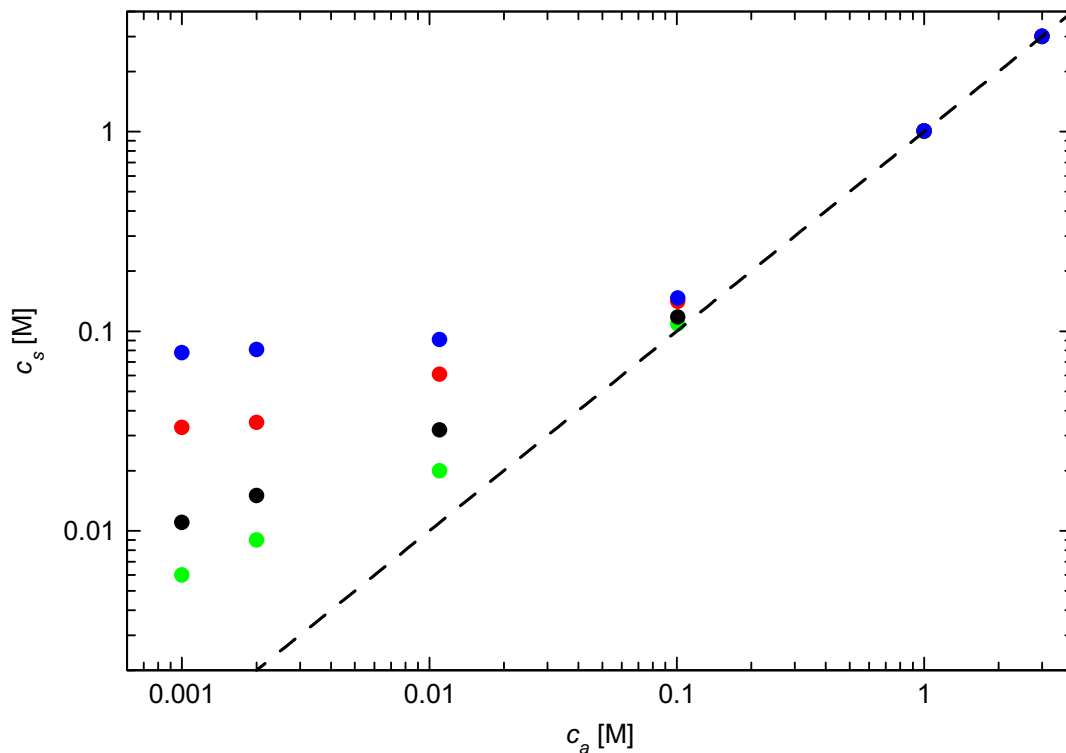
Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Carboxylfunktionen von *brushes* bestehend aus langen Polyacrylsäureketten zur kovalenten Immobilisierung von Proteinen herangezogen werden können.

### III Grundlagen und Theorie

#### III.1 Wechselwirkung von Proteinen mit Polyelektrolytbürsten

##### III.1.1 Polyelektrolytbürsten: Mikroumgebung für Biomoleküle

Wie eingangs angesprochen sollen die mit Hilfe der Photopolymerisationstechnik erhaltenen, dicht gepackten Polyelektrolytbürsten auf den Polystyrol-Trägerpartikeln zur Immobilisierung von Proteinen herangezogen werden. Aufgrund der definierten Morphologie der Kern-Schale-Partikel bzw. der physikalischen Eigenschaften der *brushes* sollte es möglich sein, eine definierte Mikroumgebung für die Biomoleküle zu realisieren, wie im folgenden näher ausgeführt werden soll:



**Abb. III.1:** Ionenstärke innerhalb des *brush*  $c_s$  als Funktion der äußeren Fremdsalzkonzentration  $c_a$  (Guo *et al.* 2000). Die zu den einzelnen Messreihen gehörigen Kern-Schale-Latices unterscheiden sich im Verhältnis von Konturlänge der Polyelektrolytketten bezogen auf die Oberflächenkrümmung des Kerns  $L_c/R$  (blau: 0,36; rot: 1,00; schwarz: 1,70; grün: 3,45).

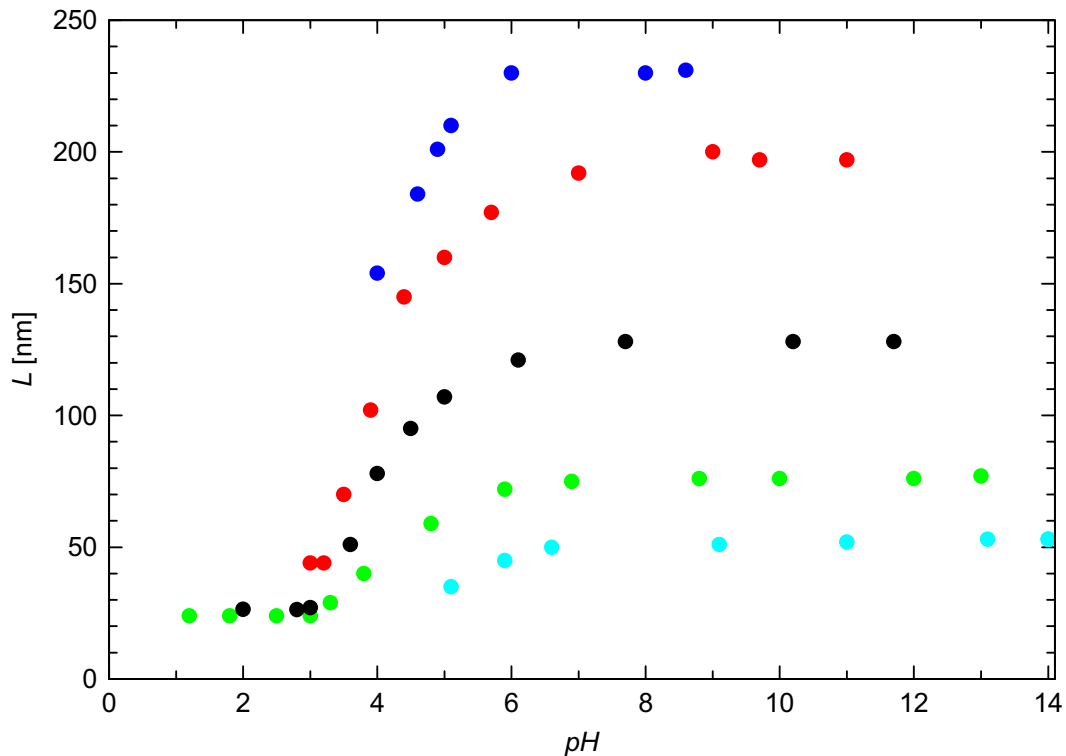
Bei Abwesenheit von Fremdsalz führt der osmotische Druck der Gegenionen der Polyelektrolytketten zu einer starken Streckung derselben, welche bis fast an die Konturlänge der Ketten heranreichen kann (Guo *et al.* 2001). Dieser Grenzfall wird als „osmotisches Limit“ des *brush* bezeichnet. Theoretische Ansätze zur Beschreibung des „osmotisches Limits“ sehen vor, dass sämtliche Gegenionen eines *osmotic brush* innerhalb der Polyelektrolytschicht anzutreffen sind (Pincus 1991). Jusufi *et al.* (2002) konnten mittels MD-Simulationen zeigen, dass bei sternförmig verzweigten Polyelektrolyten die Gegenionen entweder frei im Sterninneren oder entlang den gestreckten Polyelektrolytketten kondensiert vorliegen.

An *quenched brush*-Systemen, d. h. *brushes* bestehend aus starken Polyelektrolytketten, wurden von Das *et al.* (2002) Messungen des osmotischen Drucks in salzfreier Suspension durchgeführt. Das Verhältnis des experimentell ermittelten zum nach Van't Hoff berechneten idealen osmotischen Druck, der sogenannte osmotische Koeffizient, stellt ein Maß für die osmotische Aktivität der Gegenionen der Polyelektrolytketten dar. Der experimentell erhaltene osmotische Koeffizient lag im Bereich von 0,02 - 0,06, d. h. nur 2 - 6 % der Gegenionen tragen zum osmotischen Druck bei. Die übrigen sind innerhalb der *brush*-Schicht lokalisiert und können diese nicht verlassen. Weiter konnte festgestellt werden, dass der osmotische Koeffizient unabhängig von der Teilchenkonzentration ist und mit zunehmender Konturlänge der Polyelektrolytketten  $L_c$  abnimmt. Einen weiteren experimentellen Beweis dafür, dass die Gegenionen den *brush* nicht verlassen können, wurde mittels anormaler Röntgenstreuung (ASAXS, Dingenouts *et al.* 2003) erbracht.

Im fremdsalzfreien Zustand lässt sich die Ionenstärke im *brush* gezielt bei der Synthese der Systeme über die Konturlänge  $L_c$  und Packungsdichte  $\sigma$  der Polyelektrolytketten einstellen. Der fremdsalzfreie Zustand kann allerdings nur als Grenzfall dienen, da beim Arbeiten mit Biomolekülen Puffersysteme eingesetzt werden und somit eine Betrachtung der Abhängigkeit der Ionenstärke im *brush* von der äußeren Fremdsalzkonzentration erforderlich wird. Nach einer Theorie von Hariharan *et al.* (1998), lässt sich die Ionenstärke  $c_s$  innerhalb des *brush* als Funktion der äußeren Ionenstärke  $c_a$  berechnen. Abbildung III.1 gibt diese Abhängigkeit wieder. Im Bereich des *salted brush* bei hoher äußerer Fremdsalzkonzentration  $c_a$  entspricht  $c_s$  in etwa  $c_a$ . Der Anteil an Gegenionen ist hier im Verhältnis zur Fremdsalzkonzentration vernachlässigbar. Erniedrigt man aber die Fremdsalzkonzentration, so erfolgt bei etwa 0,1 M Ionenstärke der Übergang zum *osmotic brush*. Hier bleibt die Ionenstärke im *brush* nahezu konstant. Die Höhe des Plateauwertes in  $c_s$  entspricht der Gegenionenkonzentration im *brush*. Somit steigt dieser Wert mit zunehmender Dichte der Polyelektrolytketten pro Volumen bzw. sinkendem  $L_c/R$ -Verhältnis. Bedingt durch die sphärische Geometrie des Systems tritt bei langkettigen Polyelektrolytketten bzw. hohem  $L_c/R$ -Verhältnis kein ausgeprägtes Plateau der Ionenstärke auf (s. Abb. III.1). Bei äußeren Ionenstärken unter 100 mM herrschen jedoch nahezu konstante Ionenstärken innerhalb einer dicht gepackten *brush*-Schicht (kleines  $L_c/R$ -Verhältnis).



Zudem lässt sich über die Konturlänge  $L_c$  und Anknüpfungsdichte  $\sigma$  der Polyelektrolytketten - wie bereits erwähnt - die Ionenstärke im *brush* gezielt einstellen. Die Betrachtung gilt ausschließlich für einwertige Gegenionen. Bei kleinsten Zusätzen zweiwertiger Ionen ist kein ausgedehnter osmotischer Bereich mehr beobachtbar, welcher sich über einen größeren Bereich äußerer Fremdsalzkonzentration erstreckt (Guo *et al.* 2001). Dies ist auf den stärkeren Abschirmeffekt mehrwertiger Ionen zurückzuführen.



**Abb. III.2:** Hydrodynamische *brush*-Dicke  $L$  eines *annealed brush* (PS/PAA-Kern-Schale-Latex) in Abhängigkeit von  $pH$ -Wert und Fremdsalzkonzentration (Guo *et al.* 2000; blau: 0,0001 M; rot: 0,001 M; schwarz: 0,01 M; grün: 0,1 M; hellblau: 1 M).

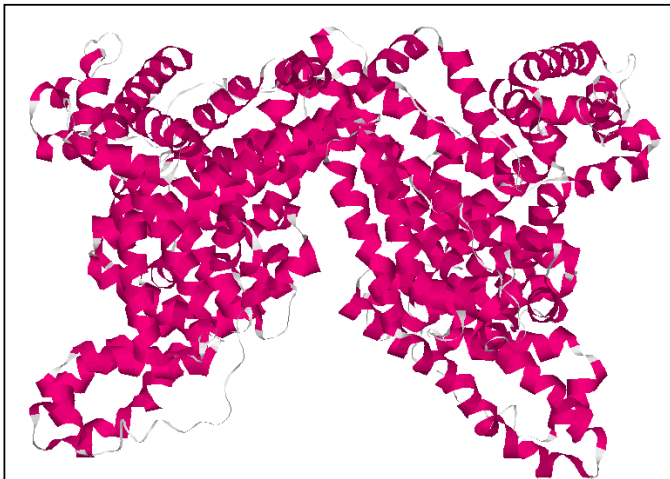
Im Falle eines *quenched brush* bestehend aus einem starken Elektrolyten wie Polystyrolsulfonat ist der Dissoziationsgrad und damit die Dicke der *brush*-Schicht unabhängig vom  $pH$ -Wert (Guo *et al.* 2001). Bei Systemen aus schwachen Elektrolyten wie Polyacrylsäure, sogenannten *annealed brushes* hängt der Ladungsabstand entlang den Polyelektrolytketten stark vom  $pH$ -Wert ab (Guo *et al.* 2000). Abbildung III.2 gibt die mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmte *brush*-Dicke  $L$  als Funktion des äußeren  $pH$ -Werts für ein derartiges System wieder. Bei niedrigem  $pH$ -Wert liegen undissoziierte Ketten vor. Bei  $pH$  3 - 6 erfolgt ein Übergang von einem ungeladenen in einen geladenen Zustand bis vollständige Dissoziation der Polyelektrolytketten erreicht wird. Bei höherem  $pH$ -Wert geht

der *annealed brush* somit in den *quenched brush* über. Im Bereich niedrigster Fremdsalzkonzentration entspricht der Übergang vom undissoziierten in den dissoziierten Zustand (s. Abb. III.2) einer Volumenänderung um den Faktor 50. Bei Fremdsalzzugabe nimmt die Schalendicke aufgrund der Ladungsabschirmung ab. Somit lässt sich über den *pH*-Wert und die äußere Ionenstärke  $c_a$  das hydrodynamische Teilchenvolumen kontrollieren bzw. gezielt einstellen.

### III.1.2 Proteine

Im folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Proteine im einzelnen vorgestellt.

#### *Serumalbumin (SA)*



**Abb. III.3:** Dimer aus zwei Serumalbuminmolekülen: Die herzförmigen Proteinmoleküle sind von helikalen Strukturbereichen dominiert (rot). Die Graphik wurde mit der Software RasMol (Version 2.7.2.1) erstellt, die zugehörige Strukturdatei (PDB-Code 1BM0) wurde der Proteindatenbank PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) entnommen.

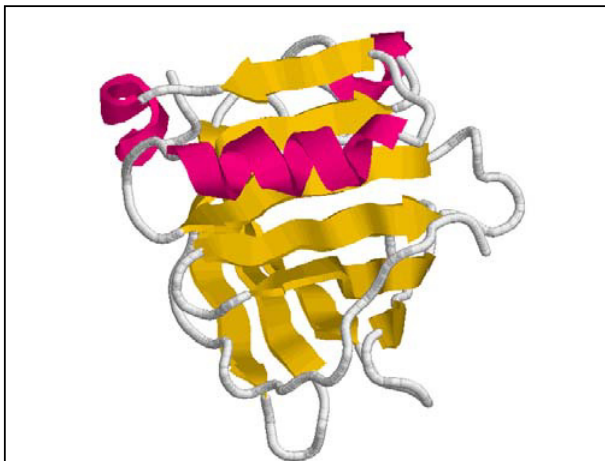
Eine hohe Verfügbarkeit, eine hohe Lagerungsstabilität und ein außergewöhnliches Bindungsvermögen zu einer Vielzahl von biologischen Molekülen haben Serumalbumin zu einem der bestuntersuchten Proteine der Biochemie werden lassen (Carter *et al.* 1994). Serumalbumin ist das vorherrschende Proteine im tierischen und menschlichen Blutplasma, tritt aber ebenso im Gewebe, in Körperflüssigkeiten und in Exkrementen auf (Giancola *et al.* 1997). Mit einer Konzentration von 5 g in 100 ml Blut trägt Serumalbumin zu 80 % zum osmotischen Blutdruck bei

(Carter *et al.* 1994). Daher kommt dem Protein eine zentrale Bedeutung bei der Osmoseregulation zu. Weiterhin spielt Albumin eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des *pH*-Werts im Blut (Carter *et al.* 1994). Zudem dient Albumin als Proteinreserve des Körpers (Römpp 1997). Eine besondere Eigenschaft von Serumalbumin ist sein

reversibles Bindungsvermögen an eine Vielzahl von Liganden (Carter *et al.* 1994). Insbesondere der Transport von Fettsäuren im Blut wird durch Albumin übernommen (Voet *et al.* 1994).

Rinderserumalbumin (BSA) mit einem Molekulargewicht von 66300 Dalton kann über Elektrophorese- oder Ionenaustauschtechniken vom Blutplasma abgetrennt werden (Giancola *et al.* 1997). Als Albumin zeichnet es sich durch einen niedrigen Tryptophan- und Methioningehalt aus, während es reich an Cystin und geladenen Aminosäuren (Asparagin-, Glutaminsäure, Lysin, Arginin) ist. Der Glycin- und Isoleucingehalt ist niedriger als bei anderen Proteinen (Giancola *et al.* 1997). Das aus 582 Aminosäuren aufgebaute Protein besitzt 17 Disulfidbrücken und ein freies Cystein. Bei *pH* 7 weist das Molekül 185 geladene Gruppen auf, was die ausgezeichnete Löslichkeit von BSA erklärt (Giancola *et al.* 1997). BSA besitzt eine relativ flexible Struktur, welche durch äußere Einflüsse (*pH*, Ionenstärke, Temperatur) beeinflusst wird (Carter *et al.* 1994). Bei *pH* < 2,7 liegt die sogenannte E(xpanded)-Form des Proteins vor, bei *pH* 3,0 – 4,0 die hochgeladene, elektrophoretisch besonders mobile F(ast)-Form. Oberhalb *pH* 4,3 geht das Molekül in die N(ormal)-Form über, welche bis *pH* 8 – 9 stabil ist. Bei höheren *pH*-Werten erfolgt ein weiterer Übergang in die hochprotonierte B(asic)-Form. Strukturell besteht BSA aus drei homologen Domänen (Carter *et al.* 1994), welche unterschiedliche Nettoladungen aufweisen (-10, -8, 0 für Domäne I, II, III bei *pH* 7, Peters 1985). Das von helikaler Struktur geprägte Protein weist eine herzförmige Gestalt auf (Carter *et al.* 1994).

#### *β*-Lactoglobulin (BLG)



**Abb. III.4:** *β*-Lactoglobulin (rot: Helices, gelb: *β*-Faltblatt): Die Graphik wurde mit der Software RasMol (Version 2.7.2.1) erstellt, die zugehörige Strukturdatei (PDB-Code 3BLG) wurde der Proteindatenbank PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) entnommen.

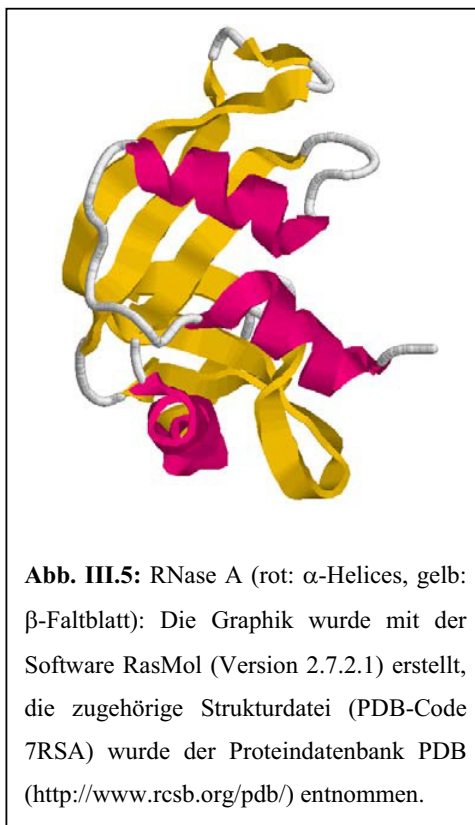
*β*-Lactoglobulin ist ein in der Milch von Wiederkäuern und vieler anderer Säugetiere enthaltenes Globulin (Brownlov *et al.* 1997). Ein Liter Kuhmilch enthält 2 – 3 g *β*-Lactoglobulin (Lyster *et al.* 1972). Das Protein liegt bei *pH* 3 – 7 in Form von Dimeren aus zwei Untereinheiten von 18,3 kDa bzw. 162 Aminosäuren vor (Bewley *et al.* 1997). Jede Untereinheit weist ein freies Cystein sowie zwei Disulfidbrücken auf (Brownlov *et al.* 1997). *β*-Lactoglobulin kann in mehreren genetischen Varianten auftreten, wobei beim Rind die Phänotypen A und B vorherrschend sind

(Valkonen *et al.* 2000). Beide Varianten unterscheiden sich lediglich in zwei Aminosäureresten und können anhand ihres isoelektrischen Punkts unterschieden werden (Brownlov *et al.* 1997). Die Polypeptidkette ist zu einem  $\beta$ -Zylinder gefaltet, welcher aus acht antiparallelen  $\beta$ -Strängen besteht (Brownlov *et al.* 1997). Zudem weist das Protein eine dreiwändige  $\alpha$ -Helix auf (Bewley *et al.* 1997).

$\beta$ -Lactoglobulin bindet vor allem Liganden hydrophober Natur und gehört daher zur Familie der Lipocaline (Sawyer *et al.* 1998). Aufgrund seines hohen Anteils in Molkeprodukten ist der Nährwert des Proteins unumstritten. Dennoch ist die biologische Funktion des Proteins bis heute unbekannt (Brownlov *et al.* 1997). Da das Protein strukturverwandt mit Retinol-bindendem Protein (RBP) ist und ebenfalls Retinol bindet, liegt die Vermutung nahe, dass das Protein eine Transportfunktion übernimmt (Sawyer *et al.* 1998).

### Ribonuklease A (RNase A)

Ribonukleasen gehören zur Klasse der Esterasen (Ester-spaltenden Hydrolasen). Sie vermögen RNA, aber nicht DNA zu Mono- u. Oligonucleotiden in 3'- oder 5'-Stellung abzubauen (Römpp 1997).



RNase A ist die vorherrschende Form des Enzyms in der Pankreas von *Bos taurus* (Raines 1998) und konnte bereits 1940 in kristalliner Form dargestellt werden (Römpp 1997). Die erste Entschlüsselung der Aminosäuresequenz eines Enzyms bzw. die dritte an einem Protein gelang im Falle von RNase A. Zudem konnte bei RNase A als drittem Enzym bzw. viertem Protein die dreidimensionale Struktur vollständig mittels Röntgenbeugung aufgeklärt werden (Raines 1998). Das einsträngige Protein mit einem Molekulargewicht von 13683 Dalton besteht aus 124 Aminosäuren (Chatani *et al.* 2001). Vorherrschende Strukturmerkmale sind ein viersträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt sowie drei kurze  $\alpha$ -Helices (Raines 1998). Die globuläre Struktur wird durch vier Disulfidbrücken zusammengehalten (Chatani *et al.* 2001), was eine außergewöhnlich hohe Anzahl in Betracht der Molekülgröße darstellt (Scheraga *et al.* 2001). Dies führt zu einer hohen Stabilität der nativen Konformation von RNase A (Raines 1998). Das aktive Zentrum liegt in der Einbuchtung des nierenförmigen Enzyms (Raines 1998). RNase A ist eine für Pyrimidin-

nucleotide spezifische, d. h. Cytidin- bzw. Uridin-3'-phosphat abspaltende Endonuklease (Römpp 1997). Die Hydrolyse des RNA-Stranges erfolgt somit an innenständigen Phosphodiester-Brücken.

Neben der enzymatischen Aktivität zeichnet sich RNase A durch die Fähigkeit zur Rückfaltung in die native Konformation nach thermischer (Yamamoto *et al.* 1991) oder reduktiver Denaturierung (Scheraga *et al.* 2001) aus. Diese herausragende Eigenschaft hat das Protein zu einem gutuntersuchten Modellsystem für Proteinfaltungsstudien werden lassen (Raines 1998).

### *Hämoglobin (Hb)*

Das Protein ist der rote Blutfarbstoff der Wirbeltiere, welcher in den Erythrozyten des Blutes enthalten ist und 95 % ihrer Trockenmasse ausmacht. Hämoglobin wird in den Blutbildungszentren des Körpers (Knochenmark beim Mensch) synthetisiert. Es tritt ebenfalls in anderen Organismen auf, wenn auch nicht an Erythrozyten gebunden (Römpp 1997). Das tetramere Protein mit einem Molekulargewicht von 64,0 kDa (Lvov *et al.* 1996) besteht aus Untereinheiten, die sich jeweils aus nicht-kovalent gebundenem Häm (Eisen(II)-Komplex des Protoporphyrins) und einer Polypeptidkette (Globin) zusammensetzen (Voet *et al.* 1994). Die vier Untereinheiten sind über zwischenmolekulare Wechselwirkungen verbunden und bilden ein sphäroides Protein mit vorwiegend helikaler Struktur. Die Häm-Einheiten liegen in „Taschen“ der Polypeptidketten nahe der Oberfläche des Tetramers (Römpp 1997).

Die biologische Funktion liegt in der Aufnahme des eingeatmeten Sauerstoffs in der Lunge und dem Weitertransport zu Muskeln und anderen atmenden Geweben. 1 Mol des tetrameren Proteins kann 4 Mol Sauerstoff aufnehmen (Voet *et al.* 1994). Des weiteren übernimmt Hämoglobin den Transport von Kohlendioxid zur Lunge, wo letzteres ausgeschieden wird (Römpp 1997).

### *Myoglobin (Mb)*

Myoglobin ist ein in den Muskeln konzentriert auftretendes Hämoprotein, welches eine Sauerstoff-Transportfunktion in der Muskulatur von Wirbeltieren vergleichbar der des Hämoglobins übernimmt (Römpp 1997). Wie Hämoglobin enthält auch Myoglobin nicht-kovalent gebundenes Häm, welches taschenförmig von einer Polypeptid-Kette (Globin) umhüllt wird. Im Unterschied zu Hämoglobin liegt das Protein jedoch monomer vor. Die Struktur des ellipsoiden Proteins mit einem Molekulargewicht von 17,8 kDa (Lvov *et al.* 1996) wird von acht Helices geprägt, an deren Ausbildung 121 der 153 Aminosäuren (Mensch) einbezogen sind (Voet *et al.* 1994).

### *Lysozym (Peptidoglykan-N-Acetylmuramoylhydrolase, Muramidase)*

Das Enzym konnte bisher in fast allen tierischen Körperflüssigkeiten sowie in vielen Pflanzen nachgewiesen werden. Im Eiklar tritt es mit einem Anteil von 3,5 – 5 % auf (Römpp 1997). Lysozym aus Hühnereiweiß ist ein einkettiges Polypeptid aus 129 AS (Römpp 1997) und einer Molmasse von 14600 (Arai *et al.* 1990). Die globuläre Struktur des Proteins wird durch vier Disulfidbrücken und zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen (Römpp 1997). Die erste Raumstrukturaufklärung eines Enzyms erfolgte an Lysozym (Römpp 1997). Damit wurde ein wesentlicher Beitrag zu einem Verständnis der Enzymwirkung auf molekularer Ebene geleistet. Lysozym spaltet die  $\beta(1\rightarrow4)$ -Bindungen zwischen N-Acetyl-D-muraminsäure und N-Acetyl-D-glucosamin-Resten (Voet *et al.* 1994, Römpp 1997). Natürliche Substrate des Enzyms sind daher die Murein-Bestandteile der Zellwände vieler Bakterienarten. Durch die bakteriolytische Fähigkeit liegt die physiologische Bedeutung des Enzyms in der Abwehr von Bakterien (Römpp 1997).

### *Amylasen*

Amylasen (Diastasen) sind zur Klasse der Hydrolasen gehörende Enzyme, welche Stärke und Glykogen direkt oder über Dextrine zu Maltose und Glucose abbauen (Römpp 1997).

$\alpha$ -Amylase (1,4-D-Glucan-4-Glucanohydrolase) kommt im Mund und den Verdauungsdrüsen von Mensch und Tieren sowie in Malz, Bakterien und Pilzen vor. Das 1,4-glykosidische Bindungen spaltende Enzym zerlegt Stärke zunächst in größere Fragmente (Dextrine) bevor der Abbau zu Oligosacchariden erfolgt (Römpp 1997).  $\alpha$ -Amylase verschiedener Herkunft unterscheidet sich im Molekulargewicht (15000 – 97000), im *pH*-Wirkungsbereich (3,5 – 9), im Temperaturoptimum (45 – 90°C) sowie in der Inaktivierungstemperatur (60 – 100°C). Darüber hinaus können unterschiedliche Spaltprodukte erhalten werden (Römpp 1997).

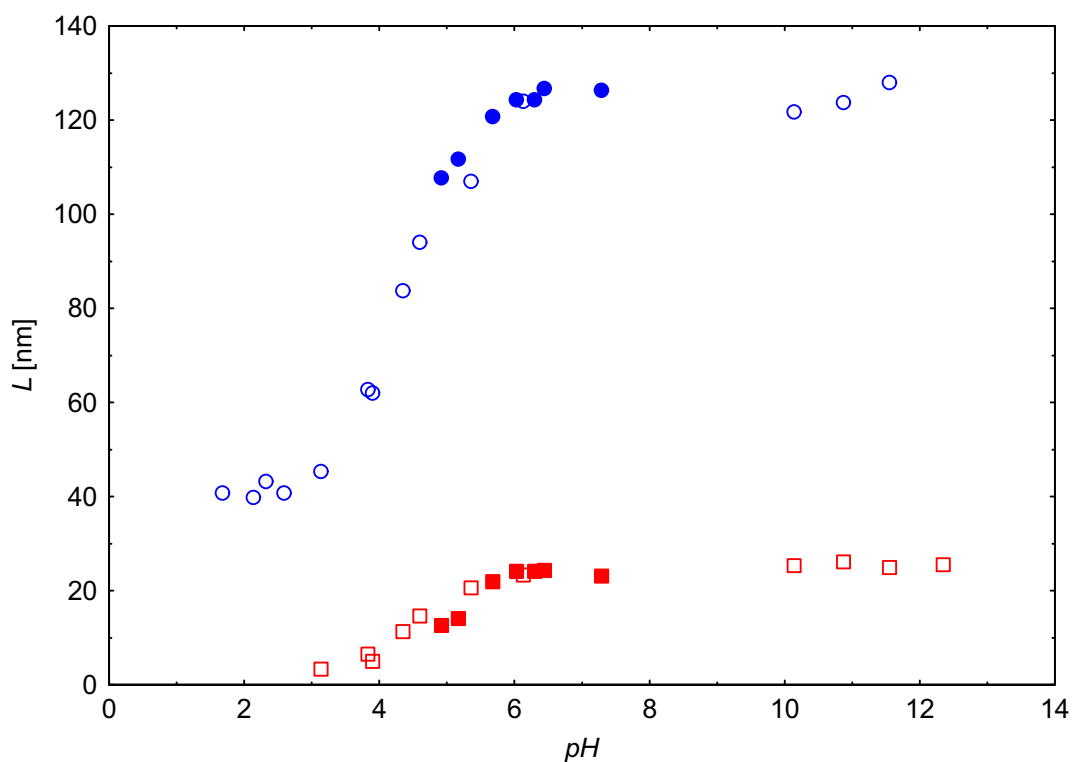
Glucoamylase (1,4-D-Glucan-Glucohydrolase, auch Amyloglucosidase oder  $\gamma$ -Amylase genannt) ist aus Pilzen, Bakterien und Hefen isolierbar. Das Enzym, welches im Gegensatz zur  $\alpha$ -Amylase ebenfalls 1,6-glykosidische Bindungen spaltet, baut Stärke zu Glucose ab.

### III.1.3 Puffersystem

Um einen Einfluss der zugegebenen Proteinmenge auf den *pH*-Wert während der Wechselwirkung mit den *brushes* auszuschließen, wurde die adsorptive (s. Kap. IV.4) und die kovalente Immobilisierung (s. Kap. IV.9) in einem Puffersystem durchgeführt. Dieses sollte einerseits einen geeigneten Pufferbereich aufweisen, andererseits durfte keine störende

Wechselwirkung mit den *brush*-Partikeln auftreten. Damit war der Einsatz mehrwertiger Puffersysteme ausgeschlossen, da bei diesen der osmotische Bereich des *brush* unterdrückt wird (Guo *et al.* 2001).

An dieser Stelle wurde auf MES-Puffer (MES = N-Morpholinoethansulfonsäure) zurückgegriffen, welcher mit Natronlauge auf  $pH$  6,1 eingestellt wurde. Die Pufferlösung wurde in MES-Konzentrationen von 10 mM und 50 mM eingesetzt. Für die Ionenstärke-abhängigen Experimente wurden zusätzlich definierte Mengen an Natriumchlorid zugesetzt. Weiter wurde bei sämtlichen Pufferlösungen eine Natriumazidkonzentration von 2 mM eingestellt, um einem möglichen Mikrobenbefall der Proben vorzubeugen.



**Abb. III.6:** Titration von PS/PAA-Kern-Schale-Latices (*annealed brushes*) unterschiedlicher hydrodynamischer Schalendicke  $L$  in MES-Puffer (geschlossene Symbole) und in NaCl-Lösung (offene Symbole) gleicher Ionenstärke (0,08 M)

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss dieses Puffersystem auf die *brushes* besitzt. Hierzu wurde die *brush*-Dicke  $L$  mittels dynamischer Lichtstreuung in Abhängigkeit des  $pH$ -Werts untersucht. Abbildung III.6 zeigt, dass die Anwesenheit von MES-Molekülen die Dicke des *brush*  $L$  im Vergleich zu Natriumchloridlösungen gleichen  $pH$ -Werts und gleicher Ionenstärke nicht beeinflusst. Im Rahmen des experimentellen Fehlers ergaben sich dabei sowohl bei kurzkettingen, als auch bei langkettigen Systemen keine Unter-

schiede. Diese Beobachtung ist nicht trivial, da mit MES ein zwitterionisches Puffersystem vorliegt. Folglich scheint im Falle einwertiger Ionen der  $pH$ -Wert neben der Ionenstärke die Schalendicke zu bestimmen und nicht die Natur der beteiligten Ionen. Im Umkehrschluss lässt sich die *brush*-Dicke bei bekannter Ionenstärke zur Bestimmung des  $pH$ -Werts im System heranziehen.

### III.1.4 Adsorptive Immobilisierung von Proteinen auf *brushes*

Die Untersuchung der Adsorption von Proteinen auf sowohl aus schwachen (*annealed brush*), wie auch aus starken Polyelektrolyten (*quenched brush*) aufgebauten Polyelektrolytbürsten stand im Vordergrund der vorliegenden Arbeit.

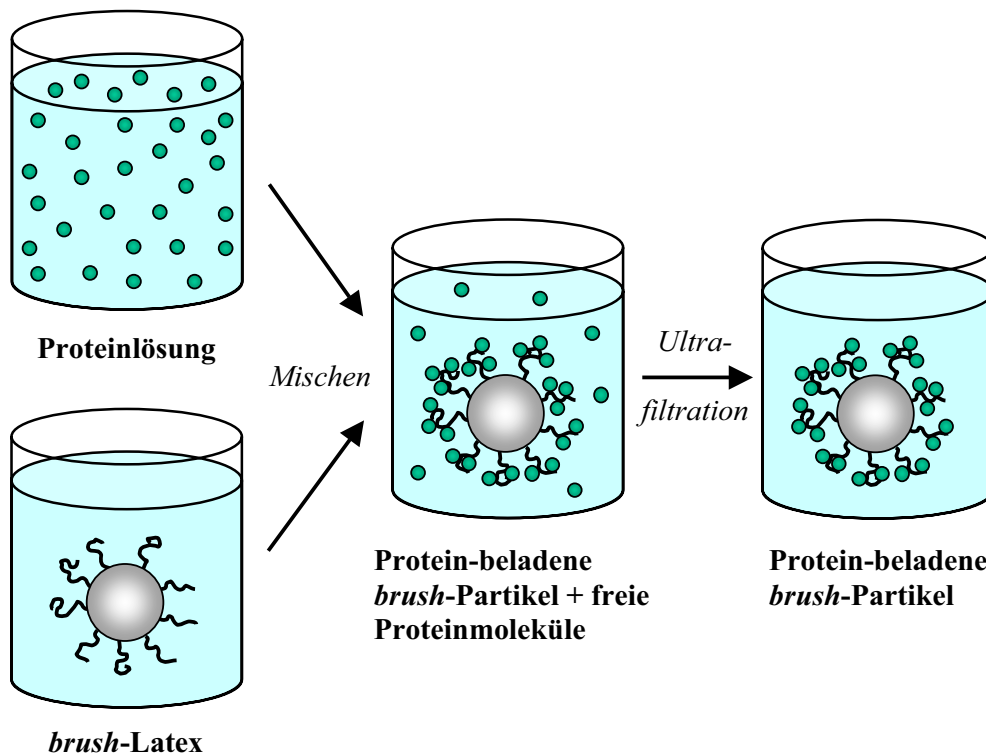
Das experimentelle Vorgehen ist schematisch in Abbildung III.7 dargestellt. Hierbei wurde jeweils eine definierte Proteinmenge von 5 – 200 mg im gewählten Puffermedium gelöst. Nach Zugabe von 100 mg im gleichen Puffermedium suspendierter Latexpartikel wurde die Probe 24 Stunden bei 4°C gerührt. Der Gesamtansatz wurde üblicherweise auf 10 g und damit auf einen Latexpartikelgehalt von einem Gew.-% festgelegt. Zur Abtrennung von freien, nicht-gebundenen Proteinmolekülen wurde die Suspension in Ultrafiltrationszellen (s. Abb. VI.3) überführt. Die Ultrafiltration erfolgte unter achtmaligem Austausch des Dispersionsmediums gegen frische Pufferlösung.

Um möglichst vergleichbare Ergebnisse zu gewährleisten und zeitabhängige Effekte ausschließen zu können, wurden alle Ansätze vor Abtrennung des freien Proteins 24 Stunden lang gerührt. Kontrollexperimente doppelter Dauer zeigten, dass nach einer Zeit von 24 h von einem Maximum des Adsorptionsgrads unter den gewählten Versuchsbedingungen ausgegangen werden kann. Zudem wurden sämtliche Versuche einer Adsorptionsreihe parallel geführt, um unterschiedliche äußere Einflüsse insbesondere Temperaturschwankungen ausschließen zu können (s. VI.2.2).

Die Bestimmung der adsorptiv gebundenen Proteinmenge erfolgte aus der Konzentration des abgetrennten, nicht-gebundenen Proteins. Letztere lässt sich aus der Extinktion bei einer Wellenlänge von 278 nm bestimmen (s. VI.3.7).

Um eine eventuelle Haftung des Proteins auf der Ultrafiltrationsmembrane sowie an den Wänden der Ultrafiltrationszelle ausschließen zu können, wurde eine typische Proteinmenge (80 mg) dem Filtrationsprozess unterzogen und anschließend entsprechend spektroskopisch quantifiziert. Je nach Protein konnten 95 – 98 % im Filtrat nachgewiesen werden. Der Fehlbetrag wurde in den Adsorptionsexperimenten über eine entsprechende Korrektur des Adsorptionsgrads berücksichtigt.





**Abb. III.7:** Schematische Darstellung des Adsorptionsexperiments: Eine gewählte Proteinmenge wurde in einer Pufferlösung mit definierter Ionenstärke und *pH*-Wert gelöst. Zu diesen Lösungen wurden die im gleichen Puffermedium suspendierten *brush*-Partikel zugegeben. Nach 24-stündigem Rühren wurde freies, nicht-adsorbiertes Protein über eine ausgiebige Ultrafiltration entfernt.

Diese Methodik ermöglichte eine genaue Bestimmung des Adsorptionsgrades in Abhängigkeit der zugegebenen Proteinmenge bzw. der Konzentration des nicht-gebundenen Proteins, wie in den folgenden Abschnitten gezeigt wird. Zur Untersuchung der Wechselwirkung der Proteine mit *annealed brushes* wurden die PS/PAA-Kern-Schale-Latices KpS13, KpS14, KpS15 und KpS18 (s. Tab. IV.3) eingesetzt. Die PS/PSS-Kern-Schale-Latices KpSS1 und KpSS2 (s. Tab. IV.3) wurden zu analogen Experimenten an *quenched brushes* herangezogen.

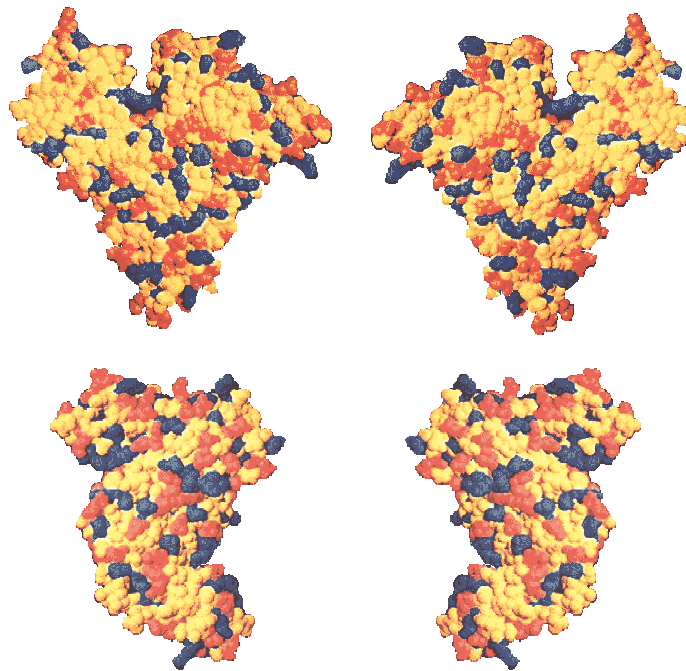
Um das Potential bzw. die Vorzüge von *brushes* gegenüber herkömmlichen industriellen Latexpartikeln zur adsorptiven Proteinimmobilisierung eingehend beurteilen zu können, wurde zusätzlich ein geeignetes Referenzsystem erforderlich. Hierzu wurde ein carboxylierter Polystyrol-Latex (PSAA) über eine Emulsionspolymerisation (s. VI.1.5) mit einem Zusatz von 5 mol% Acrylsäure hergestellt (Bangs Laboratories 1999). Der hierbei erhaltene Latex PSAA wurde aufgrund der elektrostatischen Stabilisierung über das Comonomer den an ihn gestellten Stabilitätsanforderungen bei *pH* 6 - 9 und Ionenstärken unter 510 mM gerecht, ohne die außergewöhnliche Stabilität der *brushes* aufzuweisen. Ein

lediglich durch die Sulfonatgruppen der Initiatorreste stabilisierter Polystyrol-Latex flockte nach einigen Tagen im Puffermedium sowie bei Zugabe größerer Proteinmengen aus. Auf die ursprüngliche avisierte Verwendung dieses System als weiteres Referenzsystem wurde daher verzichtet.

### III.1.5 Triebkräfte der Proteinadsorption auf Polyelektrolytbürsten / *counterion release force*

Erste Adsorptionsversuche ergaben, dass sich BSA-Mengen von über 1000 mg pro Gramm negativ geladener *brushes* binden lassen. Das Auftreten adsorptiv gebundener Proteine in derartigen Mengen ist auf den ersten Blick erstaunlich, da beispielsweise in der Medizin mit Polymerbürsten aus Polyethylenglykol beschichtete Oberflächen gezielt zur Unterdrückung von Proteinadsorption eingesetzt werden (Halperin 1999). Dies ist nach Andrade und de Gennes auf eine sterische Repulsion zwischen Protein und *brush*-Schicht zurückzuführen (Jeon *et al.* 1991). Im Falle anionischer Polyelektrolytbürsten sollte zur sterischen Repulsion noch die elektrostatische Abstoßung zwischen Protein und *brush* hinzukommen, da BSA unter den Versuchsbedingungen bei *pH* 6,1 (s. III.1.3) ebenfalls negativ geladen ist (*pI* = 5,1; Cantarero *et al.* 1980). Zwar besitzt BSA eine negative Überschussladung, doch besteht die Proteinoberfläche aus vielen negativ und positiv geladenen Bereichen, sogenannten *patches*. Unter neutralen Bedingungen überwiegt die Anzahl der negativen *patches* die der positiven nur geringfügig (s. Abb. III.8, Carter *et al.* 1994).

Zur Proteinadsorption auf Polyelektrolytbürsten wurde folgende These aufgestellt: Die Adsorption lässt sich als Wechselwirkung der Polyelektrolytketten des *brush* mit positiv geladenen *patches* des Proteins verstehen. Der *patch* fungiert als Makroion des *brush*, neutralisiert somit einen Teil der negativen Ladung des *brush*. Infolge der Adsorption des *patch* als Makroion werden im Gegenzug zahlreiche Gegenionen des *brush* sowie des Proteins freigesetzt (s. Abb. III.9). Diese können sich frei im System verteilen, was zu einem Entropiegewinn führt und letztendlich die Triebkraft der Adsorption darstellt. Darüber hinaus führt die Freisetzung der Gegenionen zu einem teilweise Abbau des hohen osmotischen Drucks in der Polyelektrolyt-Schicht. Über die geringe osmotische Aktivität eines mehrwertigen Ions im *brush* (Guo *et al.* 2001) lässt sich die starke adsorptive Bindung der Proteine an den *brush* erklären. Die sogenannte „*counterion release force*“ wurde zur Beschreibung der unerwarteten Adsorption von DNA an negativ geladenen Oberflächen herangezogen. Fleck und von Grünberg (2001) haben hierzu ein theoretisches Konzept aufgestellt.

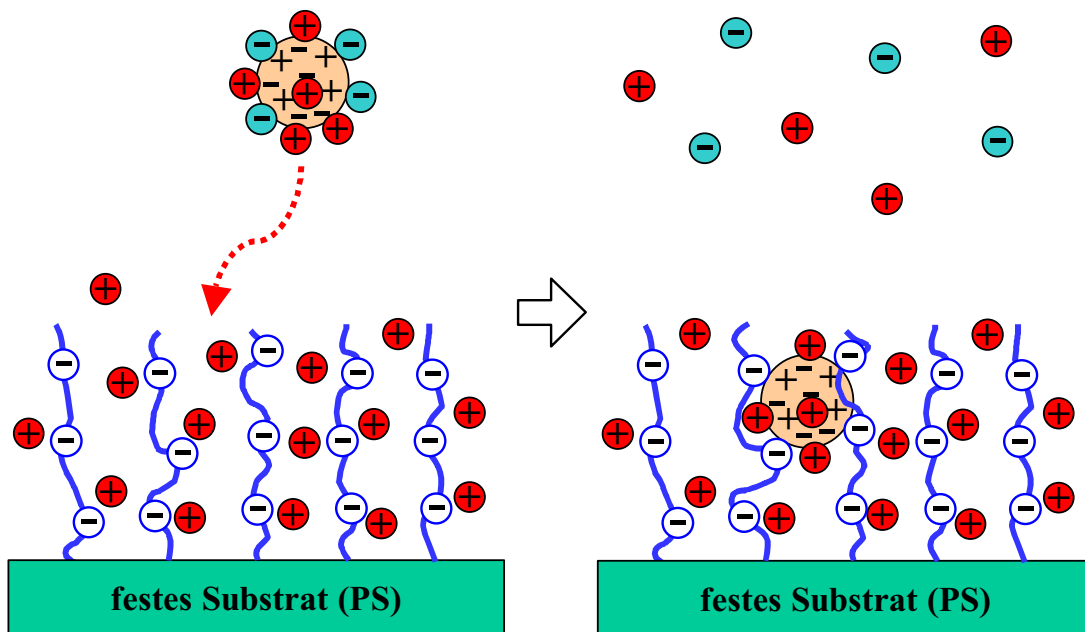


**Abb. III.8:** Oberflächenladungsverteilung eines Albuminmoleküls bei  $pH\ 7$  (oben: Frontalansicht, unten: Seitenansicht, entnommen aus: Carter *et al.* 1994): Die basischen (blau) und die sauren Aminosäurereste (rot) sind relativ gleichmäßig über die Moleküloberfläche verteilt. Die neutralen Reste sind gelb angefärbt dargestellt.

Aufgrund der Tatsache, dass die Gegenionen der Polyelektrolytketten die *brush*-Schicht nicht verlassen können (Das *et al.* 2002), liegt im Falle niedriger äußerer Fremdsalzkonzentration (*osmotic brush*), eine wesentlich höhere Ionenstärke innerhalb des *brush* vor (vgl. Abb. III.1). Bei Protonen als Gegenionen der Polyelektrolytketten sollte somit ein niedrigerer  $pH$ -Wert innerhalb des *brush* im Vergleich zu den äußeren Verhältnissen resultieren. Dies lässt sich am besten anhand von *quenched brush*-Systemen erläutern. Hier ist der Ladungsgrad entlang den Polyelektrolytketten unabhängig vom  $pH$ -Wert. Die in Lösung vorhandenen Protonen fungieren als Gegenionen, wobei deren Konzentration außerhalb des *brush*  $c_a$  über die Pufferlösung eingestellt wurde. Der  $pH$ -Wert im *brush* ergibt sich aus der mittleren Aktivität der Gegenionen innerhalb des *brush*. Somit ist der  $pH$ -Wert in der *brush*-Schicht gegenüber der äußeren Lösung im Falle eines *quenched brush* erniedrigt. Dieser Effekt wurde von Birshtein und Zhulina detailliert theoretisch beschrieben (Birshtein *et al.* 1996).

Im Falle von *annealed brushes* aus Polyacrylsäureketten muss zusätzlich das Dissoziationsgleichgewicht zwischen Carboxylgruppen und Protonen in Betracht gezogen werden. Somit wird die Protonenkonzentration im Vergleich zum *quenched brush* er-

niedrigt, hängt aber wiederum von der äußeren Protonenkonzentration  $c_a$  ab. Die Verhältnisse im *brush* können als *pH*-Wert einer Lösung freier Polyacrylsäureketten gleicher Konzentration wie in der *brush*-Schicht angenähert werden. Ausgehend vom  $pK_a$ -Wert für Polyacrylsäure von 4,6 und einer typischen Polyelektrolytkonzentration im *brush* ergibt sich ein *pH*-Wert von 3. In einer realistischen Schätzung sollte jedoch angenommen werden, dass die Hälfte der Protonen durch die Natriumionen der Pufferlösung ausgetauscht wurde, wodurch ein *pH*-Wert von 4,6 resultiert.



**Abb. III.9:** Schematische Darstellung der Proteinadsorption auf Polyelektrolytbürsten: Die anionischen Polyelektrolytketten sind aufgrund des osmotischen Drucks der Gegenionen stark gestreckt, da letztere die Polyelektrolytschicht nicht verlassen können (links). Positiv geladene Bereiche auf der Oberfläche des insgesamt negativ geladenen, adsorbierten Proteinmoleküls treten an Stelle der monovalenten Gegenionen der Polyelektrolytketten. Im Gegenzug werden mehrere Gegenionen des Proteins und der Polyelektrolytketten pro Proteinmolekül freigesetzt (rechts), wodurch ein erheblicher Entropiegewinn resultiert.

Der niedrigere *pH*-Wert innerhalb des *brush* sollte die Oberflächenladungsverteilung des Proteins zugunsten einer zunehmenden Zahl bzw. Größe der positiven *patches* des Proteins beeinflussen. Das bei *pH* 6,1 negativ geladene Protein könnte somit sogar eine positive Überschussladung innerhalb der negativ geladenen Polyelektrolytschale aufweisen. Die eigentliche Treibkraft stellt allerdings die „*counterion release force*“ dar, da elektrostatische Wechselwirkungen aufgrund der hohen Ionenstärke im *brush* von bis 0,1 M (s. Abb. III.1) nur eine untergeordnete Rolle spielen können.

Neben den bisher skizzierten möglichen Triebkräften der Proteinadsorption könnten zusätzlich Konformationsänderungen eine Rolle spielen. Ceslik *et al.* (2001) stellten fest, dass es bei der Adsorption von Proteinen auf Silikapartikeln zu einer partiellen Entfaltung des Proteins kommt, welche mit einem starken Entropiegewinn verbunden ist und die treibende Kraft der Adsorption darstellt. Im Falle der Einbettung von Proteinen in eine Matrix alternierender Schichten anionischer und kationischer Polyelektrolyten wurde hingegen ein Erhalt der Konformation beobachtet (Schwinté *et al.* 2001, 2002, Szyk *et al.* 2001, Müller *et al.* 2001).

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die obigen Thesen experimentell durch systematische Untersuchung der Proteinadsorption (s. Kap. IV.4) zu überprüfen. Insbesondere galt die Frage zu klären, ob Konformationsänderungen des Proteins bei der Einbettung in den *brush* einen entscheidenden Einfluss haben (s. Kap. IV.6).

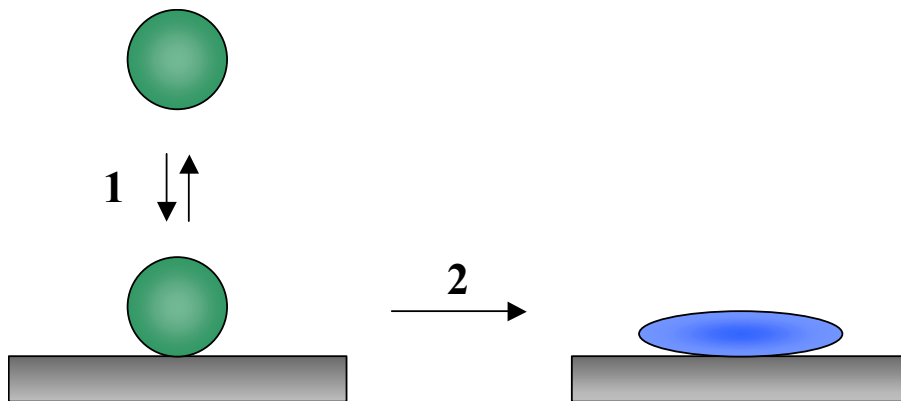
### III.1.6 Theoretische Beschreibung der Proteinadsorption

In zahlreichen Studien zur Proteinadsorption wurden zur Beschreibung des Adsorptionsgrads als Funktion der Konzentration an freiem, nicht-gebundenen Protein verschiedene Isothermenmodelle herangezogen: In zahlreichen Fällen lieferte die Langmuir-Gleichung (Wedler 1987) eine ausgezeichnete Beschreibung der experimentellen Daten. Als Adsorbens lagen hierbei Polystyrol-Latices (Lewis *et al.* 1988), Polymer-modifizierte Oberflächen (Rovira-Bru *et al.* 2001, Tong, Xue, Sun 2001, Mahltig *et al.* 2001, Tanaka *et al.* 2001, Bajpai *et al.* 2001, Hunter *et al.* 2001, Azioune *et al.* 2002) neben anderen Substraten (Iwata *et al.* 1991, Geluk *et al.* 1992, Chatterjee *et al.* 2000, Tong, Sun 2001) vor. In weiteren Arbeiten wurden modifizierte Langmuir-Gleichungen verwendet (Bowen *et al.* 1993, Schaaf *et al.* 2000, Wertz *et al.* 2002). Dalmia *et al.* (1991) ergänzten das Langmuir-Gleichung beispielsweise um einen linear mit der Konzentration des freien Proteins skalierenden Term. Einen linearen Anstieg des Adsorptionsgrads bei hoher Proteinkonzentration konnte experimentell ebenfalls von Lee *et al.* festgestellt werden (1987). Al-Duri *et al.* (2000) griffen auf drei verschiedene Isothermenmodelle zurück: So wurde die Langmuir-Isotherme, die Redlich-Peterson-Isotherme, eine modifizierte Langmuir-Isotherme sowie die Freundlich-Isotherme verwendet. Die Wechselwirkung von Albumin mit Zellulose konnte ebenfalls mit einer Freundlich-Isotherme beschrieben werden (Kotelnikova *et al.* 2001).

Im Falle elektrostatisch stabilisierter Polymerlatices haben Kim *et al.* in einer Reihe von Studien (Yoon *et al.* 1996, 1999, Lee *et al.* 1998, Oh *et al.* 2000, Choi *et al.* 2000, Kim *et al.* 2002) die Adsorption der auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Proteine

Albumin, Hämoglobin sowie Glucoamylase (s. III.1.2) auf carboxylierten bzw. sulfonierten Polystyrol-Latices untersucht. Diese Polymerpartikel können in ihrer Morphologie mit kurzkettingen *brushes* verglichen werden. Die Adsorption ließ sich hier in Form von Langmuir-Freundlich-Isothermen (s. Glg. 3-12), einem Zweiparameter-Modell, erfassen.

Experimentell konnten ebenfalls Adsorptionsisothermen beobachtet werden, bei denen ab einem Schwellenwert der Proteinkonzentration ein erneuter Anstieg des Adsorptionsgrads auftritt. Hierbei wurde ein zweites Plateau des Adsorptionsgrads erreicht, welches die Maximalmenge an adsorbiertem Protein angibt. Zurückgeführt wurde dieser Effekt zum einen auf das Auftreten von Mehrschichtadsorption (Reynaud *et al.* 1986, Inbar *et al.* 1976), aber auch auf strukturelle Umordnungen insbesondere kompakter Proteinmoleküle (Norde *et al.* 1978, 1986, Shirahama *et al.* 1985, 1989, 1991, Suzawa *et al.* 1982, 1983, 1991) sowie auf die Ausbildung einer zweidimensionalen Oberflächenphase, vergleichbar einer Kondensation der Proteinmoleküle (Reynaud *et al.* 1986, Al-Duri *et al.* 2000).



**Abb. III.10:** Zweistufenmechanismus der irreversiblen Adsorption von Proteinmolekülen (Krisdhasima *et al.* 1993): Zunächst stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption ein (Schritt 1). Erst in einem zweiten langsameren Prozess erfolgt eine dauerhafte Anbindung an das Substrat (Schritt 2), welche entweder durch eine Konformationsänderung oder durch das Ausbilden mehrerer Bindungsstellen zum Substrat bewirkt wird.

Obwohl die gewählten Modelle die Proteinadsorption teilweise ausgezeichnet beschreiben, sind die den Modellen zugrunde liegenden Annahmen oft nicht erfüllt (Norde *et al.* 1978, 1986, 1992, 1995). Insbesondere liegt bei der Proteinadsorption kein reversibles Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption vor. Das freie, nicht-adsorbierte Protein wird zur Bestimmung des Adsorptionsgrads abgetrennt. Bei Vorliegen eines dynamischen Gleichgewichts müsste damit eine vollständige Desorption des Proteins einhergehen. Zudem beschränkt sich die Adsorption meist nicht auf bevorzugte Plätze auf der Oberfläche des Adsorbens. Ferner finden laterale Wechselwirkungen zwischen den Proteinen

sowie eventuelle adsorptionsbedingte Konformationsänderungen der Proteine keine Berücksichtigung in den Adsorptionsmodellen.

Man kann die Proteinadsorption aber auch als einen Zweistufenprozess (Krisdhasima *et al.* 1993) betrachten, bei dem das Protein zunächst mit einer recht kurzen Kontaktzeit reversibel an das Substrat adsorbiert, wobei es seine native Konformation weitgehend behält. In einem zweiten, langsameren Prozess wird das Proteinmolekül irreversibel an das Substrat, beispielsweise durch Teilentfaltung des Proteins oder durch Mehrstellenwechselwirkung mit dem Adsorbens gebunden (s. Abb. III.10). Somit würde der zweite Schritt einem „Einfrieren“ des Adsorptions-/Desorptionsgleichgewichts des ersten Schritts entsprechen und erklären, wieso sich die Ergebnisse der aufgeführten Studien mittels Isothermenmodellen beschreiben lassen.

Bei der Proteinadsorption auf den hier untersuchten sphärischen Polyelektrolytbürsten handelt es sich um keine Adsorption auf einer festen Substratoberfläche, da die Proteinmoleküle aufgrund der hohen Packungsdichte der Polyelektrolytketten nicht in direkten Kontakt mit dem Polystyrol-Kern treten können. Die Proteine adsorbieren vielmehr in mehreren Schichten innerhalb der Polyelektrolytschale, wie in Kapitel IV.8 experimentell mittels Röntgenkleinwinkelstreuung gezeigt werden konnte.

Proteine im Inneren des *brush* sollten eine stärkere Wechselwirkung mit den Polyelektrolytketten aufweisen, d. h. mehr Kontaktstellen ausbilden, als Proteine in der Peripherie der Schale. Demnach sollte ein Adsorptionsmodell auf Basis einer Monoschichtbelegung einer Substratoberfläche wenig geeignet zur Beschreibung der Proteinadsorption auf *brushes* sein. Brunauer, Emmet und Teller haben die nach den Autoren benannte BET-Theorie zur Beschreibung der Adsorption von Gasen an porösen Oberflächen entwickelt (Brunauer *et al.* 1938). In diesem Modell wird berücksichtigt, dass eine erste adsorbierte Schicht als mögliches Substrat für weitere Adsorption, beispielsweise durch Physisorption, dienen kann. Somit wurde ein Adsorptionsmodell vorgestellt, welches Mehrschichtenadsorption einbezieht. Es wird dabei angenommen, dass eine homogene Oberfläche des Substrats vorliegt und die Teilchen der ersten Schicht an bestimmte Plätze der Oberfläche gebunden sind. Jedes adsorbierte Teilchen der ersten Schicht kann als Substrat für Teilchen der zweiten Schicht dienen usw. Zwischen den Teilchen werden keine horizontalen Wechselwirkungen angenommen. Teilchen der zweiten sowie höheren Schichten verhalten sich wie in einer Flüssigkeit und besitzen somit eine Energie, die der Kondensationsenthalpie entspricht. Teilchen der ersten Schicht weisen hingegen eine davon verschiedene Energie auf. Weiterhin wird eine statistische Verteilung der unbesetzten, einfach oder mehrfach besetzten Bereiche auf der Oberfläche angenommen.

Die BET-Theorie beschreibt einen Adsorptionsvorgang im dynamischen Gleichgewicht, d. h. nach Gleichgewichtseinstellung adsorbieren gerade so viele Moleküle wie auch wieder desorbiert werden. Im vorliegenden Fall der Proteinadsorption auf sphärischen

Polyelektrolytbürsten handelt es sich jedoch um keinen Gleichgewichtsvorgang. Das Protein ist unter den Versuchsbedingungen auf der Oberfläche fixiert und kann auch durch mehrtägige Ultrafiltration gegen frische Pufferlösung nicht wieder desorbiert werden. Bei den in Kapitel IV.4 vorgestellten Adsorptionsisothermen ist die irreversibel adsorbierte Proteinmenge gegen die freie, nicht-adsorbierte Proteinmenge in Lösung aufgetragen. Zur Beschreibung dieser Isothermen wurde ein Modell gewählt, welches zwar wie die BET-Theorie auf der Adsorption von unabhängigen Teilchenstapeln basiert, aber auf keiner Gleichgewichtsüberlegung beruht.

Bei der Ableitung des Modells wird ein Ausschnitt aus der Oberfläche betrachtet, indem einfache und mehrfache Belegung auftreten.  $N_i$  bezeichnet die Anzahl der Adsorptionsplätze, die  $i$  Schichten tragen. Die Anzahl adsorbierter Proteine innerhalb einer Schicht ist proportional zur Anzahl der zur Verfügung stehenden Adsorptionsplätze  $N_{i-1}$ .

$$N_i \sim N_{i-1} \quad (3-1)$$

$N_i$ : Anzahl Adsorptionsplätze mit  $i$  Schichten  
 $N_{i-1}$ : Anzahl Adsorptionsplätze mit  $i - 1$  Schichten

Je mehr Protein in Lösung vorliegt, um so höher ist die Wahrscheinlichkeit der Adsorption eines Proteinmoleküls. Die Adsorptionswahrscheinlichkeit ergibt sich somit als Produkt der Konzentration des gelösten Proteins  $c_{sol}$  und einer Konstante  $w_{ads}$ , in welcher die Affinität des Proteins zum Substrat Ausdruck findet. Zur Vereinfachung wird angenommen, dass ab der zweiten Schicht eine gleich hohe Adsorptionswahrscheinlichkeit  $w_{ads} c_{sol}$  für alle Schichten vorliegt. Lediglich für die erste Schicht wird eine höhere Adsorptionswahrscheinlichkeit  $z w_{ads} c_{sol}$  ( $z > 1$ ;  $0 \leq z w_{ads} c_{sol} \leq 1$ ) angenommen. Hier soll die direkte Wechselwirkung zwischen Substrat und Protein Berücksichtigung finden. Somit ergibt sich für die Anzahl der einfach besetzten Plätze aus der Adsorptionswahrscheinlichkeit  $z w_{ads} c_{sol}$  und der Zahl der vorhandenen Adsorptionsplätze  $N_0$ :

$$N_1 = z w_{ads} c_{sol} N_0 \quad (3-2)$$

bzw.

$$N_i = z (w_{ads} c_{sol})^i N_0 \quad (3-3)$$

$N_i$ : Anzahl Adsorptionsplätze mit  $i$  Schichten  
 $N_0$ : Anzahl vorhandener Adsorptionsplätze  
 $c_{sol}$ : Konzentration an freiem Protein in Lösung  
 $w_{ads}, z$ : Adsorptionsparameter

für die  $i$ -fach ( $i = 2, 3, \dots$ ) besetzten Plätze. Die Gesamtmasse an adsorbiertem Protein  $\tau_{ads}$  ist proportional zur Anzahl der adsorbierten Proteinmoleküle:



$$\tau_{ads} \sim \sum_{i=1}^{\infty} i N_i \quad (3-4)$$

Die Masse  $\tau_{ads, M}$ , welche im Modell einer Monoschichtbelegung entspricht, ist proportional zur Anzahl der Teilchenstapel an der Substratoberfläche (s. Abb. 1):

$$\tau_{ads, M} \sim \sum_{i=0}^{\infty} N_i \quad (3-5)$$

Damit ergibt sich:

$$\frac{\tau_{ads}}{\tau_{ads, M}} = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} i N_i}{\sum_{i=0}^{\infty} N_i} = z N_0 \frac{\sum_{i=1}^{\infty} i (w_{ads} c_{sol})^i}{N_0 + z N_0 \sum_{i=1}^{\infty} (w_{ads} c_{sol})^i} \quad (3-6)$$

Nach Umformung unter Verwendung der Formeln

$$\sum_{i=1}^{\infty} y^i = \frac{y}{1-y} \quad \text{und} \quad \sum_{i=1}^{\infty} i y^i = \frac{y}{(1-y)^2} \quad \text{mit } y = w_{ads} c_{sol}$$

erhält man:

$$\frac{\tau_{ads}}{\tau_{ads, M}} = \frac{z w_{ads} c_{sol}}{(1 - w_{ads} c_{sol})(1 - w_{ads} c_{sol} + z w_{ads} c_{sol})} \quad (3-7)$$

- $\tau_{ads}$ : Masse an adsorbiertem Protein pro Gramm Latexpartikel
- $\tau_{ads, M}$ : Masse an adsorbiertem Protein pro Gramm Latexpartikel, welche einer Monoschichtbelegung der Modelloberfläche entspricht
- $c_{sol}$ : Konzentration an freiem Protein in Lösung
- $w_{ads}, z$ : Adsorptionsparameter

Übertragen auf die Proteinadsorption in *brushes* ist das Modell unabhängiger Teilchenstapel wie folgt zu verstehen: Aufgrund der radial nach außen abnehmenden Segmentdichte der Polyelektrolytketten innerhalb des *brush* weisen Proteine im Inneren des *brush* eine stärkere Wechselwirkung mit den Polymerketten auf als Proteinmoleküle in der Peripherie des *brush*. Die im Modell angenommene Oberfläche ist somit als die Anzahl der Adsorptionsplätze zu verstehen, an denen die Proteine zahlreiche Kontakte zu den Polyelektrolytketten ausbilden können und somit eine höhere Adsorptionsenergie aufweisen als in den äußeren Bereichen des *brush*. Die radial nach außen abnehmende Polymerdichte des *brush* kommt in den einzelnen Schichten in der Modellbetrachtung zum Ausdruck. Dies ist

im Einklang mit der dem Modell zugrundeliegenden Annahme, dass die Proteine der ersten Schicht an bevorzugte Plätze gebunden sind. Gemittelt über die große Anzahl der zur Verfügung stehenden Adsorptionsplätze (s. Kap. IV.4), können diese Plätze auch als quasi-homogen angenommen werden. Das Fehlen lateraler Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen sollte ebenfalls durch die Separation der Proteinmoleküle über die Polyelektrolytketten erfüllt sein. Die radial nach außen hin abnehmende Packungsdichte der Polyelektrolytketten sowie deren Polydispersität erklären zudem, warum die Teilchen der äußeren Schichten eine geringere Adsorptionsenergie aufweisen. Ein weiterer Kritikpunkt war, dass eventuell auftretende Konformationsänderungen im Modell nicht erfasst werden. Der Frage, inwieweit Konformationsänderungen bei der Proteinadsorption auf *brushes* eine Rolle spielen, wird in Kapitel IV.6 nachgegangen werden.

Durch Fit-Anpassung der experimentellen Werte für  $\tau_{ads}$  als Funktion von  $c_{sol}$  nach Formel 3-7 sind die Modellparameter  $\tau_{ads, M}$ ,  $z$  sowie  $w_{ads}$  zugänglich.  $\tau_{ads, M}$  entspricht im Modell einer Monoschichtbelegung der Substratoberfläche. Im Falle der Proteinadsorption an sphärischen Polyelektrolytbürsten kann man aber nicht von Monoschichtbelegung sprechen. In diesem Zusammenhang ist, wie schon angesprochen, die maximal mögliche Belegung an Proteinen zu verstehen, welche über mehrere Polyelektrolytketten mit dem Substrat wechselwirken können und somit eine höhere Adsorptionsenergie aufweisen als die übrigen in der Peripherie des *brush* adsorbierten Proteine. Aus  $\tau_{ads, M}$  lässt sich das zur Proteinadsorption im *brush* zur Verfügung stehende spezifische Volumen  $V$  berechnen:

$$V = N_A \tau_{ads, M} \frac{V_{prot}}{M_{prot}} \quad (3-8)$$

$V_{prot}$ : hydrodynamisches Volumen eines Proteinmoleküls  
 $M_{prot}$ : Molmasse des Proteins  
 $N_A$ : Avogadro-Konstante ( $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )

$z$  ist ein Maß für die Energiedifferenz der direkt an das Substrat gebundenen Proteine zu den übrigen gebundenen Proteinmolekülen:

$$z \sim \exp\left(\frac{E_1 - E_n}{R T}\right) \quad (3-9)$$

$E_1$ : mittlere Adsorptionsenergie der über mehrere Polyelektrolytketten gebundenen Proteine  
 $E_n$ : mittlere Adsorptionsenergie der übrigen Proteine  
 $R$ : Gaskonstante ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )  
 $T$ : Temperatur

Da die über mehrere Polyelektrolytketten mit dem Substrat wechselwirkenden Proteine eine höhere Adsorptionsenergie aufweisen, ist  $z$  größer als 1.

Bisher wurde angenommen, dass die Adsorptionswärme unabhängig vom Belegungsgrad an Protein ist. In Anlehnung an die Freundlich-Isotherme kann dem durch Substitution von  $c_{sol}$  durch  $c_{sol}^{1/n}$  Rechnung getragen werden (Wedler 1987). Hierbei wird von einer logarithmischen Abnahme der Adsorptionswärme mit der Belegung ausgegangen, welche in der empirischen Konstante  $n$  Ausdruck findet. Somit ergibt sich:

$$\frac{\tau_{ads}}{\tau_{ads, M}} = \frac{z W_{ads} c_{sol}^{1/n}}{(1 - W_{ads} c_{sol}^{1/n})(1 - W_{ads} c_{sol}^{1/n} + z W_{ads} c_{sol}^{1/n})} \quad (3-10)$$

Eine derartige Modifizierung von Gleichung 3-7 war insbesondere zur Beschreibung der Adsorption von Ribonuklease A erforderlich (s. Abb. IV.26), welche als besonders kompaktes Proteinmolekül gilt (Baron *et al.* 1999, Servagent-Noinville *et al.* 2000), während im Falle von BSA als strukturell adaptivem Molekül (Carter *et al.* 1994) eine derartige Erweiterung der Gleichung nicht erforderlich war (s. Abb. IV.4).

Führt man die obige Ableitung für eine Schicht ( $i = 1$ ) durch, d. h. man schließt Mehrfachbelegung von Protein aus, ergibt sich aus Gleichung 3-6:

$$\frac{\tau_{ads}}{\tau_{ads, M}} = \frac{N_1}{N_0 + N_1} = \frac{z W_{ads} c_{sol}}{1 + z W_{ads} c_{sol}} \quad (3-11)$$

Bei Substitution von  $z w_{ads} = K$  ergibt sich somit die Langmuir-Isotherme (Wedler *et al.* 1987):

$$\frac{\tau_{ads}}{\tau_{ads, M}} = \frac{K c_{sol}}{1 + K c_{sol}} \quad (3-12)$$

bzw. bei erneuter Substitution von  $c_{sol}$  durch  $c_{sol}^{1/n}$  die Langmuir-Freundlich-Isotherme (Oh *et al.* 2000):

$$\frac{\tau_{ads}}{\tau_{ads, M}} = \frac{K c_{sol}^{1/n}}{1 + K c_{sol}^{1/n}} \quad (3-13)$$

Somit sind die Langmuir-, die Langmuir-Freundlich- sowie die BET-Isotherme in Gleichung 3-10 als Grenzfälle enthalten. Mit dieser Gleichung war die Beschreibung der Adsorption von sowohl flexiblen, als auch kompakten Proteinmolekülen auf *brushes* unterschiedlicher Morphologie möglich, wie die Untersuchungen in Kapitel IV.4 zeigen.

## III.2 Messmethoden

### III.2.1 Sekundärstrukturanalyse von Proteinen

#### *FT-Infrarotspektroskopie*

Proteine besitzen mehrere charakteristische IR-Absorptionsbanden, welche auf Schwingungen des Polypeptidgerüsts beruhen. Tabelle III.1 gibt Auskunft über die wichtigsten dieser Banden.

Die hinsichtlich einer Sekundärstrukturanalyse aussagekräftigste Bande stellt die Amid-I-Bande dar, welche hauptsächlich auf die C=O-Streckschwingung neben geringeren Beiträgen der C–N-Streck- sowie der C–C–N-Deformationsschwingung zurückzuführen ist. Die Frequenzlage und Form der Bande hängen von der Sekundärstruktur des Proteins ab. Dies ist damit zu erklären, dass die C=O- und N–H-Gruppen der Proteine über Wasserstoffbrückenbindungen unmittelbar in die Ausbildung der  $\alpha$ -Helix sowie der  $\beta$ -Faltblatt-Struktur involviert sind. Somit kann das Peptidrückgrat als eine Reihe gekoppelter Oszillatoren angesehen werden. Tabelle III.2 zeigt die den einzelnen Strukturelementen zugehörigen Wellenzahlbereiche innerhalb der Amid-I-Bande. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung III.11 die FT-IR-Spektren des  $\alpha$ -Helix-reichen Proteins Hämoglobin sowie des  $\beta$ -Faltblatt-reichen Proteins Concanavalin im Bereich der Amid-I-/II-Region aufgetragen.

**Tab. III.1:** Zuordnung ausgewählter Amid-Schwingungsbanden von Proteinen (entnommen aus: Winter, R.; Noll, F.; *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, B. G. Teubner Stuttgart, 1998.)

Name	Wellenzahl [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Gruppenschwingung
Amid-A	3250 - 3300	N-H-Streckschwingung in Resonanz mit Amid-II-Oberton
Amid-I	1600 - 1700	im wesentlichen C=O-Streckschwingung
Amid-II	1480 - 1575	N-H-Biege-/C–N-Streckschwingung
Amid-III	1230 - 1330	N-H-Biege-/C–N-Streckschwingung
Amid-IV	625 - 770	im wesentlichen O=C–N-Streckschwingung

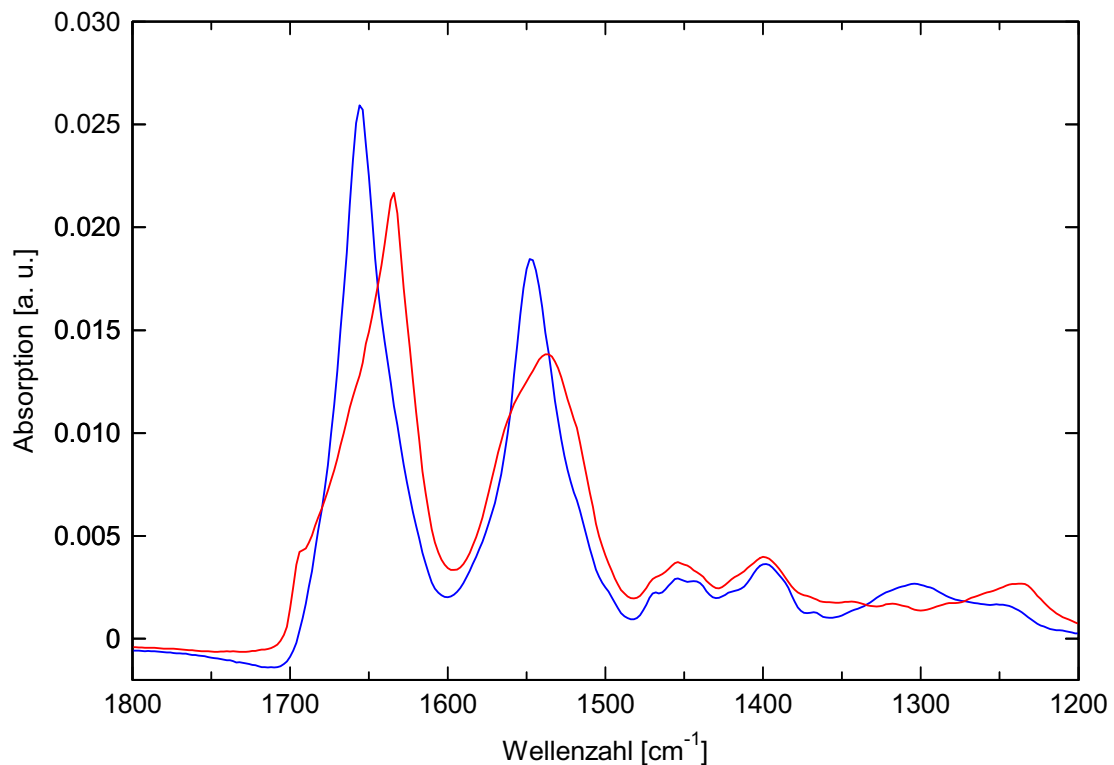
In den letzten zehn Jahren wurden auf dem Gebiet der Sekundärstrukturanalyse mittels Fourier-Transform-IR-Spektroskopie (FT-IR) beträchtliche Fortschritte erzielt. Neben Messungen in Transmissionstechnik (Dousseau *et al.* 1990, Surewicz *et al.* 1993, Rahmelow *et al.* 1996, Fabian *et al.* 2000) wurde ebenfalls die Methode der „Attenuated Total Reflection“ (ATR), der abgeschwächten Totalreflexion (Oberget *et al.* 1998) eingesetzt.

Die überwiegende Zahl der FT-IR-Studien an Proteinen wurde in D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel durchgeführt, um die hohe Absorption von Wasser im Bereich der Amid-I-Bande der Proteine zu umgehen. Die hohe Sensitivität moderner Spektrometer verbunden mit den Fortschritten, welche im Bereich der Datenanalyse erreicht wurden, lassen heutzutage ebenfalls ausgezeichnete Messungen in H<sub>2</sub>O zu. Zudem bringt der Einsatz von D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel neben dem angesprochenen Vorteil einige Nachteile mit sich: So erschwert sich zum einen die Analyse der Amid-I'-Bande bei unvollständigem Deuteriumaustausch (Fabian *et al.* 2000, Kalnin *et al.* 1990). Zum anderen wurden Veränderungen des Proteins im Vergleich zum nativen Zustand festgestellt (Kalnin *et al.* 1990). Für Messungen in H<sub>2</sub>O sind kleine Schichtdicken von 6 µm erforderlich, um eine Totalabsorption durch das Wasser auszuschließen (Fabian *et al.* 2000). Ein quantitativer Abzug des H<sub>2</sub>O-Spektrums von den Transmissions- bzw. Reflektionsspektren ist in diesem Fall möglich (Dousseau *et al.* 1990, Surewicz *et al.* 1993, Rahmelow *et al.* 1996, Fabian *et al.* 2000). Infolge der geringen Schichtdicke der Probe sind relativ hohe Proteinkonzentrationen (> 5 mg/ml) erforderlich.

**Tab. III.2:** Wellenzahlbereiche verschiedener Proteinkonformationen innerhalb der Amid-I-Bande (entnommen aus: Winter, R.; Noll, F.; *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, B. G. Teubner Stuttgart, 1998.)

Wellenzahl [cm <sup>-1</sup> ]	Zuordnung
1620 - 1640	β-Faltblatt
1640 - 1650	ungeordnete Strukturen
1650 - 1658	α-Helix
1660 - 1690	Schleifen
1670 - 1680	β-Faltblatt

Mehrere Übersichtsarbeiten über die Ableitung der Strukturinformation aus IR-Spektren wurden in jüngster Zeit veröffentlicht (Dousseau *et al.* 1990, Surewicz *et al.* 1993, Rahmelow *et al.* 1996, Fabian *et al.* 2000). Üblicherweise wird die Sekundärstruktur aus der Amid-I-Bande abgeleitet (Winter *et al.* 1998). In einigen Fällen wird auch die Amid-II-Bande miteinbezogen (Dousseau *et al.* 1990). Zwei unterschiedliche Strategien haben sich dabei herausgebildet: Zum einen wird durch Fourierentfaltung (*Fourier deconvolution*) die Breite der sich überlappenden IR-Banden in der Amid-I-Region verringert, so dass die einzelnen Strukturkomponenten ersichtlich werden (*band narrowing* oder *resolution enhancement*). Derselbe Effekt lässt sich auch über mehrmalige Ableitung der Spektren erzielen. Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode, dass sich dabei das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verschlechtert (Surewicz *et al.* 1993). Zudem wird bei der Bandenanalyse von gleichgroßen Extinktionskoeffizienten der einzelnen Strukturelemente ausgegangen.



**Abb. III.11:** Infrarotspektren des helixreichen Proteins Hämoglobin (blau: 67,1 – 68,8 %  $\alpha$ -Helix, 0 %  $\beta$ -Faltblatt) sowie des faltblattreichen Proteins Concanavalin A (rot: 0,9 %  $\alpha$ -Helix, 46,2 %  $\beta$ -Faltblatt laut PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>)

Der zweite Ansatz beruht auf der Formerkennung der Bande. Diese Technik basiert auf einer Kalibrationsmatrix von Infrarotspektren von Proteinen bekannter Sekundärstruktur. Üblicherweise wird die Strukturinformation der Referenzproteine einer Proteindatenbank entnommen, welche Röntgenstrukturdaten der Proteine enthält. Die sogenannte PLS-Methode (*partial least-squares*, Haaland *et al.* 1988, Geladi *et al.* 1986) hat sich gegenüber der klassischen Methode der „kleinsten Fehlerquadrate“ (*least-squares*, CLS) durchgesetzt, da diese Methode nur eine Matrixinversion erfordert und zudem Arbeitsvektoren enthält, welche Linearkombinationen der Kalibrationsmatrix sind (Dousseau *et al.* 1990). Ferner kann die Zahl der analysierten Strukturelemente kleiner gehalten werden als die Gesamtzahl der im Protein enthaltenen Merkmale, sofern die Datenbank zu jedem Element Referenzproteine unterschiedlicher Strukturanteile bereithält. In diesem Fall lässt sich jedes Element voneinander unabhängig bestimmen. Nach Dousseau und Pézolet (1990) liefert die PLS-Methode die genauesten Resultate, wenn sowohl die Amid-I-, als auch die Amid-II-Bande zur Analyse herangezogen werden und unter der Annahme, dass sich die Sekundärstruktur ausschließlich aus folgenden vier Strukturelementen zusammensetzt:

geordnete Helix, „ungeordnete“ Helix,  $\beta$ -Faltblatt sowie undefinierte Konformationsanteile, welche die verbliebenen Strukturanteile beinhalten. Korrelation der Röntgenstrukturdaten mit den IR-Resultaten ergab in diesem Falle einen Absolutfehler von 4,8 % für den  $\alpha$ -Helixgehalt, 3,7 % für den  $\beta$ -Faltblattanteil sowie 5,1 % für den Anteil undefinierter Strukturbereiche.

### *CD-Spektroskopie*

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Sekundärstruktur von Proteinen ist die Circular dichroismus(CD)-Spektroskopie, welche eine Variante der Absorptionsspektroskopie im UV- und VIS-Bereich des Spektrums darstellt. Der Effekt des Circular dichroismus (CD) beruht darauf, dass sich die Extinktionskoeffizienten für links und rechts zirkular polarisiertes Licht bei optisch aktiven Probesubstanzen unterscheiden. Im Falle von Proteinen ermöglicht die optische Aktivität aufgrund der Kopplung der einzelnen Chromophore innerhalb der einzelnen Strukturbereiche einen Zugang zur Sekundärstruktur der Proteine. Messgröße der CD-Spektroskopie ist die sogenannte Elliptizität  $\theta_\lambda$ , welche wie folgt definiert ist (Winter *et al.* 1998):

$$\tan \theta_\lambda = \frac{I_R - I_L}{I_R + I_L} \quad (3-14)$$

- $\theta_\lambda$ : Elliptizität
- $I_R$ : Intensität des rechts zirkular polarisierten Lichts
- $I_L$ : Intensität des links zirkular polarisierten Lichts

Die Intensitäten sind über das Lambert-Beer-Gesetz (s. VI.3.7) mit den Extinktionskoeffizienten verknüpft. Formt man die obige Definitionsgleichung entsprechend um, ergibt sich näherungsweise für kleine Elliptizitäten:

$$\theta_\lambda = \ln 10 \frac{180^\circ}{4\pi} (\varepsilon_L(\lambda) - \varepsilon_R(\lambda)) c_m d \quad (3-15)$$

- $\theta_\lambda$ : Elliptizität
- $\varepsilon_R(\lambda)$ : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des rechts zirkular polarisierten Lichts
- $\varepsilon_L(\lambda)$ : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des links zirkular polarisierten Lichts
- $c_m$ : Konzentration des Chromophors in  $\text{g cm}^{-3}$
- $d$ : Weglänge des Lichts durch die Probe in dm

Die Differenz ( $\varepsilon_L(\lambda) - \varepsilon_R(\lambda)$ ) stellt somit die eigentliche Messgröße der CD-Spektroskopie dar. Nach Normierung auf Konzentration und Schichtdicke erhält man die spezifische Elliptizität:

$$[\theta_\lambda] = \frac{\theta_\lambda}{c_m d} \quad (3-16)$$

$[\theta_\lambda]$ : spezifische Elliptizität in Grad  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$   
 $c_m$ : Konzentration des Chromophors in  $\text{g cm}^{-3}$   
 $d$ : Weglänge des Lichts durch die Probe in dm

Die molare Elliptizität ist definiert als:

$$[\theta_m]_\lambda = \frac{[\theta_\lambda] M}{100} \quad (3-17)$$

$[\theta_m]_\lambda$ : molare Elliptizität in Grad  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$   
 $[\theta_\lambda]$ : spezifische Elliptizität in Grad  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$   
 $M$ : Molmasse in  $\text{g mol}^{-1}$

Bei Proteinen als Moleküle mit vielen Chromophoren ist ein Bezug auf die Gesamtmasse des Moleküls wenig sinnvoll. Man bezieht sich hier auf die mittlere Masse der Aminosäuren des Proteins.

### III.2.2 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Die Röntgenkleinwinkelstreuung ermöglicht einen Zugang zu Aufbau und innerer Struktur von Latexpartikeln (Ballauff 2001). Derartige Untersuchungen wurden bereits an den hier vorgestellten *brush*-Partikeln durchgeführt (de Robillard *et al.* 2000). Weiterhin konnten Seelenmeyer *et al.* (2000) über diese Methodik die Adsorption eines Tensids auf der Oberfläche von Polystyrol-Latexpartikeln verfolgen und aus den zugehörigen Streukurven den Sättigungspunkt bestimmen. Aufbauend auf diesen am Polymerinstitut durchgeführten Expertisen sollte ebenfalls das Adsorptionsverhalten von Proteinen auf *brushes* untersucht werden. Über die Modellierung der radialen Elektronendichteprofile an die erhaltenen Streukurven sollten zudem Aussagen über den Aufenthaltsort der adsorbierten Proteine in der *brush*-Schicht gewonnen werden.



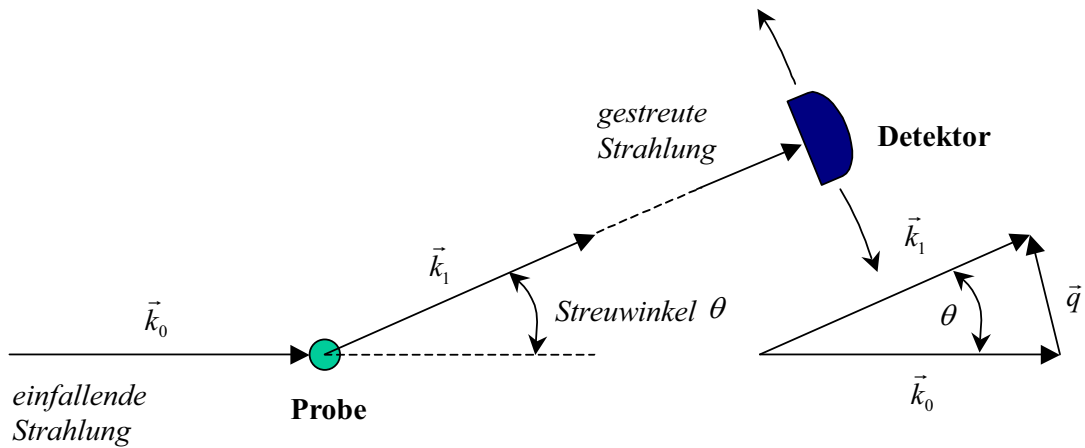


Abb. III.12: Kinematik des Streuprozess sowie Definition des Streuvektors  $\vec{q}$ .

Abbildung III.12 zeigt das Prinzip eines Streuexperiments: Ein einfallender Lichtstrahl der Wellenlänge  $\lambda$  und einem Wellenvektor  $\vec{k}_0$  trifft auf die Probe. Die Intensität der Streustrahlung mit Wellenvektor  $\vec{k}_1$  wird unter dem Streuwinkel  $\theta$  gemessen. Der Streuvektor  $\vec{q}$  ist für den Fall elastischer Streuung definiert zu (Winter *et al.* 1998):

$$\vec{q} = (\vec{k}_1 - \vec{k}_0) = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3-18)$$

Über die gesamte Streuintensität  $I(\vec{q}, \hbar\omega)$  in Abhängigkeit vom Impulsübertrag  $\hbar\vec{q}$  bzw. im inelastischen Fall vom Energieübertrag  $\hbar\omega$  kann man Informationen über Struktur und dynamische Eigenschaften der Probe gewinnen. Bei Strukturuntersuchungen geht man üblicherweise von elastischer Streuung aus (Winter *et al.* 1998).

Aufgrund der Massenverhältnisse der Atomkerne zu den Elektronen wird im Falle der Röntgenstreuung ausschließlich die Wechselwirkung mit den Elektronen der Materie betrachtet (Glatter *et al.* 1983). Diese können als quasi-frei behandelt werden, da ihre Bindungsenergie klein gegenüber der Energie der Röntgenstrahlung ist. Ist die Anzahl der Elektronen wie in den hier betrachteten Fällen sehr hoch, bedient man sich der Elektronendichte  $\rho(\vec{r})$  anstelle einer vektoriellen Beschreibung des Orts der Elektronen. Die Elektronendichte ist als die Zahl der Elektronen pro Volumeneinheit am Ort  $\vec{r}$  definiert. Die Amplitude der Streuwelle  $A(\vec{q})$  ergibt sich als Fouriertransformierte der Elektronendichteverteilung des betrachteten Objekts  $\rho(\vec{r})$  (Guinier *et al.* 1955):

$$A(\vec{q}) = \int_V \rho(\vec{r}) \exp\{-i\vec{q}\vec{r}\} d\vec{r} \quad (3-19)$$

Die Streuintensität  $I(\vec{q})$  ist das Betragsquadrat der Streuamplituden  $A(\vec{q})$ :

$$I(\vec{q}) = A(\vec{q}) \cdot \tilde{A}(\vec{q}) = \iint_V \rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_2) \exp\{-i\vec{q}(\vec{r}_1 - \vec{r}_2)\} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 \quad (3-20)$$

Bei der Beschreibung der Streuintensität von Teilchen in Lösung wird von zwei grundlegenden Annahmen ausgegangen (Glatter *et al.* 1983): Zum einen wird ein isotropes System angenommen, denn aufgrund der freien Rotation der Teilchen im Medium sollten sämtliche Orientierungen gleich wahrscheinlich sein. Zum anderen detektiert der Röntgenstrahl letztlich die Exzesselektronendichte, d. h. die Differenz der Elektronendichten der Partikel  $\rho(\vec{r})$  und des Mediums  $\rho_m$ .

Die Streuintensität des Teilchens  $I(\vec{q})$  ergibt sich somit nach Gleichung 3-20 zu:

$$I(\vec{q}) = \iint_V [\rho(\vec{r}_1) - \rho_m][\rho(\vec{r}_2) - \rho_m] \exp\{-i\vec{q}(\vec{r}_1 - \vec{r}_2)\} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 \quad (3-21)$$

Aufgrund der Isotropie des Systems kann die Streuintensität über sämtliche räumliche Orientierungen gemittelt werden. Für den Phasenfaktor erhält man hiernach:

$$\langle \exp\{-i\vec{q}\vec{r}\} \rangle = \frac{\sin qr}{qr} \quad (3-22)$$

Unter Einbezug des Phasenfaktors und Kugelvolumens ergibt sich nach Integration von Gleichung 3-21 eine zentrale Beziehung der Röntgenkleinwinkelstreuung (Glatter *et al.* 1983):

$$I(q) = 4\pi \int_0^\infty \gamma(r) \frac{\sin qr}{qr} r^2 dr \quad (3-23)$$

mit

$$\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty I(q) \frac{\sin qr}{qr} q^2 dq \quad (3-24)$$

Die Entwicklung der Exponentialfunktion in Gleichung 3-24 ergibt den Guinier-Bereich für kleine Streuwinkel (Winter *et al.* 1998):

$$I(q) = 4\pi \int_0^{\infty} \gamma(r) \left( 1 - \frac{qr^2}{3!} + \dots \right) r^2 dr \approx (\Delta n_e)^2 \left( 1 - q^2 \frac{R_g}{3} \right) \approx (\Delta n_e)^2 \exp \left\{ -q^2 \frac{R_g}{3} \right\} \quad (3-25)$$

$\Delta n_e$  steht für die Anzahl der Exzesselektronen des untersuchten Objekts. Der Gyrationradius  $R_g$  entspricht dem Trägheitsradius in der Mechanik, nur ist er anstelle der Masse mit der lokalen Exzesselektronendichte gewichtet (Winter *et al.* 1998). Die Guinier-Näherung besitzt einen Gültigkeitsbereich von  $qR_g \ll 1$ . In der Praxis lässt sich die Näherung jedoch oft bis  $qR_g < 1$  anwenden. Nach Gleichung 3-25 entspricht die Intensität der Vorwärtsstreuung bei Streuwinkel Null  $I(0)$  dem Quadrat der gemittelten Anzahl der Exzesselektronen  $\Delta n_e$ :

$$I(0) = \langle \Delta n_e \rangle^2 \quad (3-26)$$

Bei Kenntnis der chemischen Zusammensetzung des betrachteten Moleküls, beispielsweise bei Proteinen in Lösung, lässt sich hierüber analog zur klassischen statischen Lichtstreuung das Molekulargewicht  $M_w$  der gelösten Spezies ermitteln (Winter *et al.* 1998):

$$I(0) = K c M_w \quad (3-27)$$

- $K$ : Kontrastfaktor
- $c$ : Konzentration der Probe
- $M_w$ : Molekulargewicht der untersuchten Spezies

Im Falle einer radialsymmetrischen Verteilung der Elektronendichte  $\rho(r)$  hängt die Exzesselektronendichte nur vom Abstand  $r$  ab. Nach Transformation auf Kugelkoordinaten erhält man eine reelle Streuamplitude  $A_0(q)$ , welche nur noch vom Betrag des Streuvektors  $q$  abhängt:

$$A_0(q) = 4\pi \int_0^{r_{\max}} \Delta \rho(r) \frac{\sin qr}{qr} r^2 dr \quad (3-28)$$

Die Streuintensität ergibt sich unter Berücksichtigung der Teilchenzahldichte  $N/V$  zu:

$$I(q) = \frac{N}{V} (A_0(q))^2 \quad (3-29)$$

Eine zentrale Größe der Röntgenstreuung ist der Formfaktor  $P(q)$ . Er ist definiert als Verhältnis der Streuintensität des Teilchens  $I(q)$  zur Vorwärtsstreuintensität  $I(0)$ :

$$P(q) = \frac{I(q)}{I(0)} \quad (3-30)$$

Der Formfaktor ist abhängig von der Anordnung der einzelnen Streuzentren innerhalb des untersuchten Teilchens und beschreibt damit die Form und innere Struktur der Teilchen.

Eine weitere wichtige Größe ist der Strukturfaktor  $S(q, c)$ . Er berücksichtigt die Interferenzen von Streuwellen, welche von verschiedenen Teilchen ausgehen. Damit stellt er ein Maß für die intermolekularen Interferenzen dar. Der Strukturfaktor ist mit der Paar-korrelationsfunktion verknüpft, welche wiederum die Wahrscheinlichkeit angibt, von einem beliebigen Teilchen aus ein weiteres Teilchen im Abstand  $r$  anzutreffen (Winter *et al.* 1998). Für hochverdünnte Systeme ist der Einfluss des Strukturfaktors vernachlässigbar (Glatter *et al.* 1983), da gilt:

$$\lim_{c \rightarrow 0} S(q, c) = 1 \quad (3-31)$$

Die Streuintensität eines Mehrteilchensystems lässt sich in ein Produkt des Anteils der inter- und der intrapartikulären Interferenzen zerlegen (Glatter *et al.* 1983):

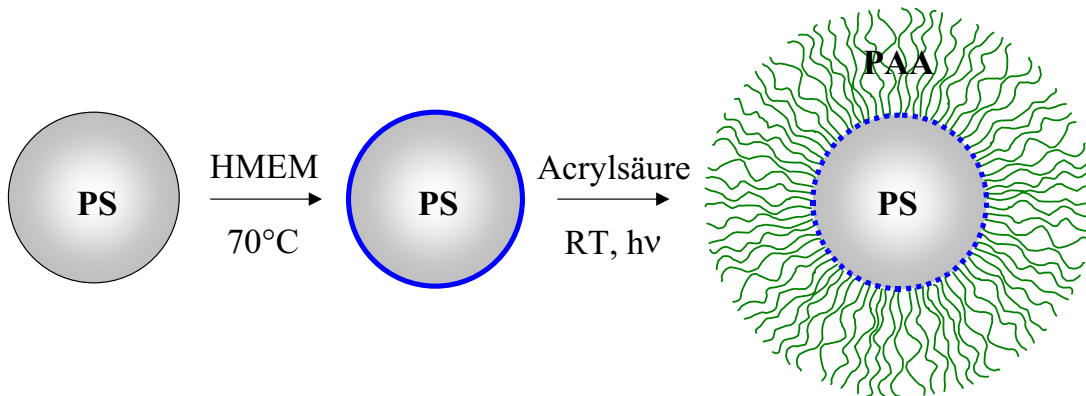
$$I(q) = \frac{N}{V} \Delta n_e^2 P(q) S(q, c) \quad (3-32)$$

## IV Allgemeiner Teil

### IV.1 Synthese der Polyelektrolytbürsten

Die Synthese der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Polystyrol/Polyelektrolyt-Kern-Schale-Latices erfolgte nach der von Guo *et al.* (1999) entwickelten Photoemulsionspolymerisation. Dieses Verfahren erlaubt es auf einem Polystyrol-Kern enger Größenverteilung gezielt dicht gepackte Polyelektrolytbürsten aufzubauen (Guo *et al.* 2000, 2001).

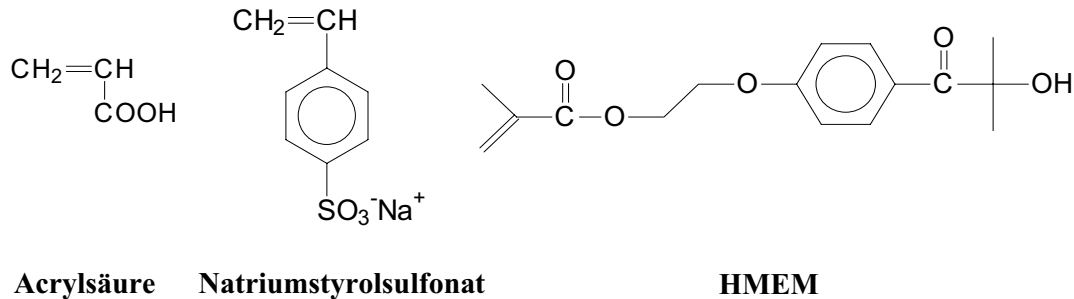
#### IV.1.1 Prinzip und Vorgehensweise



**Abb. IV.1:** Schematische Darstellung des Syntheseweges: Auf einen Polystyrol-Kern von etwa 100 nm Durchmesser wird eine dünne Schicht des Photoinitiators (HMEM) aufpolymerisiert. Nach Zudosierung eines wasserlöslichen Monomers (Acrylsäure oder Natriumstyrolsulfonat) wachsen nach UV-Initiierung dicht gepackte an die Kernoberfläche angeknüpfte Polymerketten auf.

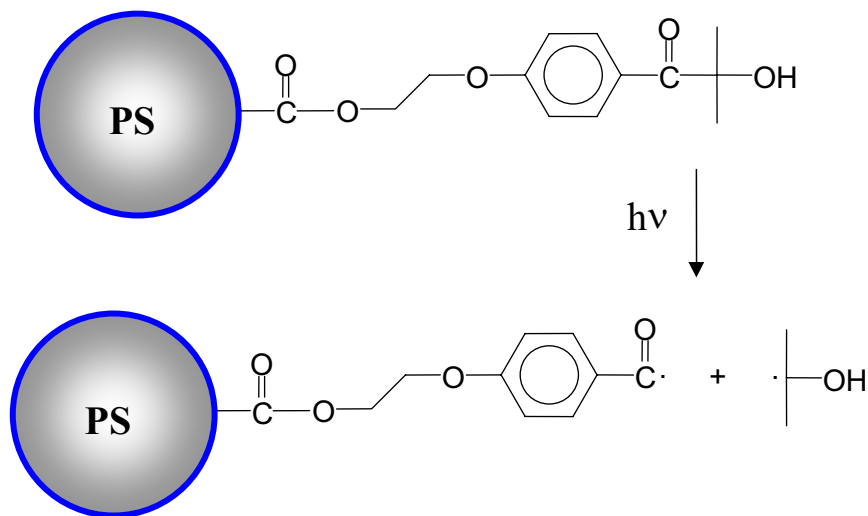
Abbildung IV.1 gibt den gewählten Syntheseweg schematisch wieder. Zunächst wird in einer Emulsionspolymerisation (Gilbert 1995) ein Polystyrol-Kern enger Teilchengrößenverteilung hergestellt. Auf diesen wird im zweiten Schritt eine dünne Schicht des polymerisierbaren Photoinitiators Methacrylsäure-2-[4-(2-hydroxy-2-methyl-propionyl)-phenoxy]-ethylester (HMEM) aufpolymerisiert. Im abschließenden Syntheseschritt wird ein wasserlösliches Monomer (Acrylsäure bzw. Natriumstyrolsulfonat, s. Abb. IV.2) zuge-  
setzt. Durch UV-Bestrahlung werden sowohl an die Kernoberfläche chemisch gebundene Radikale, als auch freie Radikale in Lösung erzeugt (s. Abb. IV.3). Die Radikale starten die Polymerisation des wasserlöslichen Monomers in der wässrigen Phase. Folglich bilden

sich im gleichen Verhältnis chemisch fixierte Polymerketten auf den Kernpartikeln sowie freie Polymerketten in Lösung.



**Abb. IV.2:** Monomerbausteine der Schale (Acrylsäure bzw. Natriumstyrolsulfonat) und Photoinitiator (HMEM)

Mit dem beschriebenen Syntheseweg werden Latices mit definierter Kern-Schale-Morphologie in einer *grafting-from*-Technik (Prucker *et al.* 1999) erhalten.

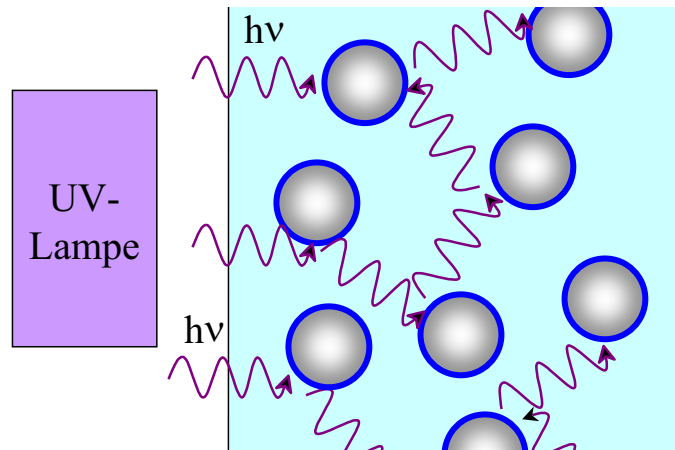


**Abb. IV.3:** UV-initiiertes Zerfall der Photoinitiatorgruppen auf der Oberfläche des Polystyrol-Kerns: Es entstehen jeweils ein an den Kern kovalent gebundenes Radikal sowie ein freies Radikal in Lösung.

Bei der Photoemulsionspolymerisation handelt es sich um eine photochemische Reaktion in einem trüben Medium. Guo *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die starke Trübung kein Hindernis für die Photoinitiation darstellt, da das einfallende UV-Licht elastisch gestreut wird. Licht, welches nicht durch eine Photoinitiatoreinheit absorbiert wird, kann infolge

der starken Mehrfachstreuung in der Suspension andere Kernpartikel erreichen und auf diesen Radikale generieren (s. Abb. IV.4).

Der gewählte Syntheseweg ist in bezug auf Reproduzierbarkeit und eine möglichst enge Verteilung der Teilchengröße ideal geeignet zum Aufbau der im weiteren Verlauf beschriebenen Systeme mit klar definierter Kern-Schale-Morphologie.



**Abb. IV.4:** Photopolymerisation im trüben Medium: Einfallende Lichtquanten, welche nicht direkt absorbiert werden, können bedingt durch die starke elastische Mehrfachstreuung in der Suspension weiter entfernte Kernpartikel erreichen und auf diesen Radikale erzeugen (Guo *et al.* 2000).

#### IV.1.2 Synthese der PS-co-HMEM-Kernlatices

In Anlehnung an die Synthesevorschrift von Guo *et al.* (1999) wurden Polystyrol-Latices mit einer Photoinitiatorschicht in einer zweistufigen Emulsionspolymerisation dargestellt. Zunächst wurde ein reiner Polystyrol-Latex enger Teilchengrößenverteilung synthetisiert. Um bei der Synthese Teilchen von etwa 100 nm Durchmesser zu erhalten, wurde eine entsprechende Menge an Natriumdodecylsulfat (SDS) als Emulgator eingesetzt. Die Verwendung des ionischen Initiators Kaliumperoxodisulfat (KPS) führt zu chemisch gebundenen Sulfatgruppen auf der Kernoberfläche. Hieraus resultiert eine elektrostatische Stabilisierung des Latex.

Die erste Stufe erfolgte im *Batch*-Prozess bei 80°C, wobei nur jeweils eine Stunde polymerisiert wurde. Zu diesem Zeitpunkt der Reaktion ist das Monomer Styrol noch nicht vollständig zu Polystyrol umgesetzt. Die Polystyrol-Partikel sind deshalb noch etwas mit

Styrol gequollen. Wird nun im zweiten Schritt unter langsamem Zudosieren (*starved conditions*, Guo *et al.* 2000) der polymerisierbare Photoinitiator HMEM (Synthese s. VI.1.2) in acetonischer Lösung zugegeben (0,2 ml/min), lässt sich eine dünne Photoinitiatorschicht auf der Oberfläche der Polystyrol-Partikel durch Copolymerisation von Styrol mit HMEM erzeugen. Gibt man HMEM hingegen erst nach vollständigem Umsatz des Styrols im ersten Reaktionsschritt zu, ist eine Aufpolymerisation der Photoinitiatorschicht nicht mehr möglich.

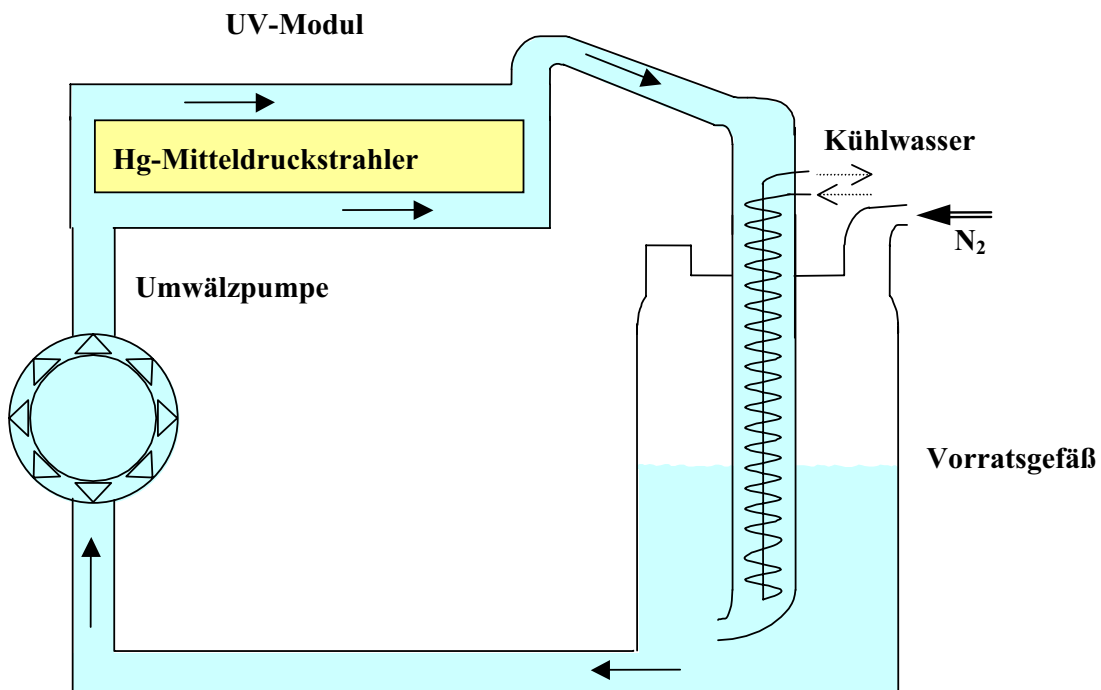
Der zweite Reaktionsschritt erfolgte unter *starved conditions* bei 70°C um einer Neuteilchenbildung entgegenzuwirken. Aufgrund dieser Vorgehensweise erhält man, bedingt durch die oberflächenaktiven Eigenschaften des HMEM-Moleküls, eine geschlossene Copolymerschicht von Styrol und HMEM auf der Oberfläche der Latexteilchen. Dies konnte mittels Röntgenkleinwinkelstreuung nachgewiesen werden (s. Kap. IV.8.2). Man gelangt somit zu Latexpartikeln definierter Kern-Schale-Morphologie, die sehr enge Teilchengrößenverteilungen aufweisen (s. IV.2). Es wurden maximal 4 mol% HMEM eingesetzt, da Untersuchungen von Guo *et al.* (1999) nahe legten, dass mit dieser Photoinitiatormenge bereits die maximale Dichte der Polymerbürsten auf der Kernoberfläche erreicht wird. Der Feststoffgehalt der erhaltenen ungereinigten Latices lag bei 20 Gew.-%.

Die PS-co-HMEM-Latices wurden vor der im folgenden Abschnitt beschriebenen Aufpolymerisation der Schale mittels Ultrafiltration gereinigt (s. VI.1.6). Die zur Charakterisierung der Kernlatices eingesetzten Latexprouben (s. IV.2) wurden gegen entionisiertes Wasser dialysiert (s. VI.1.6).

### IV.1.3 Synthese der Kern-Schale-Latices

Die Synthese der Kern-Schale-Latices erfolgte mit der in Abschnitt IV.1.1. vorgestellten Photoemulsionspolymerisation. Es wurden zunächst mehrere PS-co-HMEM-Latices mittels einer zweistufigen Emulsionspolymerisation dargestellt (s. IV.1.2), gereinigt und charakterisiert (s. IV.2). Zur Aufpolymerisation der Schale wurde das von Guo *et al.* (1999) entwickelte Verfahren eingesetzt. Allerdings wurde ein neuartiges UV-Reaktionssystem (a.c.k. Enviolet Laborreaktor) eingesetzt, welches sich aus einem horizontalem UV-Modul (500 W Hg-Mitteldruckstrahler, Wellenlängenbereich 200 – 600 nm), einer Umwälzpumpe und einem 3000 ml-Vorratsgefäß mit Durchflusskühler (s. Abb. IV.5) zusammensetzt. Die Reaktionsmischung wird dabei kontinuierlich in Umwälztechnik aus dem Vorratsgefäß in das UV-Modul geleitet und gelangt nach einem Wärmeaustausch zurück ins Vorratsgefäß.





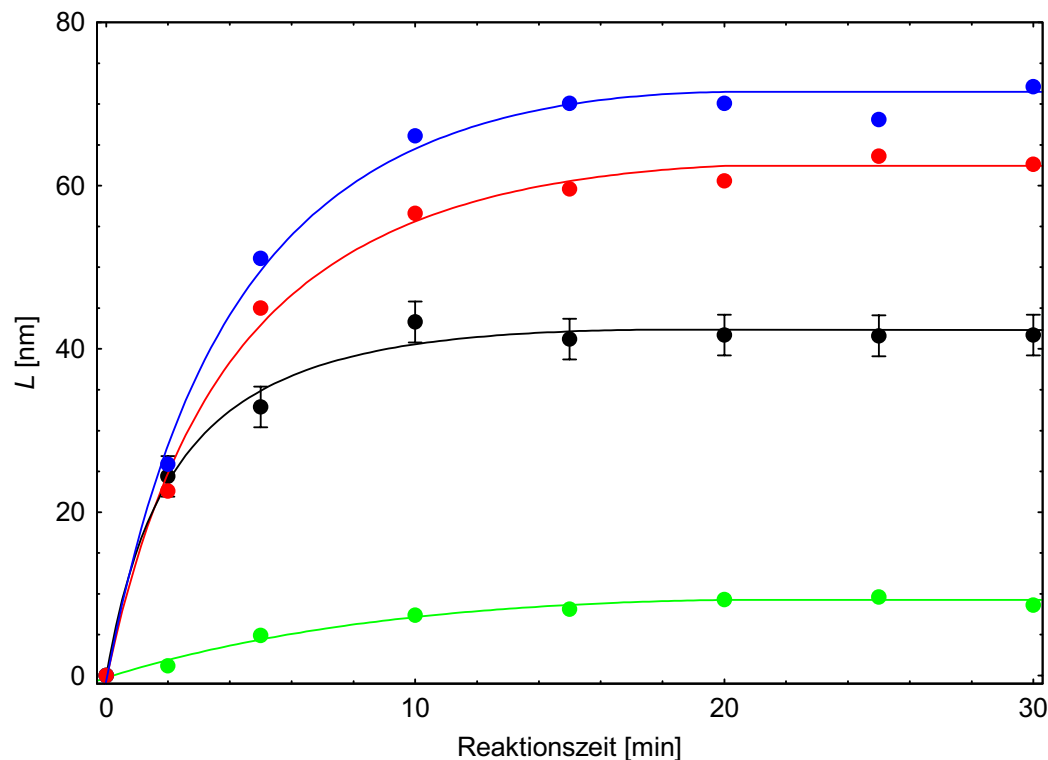
**Abb. IV.5:** Schematischer Aufbau des zur Aufpolymerisation der Polyelektrolytschale eingesetzten UV-Reaktors (a.c.k. Enviolet Laborreaktor)

Bei ersten Experimenten mit einer Leistung des Strahlers von 1000 W wurde zwar ein Aufbau der Polyelektrolytschale innerhalb weniger Minuten beobachtet, allerdings führte die hohe UV-Leistung wiederum zu einem Abbau der Schale mit zunehmender Reaktionsdauer. Abhilfe schaffte die Drosselung der UV-Leistung auf 500 W. Hiernach war auch nach längerer Bestrahlungsdauer der Suspension kein Abbau der Polyelektrolytschale feststellbar.

Der Einsatz der Reaktionsapparatur ermöglichte eine Vergrößerung der Reaktionsansätze auf 2000 – 3000 ml gegenüber einem Fixvolumen von 650 ml bei dem von Guo *et al.* (1999, 2000) eingesetzten System. Zudem gewährleistet das System über eine entsprechende Elektronik reproduzierbare Bestrahlungszeiten und -leistungen. In regelmäßigen Abständen wurde die Leistung der UV-Lampe experimentell kontrolliert (s. VI.1.4). Die *annealed* und *quenched brush*-Systeme wurden jeweils bei einer vergleichbaren UV-Leistung des Strahlers dargestellt.

Die Saatpolymerisation wurde 30 Minuten lang bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierzu wurde jeweils PS-co-HMEM-Latex vorgelegt (Saat), Acrylsäure bzw. Natriumstyrolsulfonat zudosiert und die Reaktion durch Photoinitiation unter UV-Licht gestartet. Der Feststoffgehalt der PS-co-HMEM-Saat wurde zuvor auf 2,5 Gew.-% durch Verdünnung mit entionisiertem Wasser eingestellt. Diese Vorgehensweise verhinderte eine Rekombination von wachsenden Kettenradikalen, welche an verschiedenen Kernpartikeln

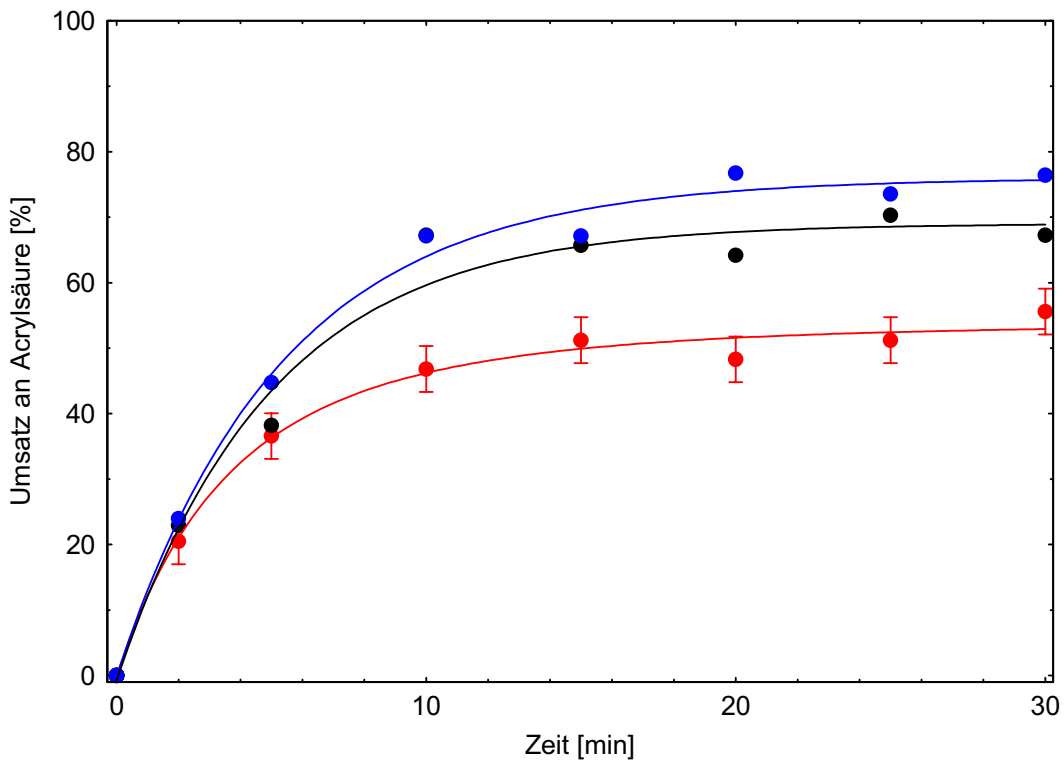
angeknüpft sind. Dies wird durch die Form der RöntgenstreuKurven in Kapitel IV.8.2 belegt. Die bei der Photoemulsionspolymerisation in Lösung gebildeten Polyelektrolytketten (s. IV.1.1) wurden über eine intensive Reinigung der Kern-Schale-Latices mittels Ultrafiltration (s. VI.1.6) entfernt.



**Abb. IV.6:** Ausbildung der hydrodynamischen Dicke der Polyacrylsäure-Schale  $L$  von *annealed brushes* mit der Reaktionszeit: Die *brushes* wurden ausgehend von Kernlatices unterschiedlichen Photoinitiatorgehalts (rot: KpS12 0,5 mol% HMEM, schwarz: KpS14 2,0 mol% HMEM, blau: KpS13 4,0 mol% HMEM bezogen auf den umgerechneten Styrolgehalt des Kerns) aufgebaut, wobei die Acrylsäuremenge jeweils konstant gehalten wurde (40 mol% wiederum bezogen auf den Styrolgehalt des Kerns). System KpS18 (grün) basiert auf derselben PS-co-HMEM-Saat wie System KpS14. Die deutlich geringere Schalendicke ist auf die Halbierung der eingesetzten Acrylsäuremenge zurückzuführen.

Durch Probenentnahme während der Photoemulsionspolymerisation und Bestimmung der hydrodynamischen Schalendicke mittels dynamischer Lichtstreuung wurde die Ausbildung der Polyelektrolytschale auf den Saatpartikeln verfolgt. Diese Untersuchungen wurden an ungereinigten Proben vorgenommen. Eine Ultrafiltration war aufgrund der geringen Probemengen von 3 ml nicht möglich. Abbildung IV. 6 zeigt exemplarisch den Aufbau der Polyelektrolytschale verschiedener *annealed brushes* mit zunehmender Reaktionsdauer. Hierbei ist bereits nach zehn Minuten Reaktionsdauer eine starke Zunahme der Schalen-

dicke zu verzeichnen. Nach 30 Minuten ist die Ausbildung der Polymerbürsten abgeschlossen, was sich in einem Plateau der Schalendicke äußert (s. Abb. IV.6). Damit konnte die Reaktionszeit gegenüber dem von Guo *et al.* (1999) eingesetzten Reaktorsystem von 360 Minuten auf 30 Minuten verringert werden. Dies ist auf die Erhöhung der UV-Leistung von 150 auf 500 W zurückzuführen.



**Abb. IV.7:** Umsatz an Acrylsäure während der Photoemulsionspolymerisation: Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten ist die Reaktion abgeschlossen. Mit zunehmendem Photoinitiatorgehalt der Saatpartikel steigt die maximal umgesetzte Acrylsäuremenge an (rot: KpS12 0,5 mol% HMEM, schwarz: KpS14 2,0 mol% HMEM, blau: KpS13 4,0 mol% HMEM bezogen auf den umgerechneten Styrolgehalt des Kerns).

Die Schalendicke wird von dem osmotischen Druck der Gegenionen im *brush* und damit von der Konturlänge und Packungsdichte der Polyelektrolytketten bestimmt. Die Schalendicke der in Abbildung IV.6 aufgeführten Systeme wird somit durch zwei gegenläufige Effekte geprägt. Dies ist zum einen die Zunahme der Schalendicke mit steigendem Photoinitiatorgehalt durch die höhere Packungsdichte der Polyacrylsäure-Ketten. Andererseits nimmt mit steigendem Photoinitiatorgehalt des Kerns das Verhältnis Monomer zu Photoinitiator linear ab. Somit entstehen Ketten mit kleinerem Polymerisationsgrad. So weisen die Systeme KpS12 und KpS13, bei deren Synthese der niedrigste und der höchste Photoinitiatorgehalt bei gleicher Acrylsäure-Menge vorlag, eine höhere Schalendicke als das

System KpS14, welches auf einem Kern mittleren Photoinitiatorgehalts basiert. Wird die Monomermenge reduziert (System KpS18 in Abb. IV.6), resultiert erwartungsgemäß eine geringere Dicke der Polyelektrolytschale.

Da es sich bei Acrylsäure um eine leicht flüchtige Flüssigkeit handelt, lässt sich zudem der Umsatz an Acrylsäure bei der Photoemulsionspolymerisation über den Feststoffgehalt der entnommenen Proben bestimmen. Bei dieser Methode wird sowohl die an die Kernpartikel gebundene, als auch die freie Polyacrylsäure in Lösung erfasst. Die erhaltenen Umsatz-Zeit-Diagramme zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die Zunahme der Schalendicke mit der Reaktionszeit (s. Abb. IV.7 bzw. Abb. IV.6). Abbildung IV.7 ist zu entnehmen, dass die insgesamt umgesetzte Acrylsäure-Menge mit zunehmendem Photoinitiatorgehalt der Saat ansteigt, jedoch maximal bei 80 % liegt. Bei Reduzierung der zugesetzten Acrylsäuremenge wurde ebenfalls ein erhöhter Umsatz beobachtet. Auch bei geringer Monomerkonzentration wurde die Ausbildung der Polyelektrolytbürsten unter unvollständigem Umsatz der Acrylsäure abgeschlossen, obwohl eine Erhöhung der Monomerkonzentration zu einer größeren Schalendicke führte (s. Abb. IV.6).

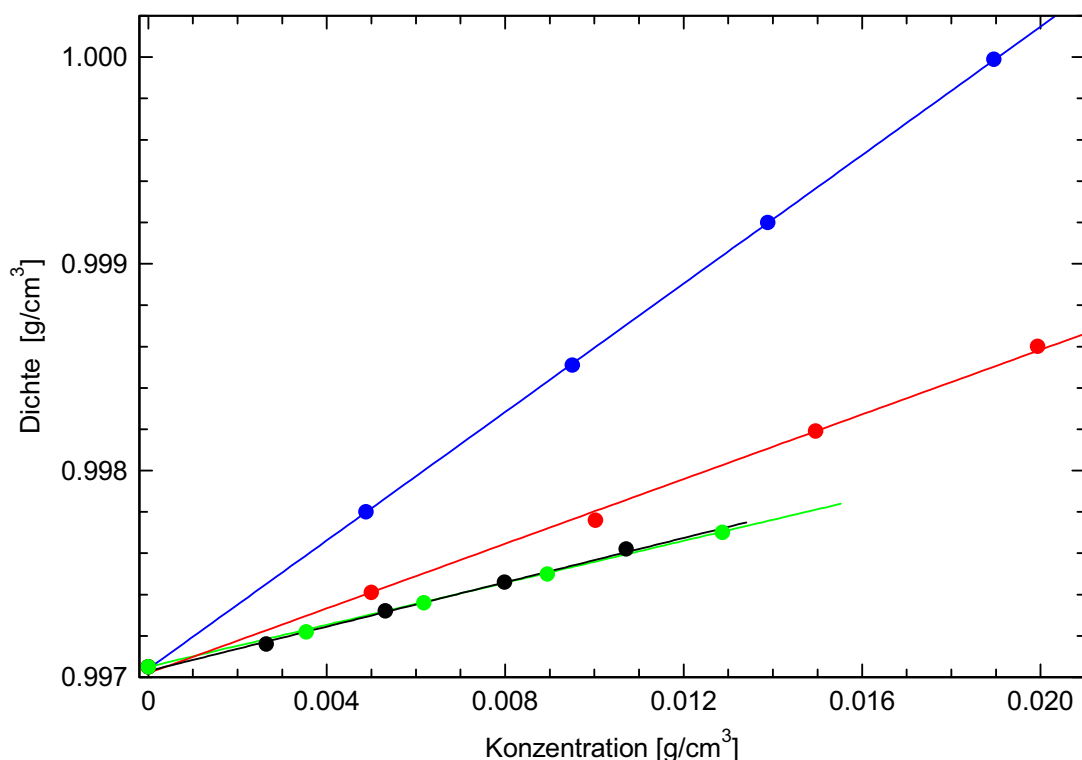
Zusätzlich zu den über die Photoemulsionspolymerisation hergestellten *brushes* wurde ein rein Oberflächen-carboxylierter Polystyrol-Latex (Dingenouts *et al.* 1994) synthetisiert (s. VI.1.5). Die Synthese des Latex PSAA erfolgte in einer Emulsionspolymerisation, wobei dem Reaktionsansatz 5 mol% Acrylsäure bezogen auf die Styrolmenge zugesetzt wurden. Die erhaltene Dispersion soll im weiteren Verlauf als Referenzsystem für oberflächenmodifizierte Systeme dienen, um die Proteinadsorption an derartigen Systemen im Vergleich zu ausgedehnten Polyelektrolytbürsten untersuchen zu können (s. Kap. IV.4).

## IV.2 Charakterisierung der Polyelektrolytbürsten

Die Charakterisierung der *brushes* erfolgte sowohl direkt an den gereinigten Kern-Schale-Teilchen, als auch auf der Stufe des gereinigten Kernlatex. Teilchengrößen und Teilchengrößenverteilungen wurden mittels Scheibenzentrifugation (DCP), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und dynamischer Lichtstreuung (DLS) erhalten.

Die Kenntnis der Feststoffdichte der Latexpartikel in Suspension war für die in Kapitel IV.8.2 beschriebene Analyse der Teilchenmorphologie der Systeme mittels Röntgenkleinwinkelstreuung sowie für die Scheibenzentrifugation erforderlich. Über die Teilchendichte lässt sich der Feststoffgehalt der Suspension in Gew.-% in eine Konzentration in g/ml umrechnen. Hierzu wurden jeweils Konzentrationsreihen der Latices erstellt und die Dichten der Proben über ein Schwingzeitmessgerät (Paar DMA-602, s. VI.3.13) bei 25°C ermittelt.

Abbildung IV.8 zeigt exemplarisch die erhaltenen Dichten eines PS-Latex, eines PS-co-HMEM-Latex sowie von Kern-Schale-Systemen in Abhängigkeit der Konzentration. Die erhaltenen Messwerte wurden einer lineareren Regression unterzogen. Aus der Steigung der Regressionsgeraden und der Dichte des Dispersionsmediums lässt sich die Feststoffdichte der Latexteilchen  $\rho_T$  in Lösung berechnen. Die Teilchendichte des PS-Latex K3 betrug  $1,050 \text{ g/cm}^3 \pm 0,005 \text{ g/cm}^3$ . Die Teilchendichte der PS-co-HMEM-Latices Kp13 und Kp19 von  $1,054 \text{ g/cm}^3 \pm 0,005 \text{ g/cm}^3$  entspricht dem Literaturwert der Feststoffdichte von Polystyrol (Brandrup *et al.* 1975).



**Abb. IV.8:** Konzentrationsabhängigkeit der Dichte des PS-Latex K3 (grün), des PS-co-HMEM-Latex Kp13 (schwarz) sowie des *annealed brush* KpS14 (rot) und des *quenched brush* KpSS2 (blau). Die durchgezogenen Linien entsprechen einer Anpassung der Werte über lineare Regression.

Zur Untersuchung der Teilchengrößenverteilungen der Kernlatices wurden die gereinigten Suspensionen mit einer Scheibenzentrifuge (s. VI.3.3) untersucht. Diese Analysenmethode ermöglichte einen schnellen Zugang zu den Größenverteilungen der Latexpartikel unmittelbar nach der Synthese und war daher ein wichtiges Kontrollinstrument zur Beurteilung der Qualität der Kern-Dispersionen. Da die Methode auf der Sedimentation der Partikel im Zentrifugalfeld beruht, ist zur Ermittlung der absoluten Größen des Teilchendurchmessers die Partikeldichte erforderlich. Hierzu wurden die obigen Werte

herangezogen. Abbildung IV.10 zeigt eine typische Teilchengrößenverteilung eines derartigen Systems. In Tabelle IV.1 sind die mittleren Teilchendurchmesser sämtlicher PS- und PS-co-HMEM-Latices sowie des carboxylierten PS-Latex PSAA aufgeführt. Die Polydispersität von maximal 1,02 weist auf sehr enge Verteilung der Teilchengrößen hin. Es ergibt sich zudem im Rahmen des jeweiligen Messfehlers der Methoden eine gute Übereinstimmung zu den mittels DLS erhaltenen Teilchendimensionen.

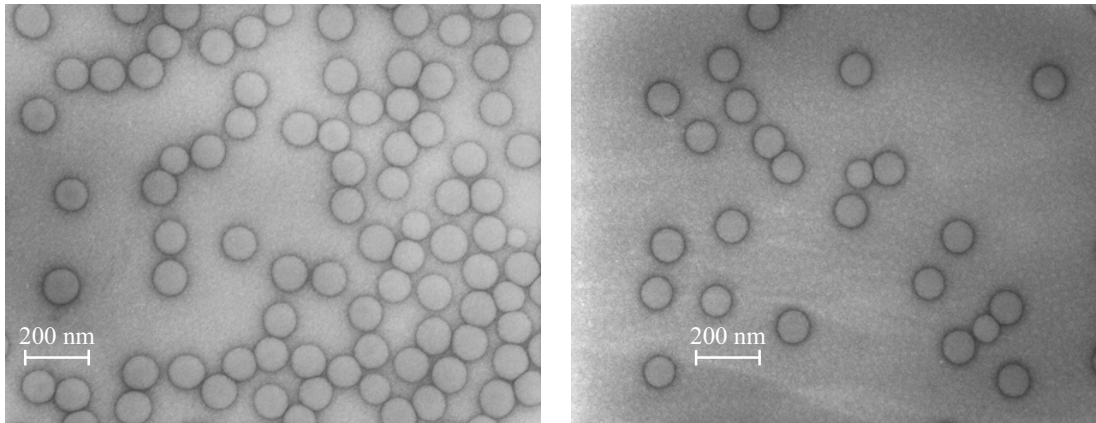
**Tab. IV.1:** Mittels DCP bestimmte mittlere Teilchendurchmesser ( $d_n$ : Zahlenmittel,  $d_w$ : Gewichtsmittel,  $d_{PCS}$ : Mittel der Photonenkorrelationsspektroskopie) und Polydispersität der Teilchengröße der einzelnen PS- und PS-co-HMEM-Dispersionen sowie des carboxylierten PS-Latex PSAA. Zum Vergleich sind die bei den DLS-Messungen erhaltenen Teilchengrößen aufgeführt.

Latex	DCP				DLS
	$d_n$ [nm]	$d_w$ [nm]	$d_{PCS}$ [nm]	$P = d_w/d_n$	$d_{PCS}$ [nm]
K3	96	97	98	1,010	101
K4	95	96	98	1,011	97
K6	99	101	102	1,020	111
Kp11	94	95	96	1,011	101
Kp12	96	97	98	1,010	101
Kp13	99	100	101	1,010	101
Kp14	99	101	102	1,020	103
Kp16	98	100	101	1,020	100
Kp19	118	120	122	1,017	111
PSAA	106	108	110	1,019	109

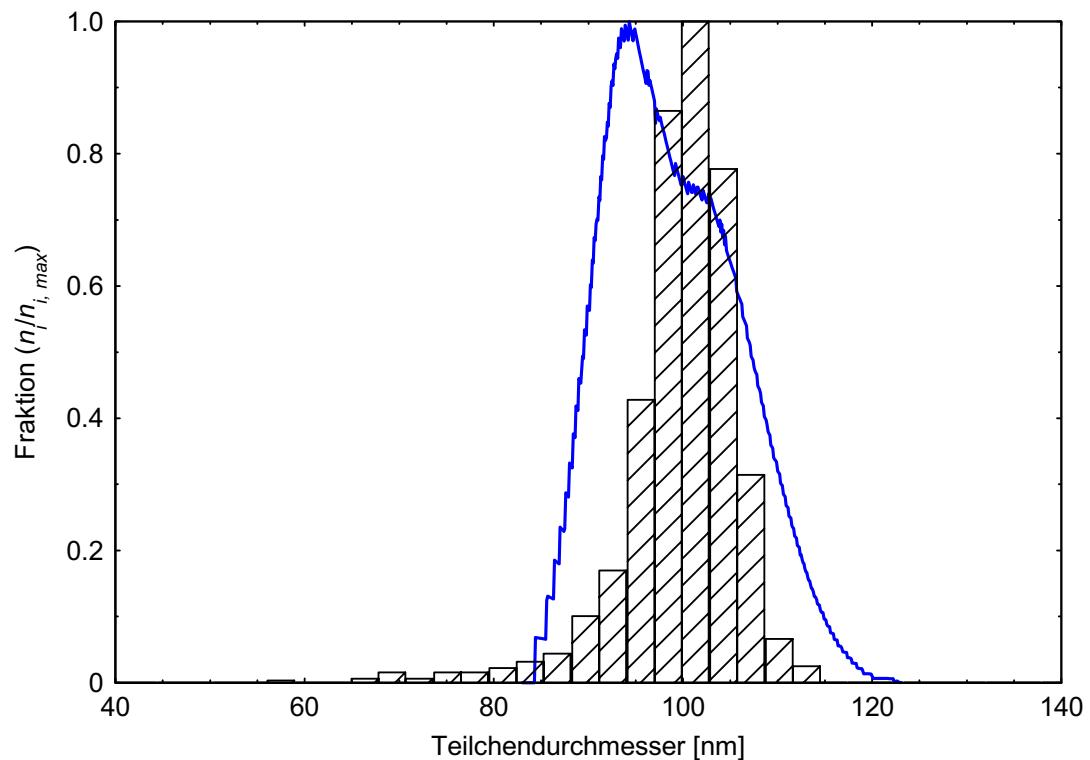
Eine Bestimmung der Teilchengrößenverteilungen der Kern-Schale-Systeme über die Scheibenzentrifugation war nicht möglich, da die Partikel bedingt durch die voluminöse Polyelektrolytschale nur eine geringe Neigung zur Sedimentation zeigten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Dispersionsmedium in der Polymerschale immobilisiert vorliegt (Deike *et al.* 2001). Somit gleicht sich die hydrodynamisch effektive Dichte des Teilchens der des Dispersionsmediums an. Derselbe Effekt führt dazu, dass mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmte Teilchengrößen mit viskosimetrischen Resultaten im Bereich niedriger Scherraten übereinstimmen (Marra *et al.* 2003, Deike *et al.* 2001).

Zur Ergänzung der Untersuchungen mittels DCP an den Kernlatices wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen an einem Transmissionselektronenmikroskop (Hitachi H7) angefertigt (s. VI.3.4). Man erhält bei diesem Verfahren zweidimensionale Bilder der Latexpartikel. Die linke Aufnahme in Abbildung IV.9 zeigt Teilchen des PS-co-HMEM-Latex Kp13. Es ist dabei deutlich die runde Gestalt und die enge Größenverteilung der

Latexpartikel zu erkennen. Der Aufnahme ist weiterhin zu entnehmen, dass bei der Aufpolymerisation der Photoinitiatorschicht keine Neuteilchenbildung eintritt.



**Abb. IV.9:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen; links: PS-co-HMEM-Kern Kp13, rechts: carboxylierter PS-Latex PSAA. Beide Aufnahmen wurden mit 42000facher Vergrößerung aufgenommen.



**Abb. IV.10:** Zahlenverteilungen der Teilchengrößen des PS-co-HMEM-Latex Kp13; Histogramm: TEM (1242 Teilchen ausgezählt), durchgezogene Linie: DCP.

Mittels eines mechanischen Teilchengrößenzählers (Carl Zeiss TGZ3) wurde für die Kern-latices die zugehörige Teilchengrößenverteilung ermittelt. Die hierbei erhaltene Polydispersität von 1,010 bestätigt die enge Größenverteilung der Latexpartikel. Abbildung IV.10 fasst die mittels TEM und DCP erhaltenen Größenverteilungen der Teilchen des PS-co-HMEM-Latex Kp13 zusammen. Der Fehler der mittels TEM und DCP bestimmten Teilchengrößen liegt jeweils bei etwa 5 % (s. VI.4). Die über beide Methoden erhaltenen mittleren Teilchengrößen und dazugehörigen Polydispersitäten zeigen in Anbetracht dieses Fehlers eine gute Übereinstimmung (s. Tab. IV.2).

Bedingt durch die enge Größenverteilung der Kernpartikel werden nach der Aufpolymerisation der dicht gepackten Polyelektrolytbürsten wiederum Teilchen mit einer engen Größenverteilung erhalten. Dies wird durch die Form der Röntgenkleinwinkelstreu-kurven in Kapitel IV.8.2 bestätigt.

Eine direkte Auflösung der Polyelektrolytschale über TEM ist nicht möglich, da die Schale im Hochvakuum entweder zu einer dünnen Schicht auf der Oberfläche des Kerns komprimiert wird oder sich gar im Elektronenstrahl zersetzt. In einer Kooperation mit dem Institut für Nanotechnologie (INT) des Forschungszentrums Karlsruhe gelang es jedoch die Polyelektrolytschale mittels AFM nachzuweisen (Mei *et al.* 2003).

**Tab. IV.2:** Mittlere Teilchengrößen und Teilchengrößenverteilungen des PS-co-HMEM-Kern Kp13: Vergleich der mittels TEM und DCP erhaltenen Ergebnisse ( $d_n$ : Zahlenmittel,  $d_w$ : Gewichtsmittel,  $P$ : Polydispersität der Teilchengröße).

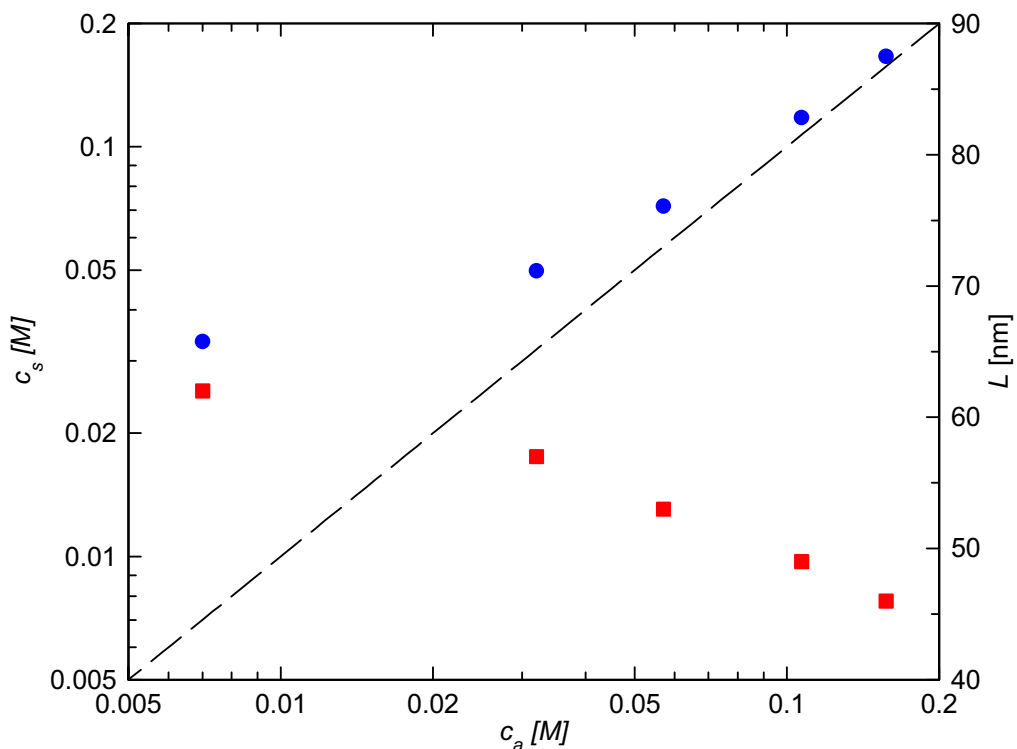
Latex Kp13	TEM	DCP
$d_n$ [nm]	100	99
$d_w$ [nm]	101	100
$P = d_w/d_n$	1,010	1,010

Die Untersuchungen mittels DCP (s. Tab. IV.1) und TEM (s. Abb. IV.9) zeigen zudem, dass der an der Partikeloberfläche carboxylierte PS-Latex PSAA ebenfalls eine enge Verteilung mit einer mittleren Teilchengröße vergleichbar den Kernpartikeln aufweist. Dieses System konnte somit als Modellsystem herangezogen werden, um der Frage nachzugehen, inwieweit sich dicht gepackte Polyelektrolytbürsten im Vergleich zu rein oberflächenmodifizierten Systemen bezüglich der Proteinadsorption unterscheiden (s. IV.4 bzw. IV.5).

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung wurde die hydrodynamische Dicke der über die Photoemulsionspolymerisation aufgebauten Polyelektrolytschale in 10 mM MES-Puffer ( $pH$  6,1) bestimmt (s. Tab. IV.3). Abbildung IV.11 zeigt anhand des *annealed brush* KpS13 die Abhängigkeit der Dicke der Polyelektrolytschale  $L$  von der Fremdsalz-konzentration  $c_a$ . Bei niedriger Ionenstärke liegen die Ketten stark gestreckt vor. Dies ist



auf den osmotischen Druck der Gegenionen innerhalb des *brush* zurückzuführen (Guo *et al.* 2000). Setzt man jedoch Fremdsalz hinzu, resultiert ein markanter Rückgang der Schalendicke. Eine Betrachtung der Ionenstärke im *brush*  $c_s$ , welche sich nach einer Theorie von Hariharan *et al.* (1998) als Funktion der äußeren Ionenstärke  $c_a$  berechnen lässt (s. Abb. IV.11), verdeutlicht dies. Bei etwa 0,1 M Ionenstärke gleicht sich die Ionenstärke im *brush* der äußeren Ionenstärke an. Die Schalendicke wird nunmehr wie im Falle eines neutralen Systems durch die sterische Repulsion der Polymerketten untereinander bestimmt.



**Abb. IV.11:** Einfluss der Ionenstärke auf die *brush*-Schicht: Die roten Quadrate zeigen die Abnahme der hydrodynamischen Dicke der Polyelektrolytschale  $L$  des *annealed brush* KpS13 als Funktion der äußeren Ionenstärke  $c_a$ . Die Messungen wurden in 10 mM MES-Puffer ( $pH$  6,1) durchgeführt, wobei der Pufferlösung jeweils definierte Mengen an Natriumchlorid zugesetzt wurden. Zusätzlich ist der Verlauf der Ionenstärke innerhalb der Polyelektrolytschicht  $c_s$  (blaue Kreise) aufgetragen.

Die auf den Kernpartikeln kovalent gebundenen Photoinitiatoreinheiten zerfallen in jeweils zwei Radikale, welche die Bildung von auf den Kernpartikeln angeknüpften wie freien Polyelektrolytketten in Lösung initiieren (vgl. Abb. IV.3). Daher mussten nach der Synthese die freien Polyelektrolytketten in einer intensiven Ultrafiltration (s. VI.1.6) gegen entionisiertes Wasser aus der Suspension entfernt werden. Im Falle der *quenched brushes*

wurde dieser Reinigungsschritt zur Bestimmung des Massenverhältnisses von Polystyrol zu Polystyrolsulfonat der Partikel genutzt. Hierzu wurde der Feststoffgehalt der Suspension vor und nach der Ultrafiltration bestimmt (s. VI.3.1) und eine Massenbilanz aufgestellt. Ausgehend von einem relativen Fehler des Feststoffgehalts von 0,4 % und unter Berücksichtigung von Einwaagefehlern und Massenverlusten bei Synthese und Reinigung ergibt sich ein relativer Fehler des Massenverhältnisses ( $m_K/m_S$ ) von 5 %.

**Tab. IV.3:** Charakterisierung der *annealed brushes* (KpS12 – KpS21), der *quenched brushes* (KpSS1, KpSS2) sowie des carboxylierten PS-Latex (PSAA): Kernradius  $R$ , hydrodynamische Dicke der PAA-Schale in 10 mM MES Puffer ( $pH$  6,1)  $L_{MES}$ , Massenzusammensetzung der Teilchen  $m_K/m_S$  ( $m_K$ : Masse des PS-co-HMEM-Kerns,  $m_S$ : Masse der PAA- bzw. PSS-Schale), Feststoffdichte der Partikel in Lösung  $\rho_T$ .

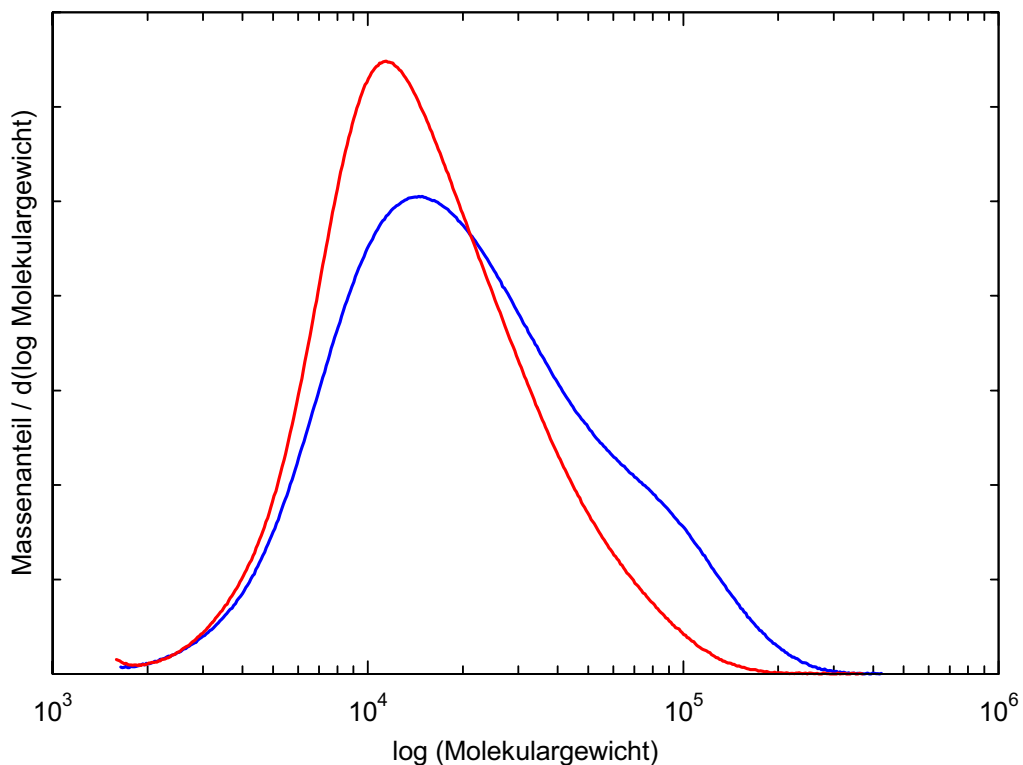
Latex	$R$ [nm]	$L_{MES}$ [nm]	$m_K/m_S$	$\rho_T$ [g/cm <sup>3</sup> ]
KpS12	50	71	12,7	-
KpS13	50	62	8,1	1,103
KpS14	50	54	9,4	1,082
KpS15	50	93	9,2	1,084
KpS18	50	12	15,0	-
KpS21	56	38	12,0	1,088
KpSS1	56	57	2,7	1,136
KpSS2	56	95	2,1	1,180
PSAA	55	-	114,4	1,063

Bei den aus Polyacrylsäureketten aufgebauten *annealed brushes* wurde aufgrund des wesentlich geringeren Molekulargewichts von Acrylsäure gegenüber Natriumstyrolsulfonat ein anderes Verfahren gewählt. Die Massenzusammensetzung der PS/PAA-Kern-Schale-Latices wurde über eine konduktometrische Titration der Carboxylgruppen (s. VI.3.2) bestimmt. Der relative Fehler dieser Methodik liegt bei 4 %. Die erhaltenen Massenzusammensetzungen der *annealed* und der *quenched brushes* sind in Tabelle IV.3 zusammengestellt. Zwischen 29 – 52 % des eingesetzten Monomers wurden zum Aufbau der Polyelektrolytschale genutzt. In Analogie zum Gesamtumsatz an Acrylsäure während der Reaktion (s. Abb. IV.7) nimmt der Anteil der in die Schale eingebauten Acrylsäure mit steigendem Photoinitiatorgehalt des Kerns und sinkender Monomerkonzentration zu.

Die Anzahl der Carboxylgruppen auf der Oberfläche des carboxylierten PS-Latex PSAA wurde ebenfalls über eine konduktometrische Titration bestimmt. Es ergab sich eine Massenzusammensetzung von Polystyrol zu eingebauten Acrylsäuremonomeren von 114 zu 1, womit sich das System klar von den *annealed brushes* mit ausgedehnter PAA-Schale unterscheidet (s. Tab. IV.3). Umgerechnet auf die Oberfläche der 109 nm großen Teilchen

ergibt sich eine Ladungsdichte von  $22 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  bei vollständiger Dissoziation der Carboxylgruppen.

Guo *et al.* (1999) entwickelten eine Methode zur Abspaltung der Polyelektrolytketten vom PS-Kern. Diese macht sich zunutze, dass das Photoinitiatormolekül (s. Abb. IV.2), welches nun als Ankergruppe der Polyelektrolytketten an den Kern fungiert, eine Esterbindung aufweist. Die Hydrolyse der Esterbindung erfolgt in Gegenwart von 2 M Natronlauge bei  $120^\circ\text{C}$  und einer Reaktionsdauer von 15 Tagen (Guo *et al.* 1999). Nach Aufarbeitung und Reinigung (s. VI.1.7) der abgespaltenen Polyelektrolytketten wurden über Gelpermeationschromatographie (GPC) die Molekulargewichtsverteilungen, der bei der Photoemulsionspolymerisation gebildeten Polyelektrolytketten erhalten (s. Abb. IV.12). Die Polydispersität der Ketten, welche als Verhältnis des Gewichtsmittels zum Zahlenmittel der Molmasse definiert ist, liegt in einer typischen Größenordnung für eine radikalische Polymerisation (s. Tab. IV.4). Aus dem Gewichtsmittel der Molmasse  $M_w$  lässt sich die Konturlänge der Polyelektrolytketten berechnen (Guo *et al.* 1999, 2000). Unter Einbezug der Massenzusammensetzung der Partikel (s. Tab. IV.3) ist zudem die Anknüpfungsdichte der Ketten an die Kernoberfläche  $\sigma$  zugänglich (s. Tab. IV.4).



**Abb. IV.12:** Mittels GPC erhaltene Verteilungen des Molekulargewichts der von den *annealed brushes* KpS13 (blau) und KpS14 (rot) abgespaltenen Polyacrylatketten (Natriumsalz).

**Tab. IV.4:** Charakterisierung der PS/PAA-Kern-Schale-Latices KpS13 und KpS14: Kernradius  $R$ , Zahlenmittel der PAA-Ketten (Natriumsalz)  $M_n$ , Gewichtsmittel der PAA-Ketten (Natriumsalz)  $M_w$ , Polydispersität der Ketten  $PD$ , Konturlänge der PAA-Ketten  $L_c$ , hydrodynamische Dicke der PAA-Schale in 10 mM MES Puffer ( $pH$  6,1)  $L_{MES}$ , Anknüpfungsdichte der PAA-Ketten auf der Kernoberfläche  $\sigma$ .

Latex	$R$ [nm]	$M_n$	$M_w$	$PD = M_w/M_n$	$L_c$ [nm]	$L_{MES}$ [nm]	$\sigma$ [nm <sup>-2</sup> ]
KpS13	50	13600	30000	2,2	79	62	0,13
KpS14	50	11300	20000	1,7	51	54	0,13

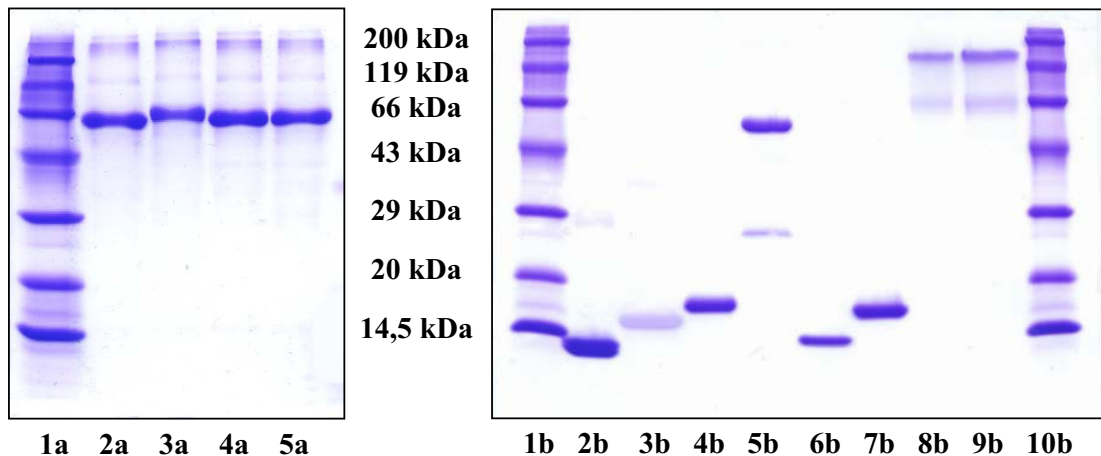
Die Verteilung der Polyacrylsäureketten des Systems KpS13 weist im Vergleich zum System KpS14 eine Schulter im Bereich höherer Molekulargewichte auf (s. Abb. IV.12). Dies ist wahrscheinlich auf eine Rekombination von auf den Kernpartikeln aufwachsenden Kettenradialen mit freien Kettenradikalen in Lösung zu erklären. Hierauf ist auch die höhere Schalendicke des Systems KpS13 im Vergleich zum Latex KpS14 (s. Tab. IV.4) zurückzuführen. Dies weist wiederum darauf hin, dass die mittels DLS gemessene hydrodynamische *brush*-Dicke durch die längsten Polyelektrolytketten bestimmt wird. Daher kann diese zum Teil höhere Werte annehmen, als die aus dem Gewichtsmittel berechnete Konturlänge der Polyelektrolytketten  $L_c$  (s. Tab. IV.4).

### IV.3 Analyse der Proteinchargen

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Proteine wurden in Kapitel III.1.2 im einzelnen vorgestellt. Bei der Auswahl der Proteinchargen (s. Tab. VI.6) wurde darauf geachtet, dass keine Fremdsalzzusätze enthalten waren. Hierdurch konnte ein diesbezüglicher Einfluss auf das Adsorptionsverhalten der Proteine ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurden die Proteine in lyophilisierter oder zumindest mehrfach kristallisierter Form bezogen. Zur Überprüfung der Reinheit der Proteinchargen wurde eine Probe jeder Charge mittels Gelelektrophorese auf Fremdproteine untersucht. Um hierbei möglichst aussagekräftige Informationen zu bekommen, wurden mehrere Techniken eingesetzt.

Die sogenannte SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) basiert auf der Auftrennung denaturierter Proteine nach ihrer molekularen Masse (Winter *et al.* 1998). Hierzu wurden wässrige Lösungen der Proteinproben unter Zusatz des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) auf 100°C erhitzt. Zum Aufbrechen der Disulfidbrücken der Proteinmoleküle wurde Dithiothreitol zugesetzt. Die Detergenzmoleküle ummanteln die durch die Hitzebehandlung denaturierten Polypeptidketten. Dadurch bilden sich elongierte Micellen aus (Winter *et al.* 1998), wobei die Zahl der gebundenen SDS-Moleküle

proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide ist. Die Ladung der Aminosäurereste in der Micelle wird durch die SDS-Schicht abgeschirmt. Daher werden die Polypeptidketten im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgt durch Vergleich der Laufstrecke relativ zu der eines Markers. Hierzu wurde ein Gemisch aus sieben verschiedenen Proteinen bekannter Molmasse (Roth Roti-Mark Standard) eingesetzt.



**Abb. IV.13:** SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE): Abb. links: 1a) Marker, 2a) BSA (Sigma), 3a) FITC-BSA, 4a) BSA (Fluka), 5a) Dansyl-BSA2; Abb. rechts: 1b) Marker, 2b) Hämoglobin, 3b) Myoglobin, 4b)  $\beta$ -Lactoglobulin, 5b)  $\alpha$ -Amylase, 6b) Lysozym, 7b) Ribonuklease A, 8b, 9b) Glucoamylase (unterschiedl. Konz.), 10b) Marker

Zur Auswertung des Gellaufs wurde nach Anfärbung der Proteinbanden (s. VI.3.6.1) der dekadische Logarithmus des Molekulargewichts der Markerbanden gegen den zugehörigen  $R_f$ -Wert (Laufstrecke Proteinbande zur Gesamtstrecke) aufgetragen. Es erwies sich dabei als vorteilhaft, wenn ausschließlich die drei Markerbanden einbezogen wurden, die der zu untersuchenden Bande am nächsten lagen. Das Molekulargewicht (s. Tab. IV.5) wurde über die Anpassung eines Polynoms zweiten Grades an die Markerbanden erhalten.

Ergänzend zur SDS-PAGE wurden die Proteine einer nativen Gelelektrophorese unterzogen (s. VI.3.6.2). Diese Untersuchung sollte darüber Aufschluss geben, ob mehrere Formen bzw. Oligomere des Proteins vorliegen. Diese Untersuchung ist qualitativer Natur, da die Proteine kein konstantes Ladungs-zu-Oberflächenverhältnis aufweisen. Daher ist ein quantitativer Vergleich verschiedener Proteinspezies über einen Marker nicht möglich.

Tab. IV.5: Mittels SDS-PAGE (s. Abb. IV.13) ermittelte Molekulargewichte der einzelnen Proteinchargen

Protein	Molekulargewicht [kDa]		Literaturwert [g/mol]
	Monomer	Dimer	
BSA, Sigma	63	125	66,3 <sup>1</sup>
FITC-BSA	67	132	70,2 <sup>2</sup>
BSA, Fluka	62	126	66,3 <sup>1</sup>
Dansyl-BSA2	62	126	66,5 <sup>2</sup>
Hämoglobin	13, 14	28, 30	64,0 <sup>3</sup> (Tetramer)
Myoglobin	16	36	17,8 <sup>3</sup>
$\beta$ -Lactoglobulin	17	-	18,4 <sup>4</sup> (Monomer)
$\alpha$ -Amylase	27	53	55 <sup>5</sup> (Dimer)
Lysozym	14	-	14,6 <sup>6</sup>
Ribonuklease A	17	-	13,7 <sup>7</sup>
Glucoamylase	73, 186	-	-

1) Giancola *et al.* 1997, 2) berechnete Werte, 3) Lvov *et al.* 1996, 4) Brownlov *et al.* 1997, 5) Ludikhuyze *et al.* 1997, 6) Arai *et al.* 1990, 7) Chatani *et al.* 2001

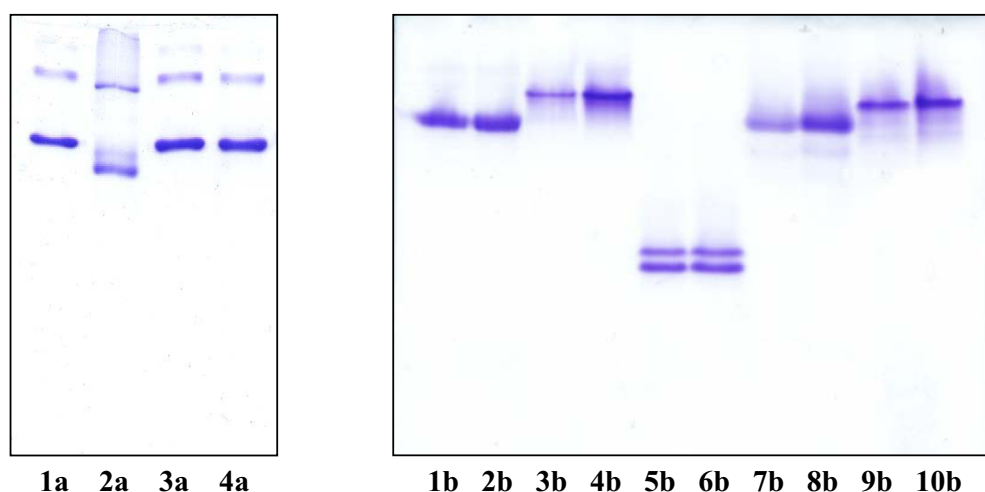
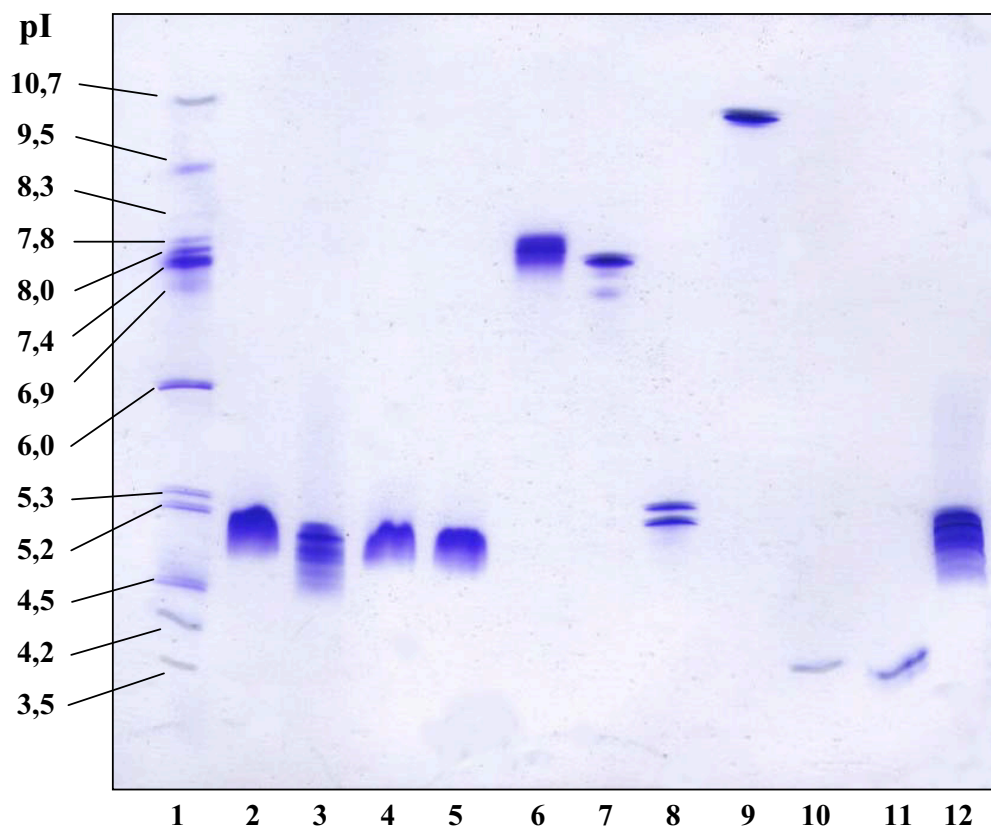


Abb. IV.14: Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native PAGE): Abb. links: 1a) BSA (Sigma), 2a) FITC-BSA, 3a) BSA (Fluka), 4a) Dansyl-BSA2; Abb. rechts: 1b, 2b) Hämoglobin, 3b, 4b) Myoglobin, 5b, 6b)  $\beta$ -Lactoglobulin, 7b, 8b)  $\alpha$ -Amylase, 9b, 10b) Glucoamylase (jeweils unterschiedl. Konz.)

Neben den beschriebenen Verfahren wurde zudem eine isoelektrische Fokussierung auf einem Polyacrylamidgel durchgeführt (s. VI.3.6.3). Hierbei stand neben der Frage der Reinheit vor allem die genaue Bestimmung des isoelektrischen Punkts der Proteine im Vordergrund. Entsprechende Literaturwerte weisen eine relativ hohe Bandbreite von

teilweise über einer  $pH$ -Einheit auf. Die isoelektrische Fokussierung macht sich zunutze, dass sich Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung aus sauren und basischen Resten elektrophoretisch auftrennen lassen (Winter *et al.* 1998). Zuvor wird über ein Gemisch von Polyampholyten im Gel ein  $pH$ -Gradient aufgebaut. An der Stelle des Gels, an dem der  $pH$ -Wert dem isoelektrischen Punkt des Proteins entspricht, geht dessen elektrophoretische Beweglichkeit gegen Null, da das Protein hier keine Nettoladung aufweist. Proteingemische werden daher nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Die quantitative Auswertung erfolgte wiederum über einen Marker (Serva IEF Markers 3-10). Hierzu wurden die isoelektrischen Punkte der Markerproteine gegen ihren  $R_f$ -Wert aufgetragen. Über die erhaltene Eichkurve, welche über ein Polynom 6. Grades angepasst wurde, wurden die isoelektrischen Punkte der untersuchten Proteinspezies bestimmt.



**Abb. IV.15:** Isoelektrische Fokussierung (IEF): 1) Marker, 2) BSA (Sigma), 3) FITC-BSA, 4) BSA (Fluka), 5) Dansyl-BSA2, 6) Hämoglobin, 7) Myoglobin, 8)  $\beta$ -Lactoglobulin, 9) Lysozym, 10, 11) Glucoamylase (unterschiedl. Konz.), 12) FITC-BSA

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in den Abbildungen IV.13 – IV.16 sowie den Tabellen IV.5 und IV.6 zusammengefasst und sollen nun im folgenden diskutiert werden:

### BSA

Bei den Adsorptionsversuchen wurde ausschließlich Fettsäure-freies BSA (Sigma) eingesetzt. Fettsäure-freie BSA-Präparationen neigen zur Dimerisierung in Lösung. So können bis zu 20 % des Proteins als Dimer vorliegen (Carter *et al.* 1994). Die native PAGE weist in Kombination mit der SDS-PAGE bei sämtlichen eingesetzten BSA-Präparationen nur auf einen geringen Anteil an dimeren Proteinmolekülen hin (s. Abb. IV.13 und IV.14). Neben der monomeren und der dimeren Form des Proteins sind die Chargen frei von Fremdprotein. Der experimentell erhaltene isoelektrische Punkt stimmt mit dem Literaturwert überein (s. Tab. IV.6).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine BSA-Charge (Fluka) mit Dansylfluorophoren markiert (s. VI.3.10). Das Protein lässt im Vergleich zum Ausgangsprotein keinerlei mit der Gelelektrophorese detektierbare Änderungen der physikalischen Eigenschaften erkennen (s. Tab. IV.5 u. IV.6). Diese Beobachtung scheint auf den vergleichsweise geringen Markierungsgrad von 1,4 Dansylgruppen pro Proteinmolekül zurückzuführen sein.

Das bereits fluoreszenzmarkiert bezogene FITC-BSA (Sigma) weist hingegen einen Markierungsgrad von durchschnittlich 10 Fluorophoren pro Protein auf. Diese scheinen in statistischer Verteilung an die BSA-Moleküle gebunden zu sein, wie die diskreten Banden bei der isoelektrischen Fokussierung hinweisen (s. Abb. IV.15). Jede Anbindung eines Fluorophors an eine Aminogruppe der Lysinreste führt zu einem Rückgang der basischen Reste des Proteins und damit zu einer Erniedrigung des isoelektrischen Punkts. Mittels SDS-PAGE ist zudem die Erhöhung des Molekulargewichts durch die Fluorophore feststellbar (s. Tab. IV.5).

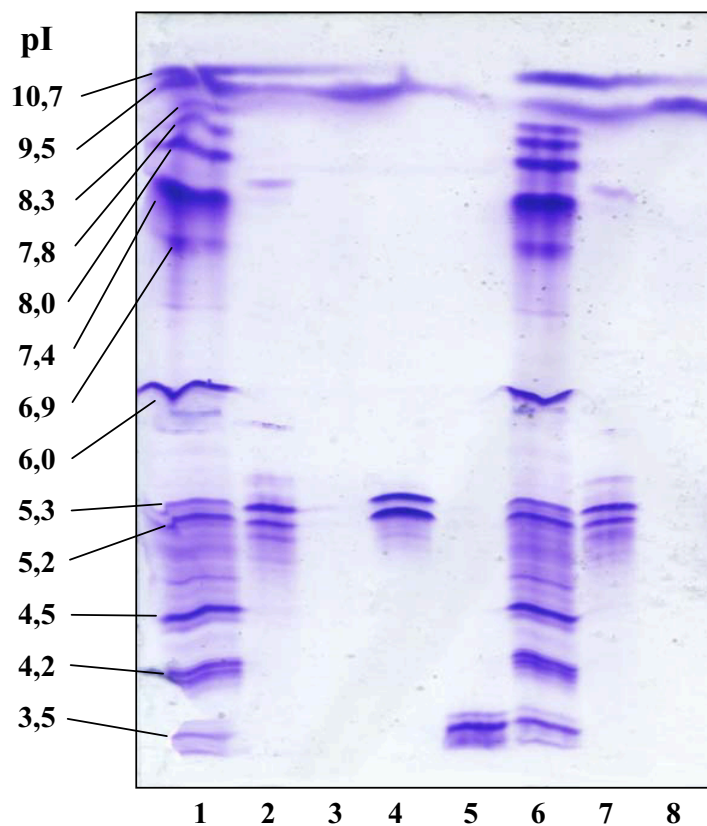
### BLG

Im Falle von BLG ist sowohl bei der nativen (s. Abb. IV.14), wie bei der isoelektrischen Fokussierung (s. Abb. IV.15) die Auftrennung der Proteinprobe in eine Doppelbande zu erkennen. Diese lässt sich auf die genetischen Varianten A und B des Proteins zurückführen (Tilley *et al.* 1960). In der Aminosäuresequenz des monomeren  $\beta$ -Lactoglobulin B sind gegenüber  $\beta$ -Lactoglobulin A jeweils ein Asparginsäure- und ein Valin-Baustein durch Glycin und Alanin ersetzt (Valkonen *et al.* 2000). Da sich beide Spezies somit lediglich an zwei Aminosäureresten unterscheiden, ist eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht nicht möglich (s. Abb. IV.13). Das bei der SDS-PAGE erhaltene Molekulargewicht entspricht zudem der Masse des monomeren Proteins (Tilley *et al.* 1960), obwohl das native Protein zwischen  $pH$  3 und 7 als Dimer vorliegt (Lyster *et al.* 1972). Bei der Probenpräparation unter denaturierenden Bedingungen scheint somit eine vollständige Spaltung des Dimers zu erfolgen. Diese Beobachtung wurde auch bei früheren elektrophoretischen Studien gemacht (Tilley *et al.* 1960).



*RNase A*

RNase A lässt sich wie Lysozym als unter den Versuchsbedingungen (s. VI.3.6.2) positiv geladenes Protein nicht mittels der nativen PAGE untersuchen. Die bei den anderen Verfahren erhaltene Molmasse des Proteins (s. Tab. IV.5) sowie der isoelektrische Punkt (s. Tab. IV.6) zeigen eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit Literaturwerten. Insbesondere lassen die Experimente darauf schließen, dass die Charge frei von Fremdprotein ist. Letzteres ist insbesondere für die Entfaltungs-/Rückfaltungsexperimente (s. IV.6.2) von zentraler Bedeutung.



**Abb. IV.16:** Isoelektrische Fokussierung (IEF): 1) Marker, 2)  $\alpha$ -Amylase, 3) Ribonuklease A, 4)  $\beta$ -Lactoglobulin, 5) Glucoamylase, 6) Marker, 7)  $\alpha$ -Amylase, 8) Ribonuklease A

*Weitere Proteine*

Da die Proteine Hämoglobin, Myoglobin, Lysozym,  $\alpha$ -Amylase sowie Glucoamylase eher eine untergeordnete Rolle in der vorliegenden Arbeit spielen, soll hierbei nur auf die wesentlichsten Punkte eingegangen werden.

Natives Hämoglobin liegt als tetrameres Protein vor (Lunelli *et al.* 1994). Nach der Hitzebehandlung unter reduzierenden Bedingungen bei der SDS-PAGE war jedoch ausschließlich das Monomer neben einem geringen Anteil des Dimers nachweisbar (s. Abb. IV.13 bzw. Tab. IV.5). Zudem traten jeweils geringfügig aufgetrennte Doppelbanden bei der SDS-PAGE auf, was auf verschiedene genetische Varianten hindeutet, welche sich in den Globineinheiten unterscheiden (Römpp 1997).

**Tab. IV.6:** Isoelektrische Punkt pI der untersuchten Proteine: Die Werte wurden aus den IEF-Gelen in Abbildung IV.15 und IV.16 über eine Eichkurve der Markerproteine ermittelt.

Protein	pI (Experiment)	pI (Literatur)
BSA, Sigma	5,1	5,1 <sup>1</sup>
FITC-BSA	4,5 – 5,0	-
BSA, Fluka	5,0	5,1 <sup>1</sup>
Dansyl-BSA2	5,0	-
Hämoglobin	7,5 (6,9; 7,2)	6,8 <sup>2</sup>
Myoglobin	7,7 (7,5; 7,9)	7,0 <sup>2</sup>
β-Lactoglobulin	5,1; 5,2	5,1; 5,2 <sup>3</sup>
α-Amylase	5,1; 5,2 (5,1; 5,4; 5,8; 7,5)	4,6 – 5,3 <sup>4</sup>
Lysozym	10,5	11 <sup>2</sup>
Ribonuklease A	9,2	9,6 <sup>5</sup>
Glucoamylase	3,5 (3,3; 3,6)	3,5 <sup>6</sup>

1) Cantarero *et al.* 1980, 2) Lvov *et al.* 1996, 3) Klostergaard *et al.* 1957, 4) Ludikhuyze *et al.* 1997, 5) Tanford *et al.* 1956, 6) Wenisch *et al.* 1993

Im Falle von Myoglobin, welches im Gegensatz zu Hämoglobin in der Natur als monomeres Protein vorkommt (Römpp 1997) sowie Lysozym ergab sich bei den Experimenten eine gute Übereinstimmung von Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt mit Literaturwerten (s. Tab. IV.5 bzw. IV.6).

Bei kommerziell erhältlicher α-Amylase von *Bacillus subtilis* wurden mehrere isoenzymatische Formen festgestellt (Ludikhuyze *et al.* 1997), welche sich bei der isoelektrischen Fokussierung auftrennen ließen (s. Abb. IV.16). Bei der Bande mit pI 7,5 scheint es sich zudem um eine geringfügige Verunreinigung der Charge zu handeln (s. Tab. IV.6). Nach thermischer Denaturierung zeigte sich bei der SDS-PAGE neben der Bande mit Molekulargewicht 53 kDa eine weitere von 27 kDa. Die Hitzebehandlung führt in diesem Fall nur zur einer teilweisen Spaltung der dimeren Form des Proteins in Monomere (Ludikhuyze *et al.* 1997).

Glucoamylase wurde als einzige Proteincharge vor Verwendung einer Reinigung unterzogen (s. VI.2.1), da die Charge neben Puffersubstanzen nur 47 % Protein enthielt. Das

von *Aspergillus niger* gewonnene Protein besteht aus einem katalytischen und einem Stärke bindenden Zentrum, welche über einen Polypeptidspacer verbunden sind (Aleshin *et al.* 1994, Sorimachi *et al.* 1997). An das Verbindungsstück kann eine unterschiedliche Anzahl von Glykosidresten gebunden sein. Zum anderen kann bei einem Teil des Proteins das Stärke bindende Zentrum fehlen (Christensen *et al.* 1999). Die bei der SDS-PAGE beobachteten Spezies von 73 kDa sowie 186 kDa (s. Tab. IV.5) lassen sich daher nur schwer einordnen. Die native PAGE deutet ebenfalls auf mindestens zwei Spezies hin (s. Abb. IV.14). Die isoelektrische Fokussierung zeigt eine Hauptbande bei pI 3,5 sowie zwei Banden im selben Bereich (s. Abb. IV.16 bzw. Tab. IV.6).

Die elektrophoretischen Untersuchungen bestätigten somit, dass die kommerziell bezogenen Proteinchargen frei von Fremdproteinen sind. Darüber hinaus konnte über die Analyse der Sekundärstruktur (s. IV.6.1.1) gezeigt werden, dass die Proteine nativ vorliegen. Die Proteinchargen erfüllen somit die für die weiteren Experimente notwendigen Anforderungen.

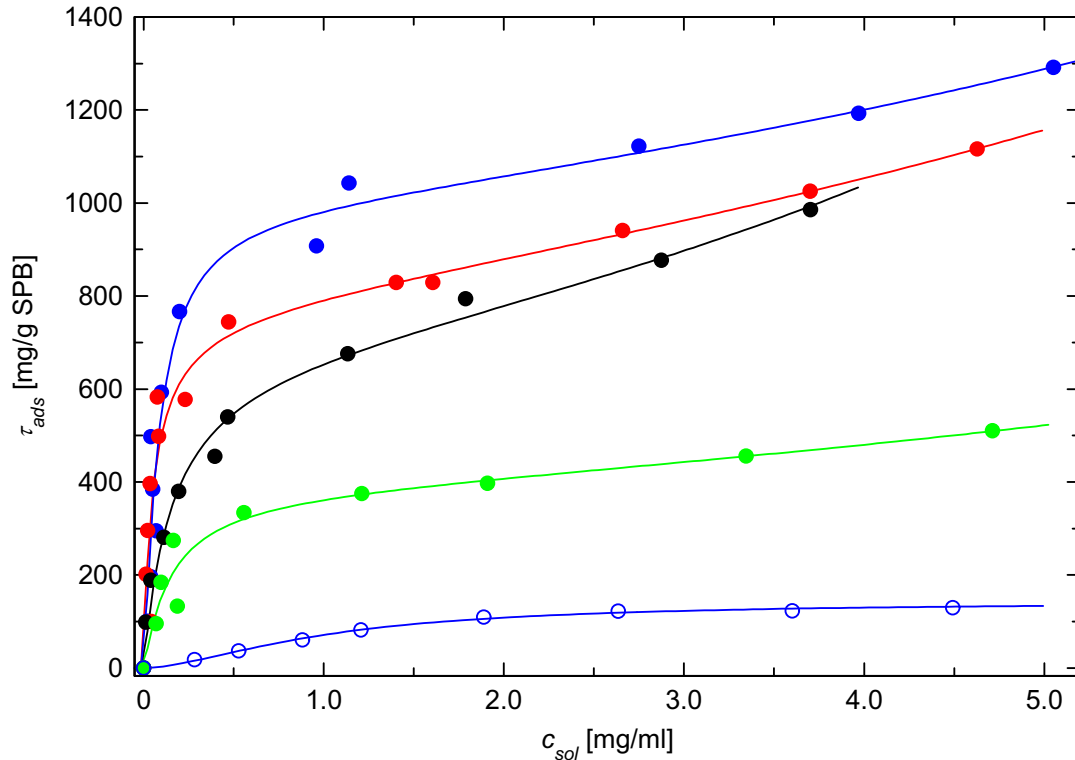
#### IV.4 Proteinadsorption auf *annealed* und *quenched brushes*

Erste Experimente ließen auf eine außergewöhnlich hohe Affinität des Proteins BSA zu *annealed brushes* schließen. Aus diesem Grunde bot sich BSA als Modellprotein zur systematischen Untersuchung der Proteinadsorption auf diesen Systemen an.

Das experimentelle Vorgehen bei der Untersuchung der Proteinadsorption wurde in Kapitel III.1.4 näher erläutert. Abbildung IV.17 gibt den Adsorptionsgrad als Funktion des freien, nicht-gebundenen BSA in Lösung für die verschiedenen *annealed brush*-Systeme (s. Tab. IV.3) wieder. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen (vgl. Kap. III.1.6), dass die gezeigten Adsorptionsisothermen keinen Gleichgewichtsvorgang beschreiben. Es wird vielmehr der Adsorptionsgrad nach Abtrennung des freien Proteins dargestellt.

Zur theoretischen Beschreibung der erhaltenen Adsorptionsisothermen wurde zunächst eine Fit-Anpassung nach Gleichung 3-10 durchgeführt. Diese lieferte eine ausgezeichnete Beschreibung der Daten. Für den Adsorptionsparameter  $n$ , welcher ein Maß für die Abhängigkeit der Adsorptionswärme vom Belegungsgrad darstellt (s. Kap. III.1.6), ergaben sich Werte von 0,9 – 1,1. Somit ist die Adsorptionswärme unabhängig von der Belegung für das flexible Protein BSA. Diese Beobachtung konnte ebenfalls bei der Adsorption auf *quenched brushes* gemacht werden. Im folgenden wurde im Falle der Adsorption von BSA auf *brushes* daher generell eine Fit-Anpassung nach Gleichung 3-7 ( $n = 1$ ) durchgeführt. Abbildung IV.17 zeigt die hierbei erhaltenen Fitkurven, Tabelle IV.7 gibt die zugehörigen

Modellparameter wieder. Das in Kapitel III.1.6 vorgestellte Adsorptionsmodell liefert eine hervorragende Beschreibung der experimentellen Ergebnisse (s. Abb. IV.17).



**Abb. IV.17:** Adsorption von BSA auf *annealed brushes* unterschiedlicher Morphologie in 10 mM MES-Puffer ( $pH$  6,1): Als Trägersysteme dienten die PS/PAA-Kern-Schale-Latices KpS15 (blau), KpS14 (rot), KpS13 (schwarz) und KpS18 (grün). Die *annealed brushes* können gegenüber einem an der Partikeloberfläche carboxylierten Polystyrol-Latex PSAA (blau, offene Symbole) eine mehrfache Menge an Protein binden. Die Linien entsprechen einer Fit-Anpassung der Werte nach Gleichung 3-7 (*annealed brushes*) bzw. 3-10 (PSAA).

Eine genaue Interpretation der bei den einzelnen *annealed brush*-Systemen erhaltenen Adsorptionsgrade ist schwierig, da der Aufbau der *brushes* neben der *brush*-Dicke  $L$  und der Packungsdichte  $\sigma$  ebenfalls von der Verteilung der Konturlängen  $L_c$  der Polyelektrolytketten abhängt. Dennoch ist bei Systemen deutlich unterschiedlicher *brush*-Dicke  $L$  (s. Tab. IV.3) eine Zunahme des Adsorptionsgrads (KpS18 < KpS14 < KpS15) mit steigender Ausdehnung der Polyelektrolytschale zu erkennen. Das Problem den experimentell festgestellten Adsorptionsgrad aus der mittleren Konturlänge und der Packungsdichte der Polyelektrolytketten des Systems abzuleiten, soll anhand der Latices KpS13 und KpS14 verdeutlicht werden: Beide Systeme weisen eine vergleichbare Packungsdichte der Polyacrylsäureketten  $\sigma$  auf. Allerdings ist die *brush*-Dicke der KpS13-

Partikel um 8 nm höher. Somit wären hier leicht höhere Adsorptionsgrade zu vermuten. Experimentell wurde jedoch die gegenteilige Beobachtung gemacht (Abb. IV.17). Dies lässt sich bei Betrachtung der Moleklargewichtsverteilungen der Polacrylsäureketten erklären (s. Abb. IV.12). Die Verteilung der von KpS13-Partikeln abgespaltenen Ketten weist eine Schulter im Bereich höherer Kettenlänge auf, was zu der beobachteten Erhöhung der *brush*-Dicke führt, aber gleichzeitig eine Verringerung der Packungsdichte der Ketten in den äußeren Bereichen des *brush* führt. Eine höhere Packungsdichte, welche nicht zwangsläufig zu sterischer Hinderung führt, sollte eine stärkere Wechselwirkung des Proteins mit den Polyelektrolytketten zur Folge haben. Somit ergibt sich bei geringer Proteinkonzentration zunächst eine höhere Affinität des Proteins hinsichtlich des Systems KpS14. Bei erhöhter freier Proteinkonzentration scheint jedoch ebenfalls eine Belegung der weniger dicht gepackten Außenbereiche des *brush* einzusetzen, was zu einer Angleichung der beiden Adsorptionsisothermen führt (s. Abb. IV.17).

**Tab. IV.7:** Adsorptionsparameter aus der Fit-Anpassung der Daten in Abb. IV.17 nach Gleichung 3-7 ( $n = 1$ ) bzw. 3-10 (PSAA): Die Werte für  $\tau_{ads, M}$  belegen das hohe Bindungsvermögen der *annealed brushes* an BSA. Der erhaltene Wert für das System PSAA entspricht hingegen einer Monoschichtbelegung der Partikeloberfläche. Zudem ist aus dem Wert für  $n$  von 0,59 eine logarithmischen Abnahme der Adsorptionswärme mit der Belegung und damit indirekt die hohe Packungsdichte des Proteins in der Monoschicht abzulesen. Der Kernradius  $R$  und die hydrodynamische *brush*-Dicke  $L_{MES}$  in 10 mM MES-Puffer ( $pH$  6,1) sind zur Charakterisierung der einzelnen Systeme angegeben.

Latex	$R$ [nm]	$L_{MES}$ [nm]	$\tau_{ads, M}$ [mg/g TP]	$z$	$w_{ads}$ [ml/mg]	$n$
KpS13	50	62	$680 \pm 40$	$71 \pm 9$	$0,09 \pm 0,01$	1
KpS14	50	54	$770 \pm 60$	$280 \pm 70$	$0,07 \pm 0,02$	1
KpS15	50	93	$1020 \pm 90$	$260 \pm 90$	$0,04 \pm 0,02$	1
KpS18	50	12	$390 \pm 50$	$120 \pm 40$	$0,05 \pm 0,03$	1
PSAA	55	-	$140 \pm 20$	$\rightarrow \infty$	$\rightarrow 0$	$0,59 \pm 0,08$

Besonders auffällig sind die höheren Bindekapazitäten an Protein der *annealed brushes* im Vergleich zum Oberflächen-carboxylierten Polystyrol-Latex PSAA (s. Abb. IV.17). Für das letztere System ist lediglich eine Belegung der Oberfläche der kompakten Teilchen zu erwarten. Die spezifische Oberfläche der Teilchen beträgt  $52 \text{ m}^2/\text{g}$ . Aus dem Stokes-Radius von BSA (3,61 nm, Kulkarni *et al.* 1970) ergibt sich ein Platzbedarf eines Proteinemoleküls von  $41 \text{ nm}^2$ . Zur Monoschichtbelegung von einem Gramm Partikel wären damit 142 mg BSA erforderlich. Dieser Wert stimmt mit dem experimentell für  $\tau_{ads, M}$  erhaltenen Wert von 140 mg (s. Tab. IV.7) überein. Zudem wurde für dieses Systems eine Abhängigkeit der Adsorptionswärme vom Belegungsgrad festgestellt ( $n < 1$ ). Dies spricht für eine hohe Packungsdichte der Proteine, wie es für eine zweidimensionale Anordnung in

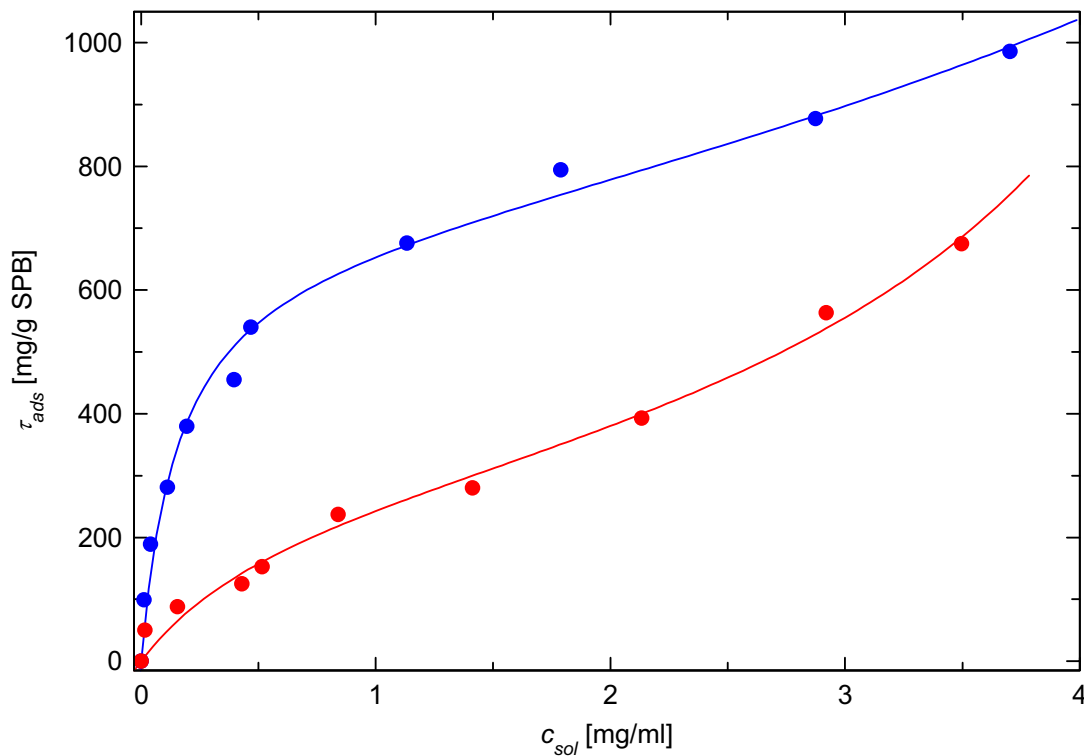
einer Schicht zu erwarten wäre. Entsprechende Beobachtungen wurden auch von Oh *et al.* (2000) im Falle der Adsorption von BSA auf sulfonierten Polystyrol-Latices gemacht. Die Autoren haben  $n$  auf 0,5 gesetzt und eine ausgezeichnete Beschreibung des Adsorptionsgrads mit Hilfe der Langmuir-Freundlich-Isotherme erhalten, welche ebenfalls in dem hier vorgestellten Modell als Grenzfall enthalten ist (s. Kap. III.1.6).

Da die PSAA-Latexpartikel annähernd denselben Durchmesser wie die Polystyrol-Kerne der *brushes* aufweisen, kann der um ein Mehrfaches höhere Belegungsgrad im Falle der *brushes* nicht durch eine Belegung des Polystyrol-Kerns erklärt werden. Zudem sind die Polyelektrolytketten auf der Oberfläche typischerweise im Abstand von 2 nm angeknüpft, womit eine Belegung der Polystyrol-Oberfläche mit den 7,2 nm (Kulkarni *et al.* 1970) großen Molekülen schon rein aus sterischen Gründen ausgeschlossen ist. Folglich lassen sich die experimentellen Beobachtungen nur über die Ausbildung mehrerer Schichten von Proteinmolekülen innerhalb des *brush* erklären. Diese Annahme ließ sich mittels Röntgenkleinwinkelstreuung experimentell bestätigen (s. Kap. IV.8).

#### IV.4.1 Einfluss der Pufferkonzentration

Abbildung IV.18 gibt die Ergebnisse für die Adsorption von BSA auf einem *annealed brush*-System wieder, welche bei unterschiedlichen Pufferkonzentrationen aber konstantem  $pH$ -Wert erhalten wurden. Der Adsorptionsgrad bei einer MES-Konzentration von 10 mM liegt dabei stets unter den bei 50 mM erhaltenen Werten. Diese Beobachtung kann - wie im folgenden Abschnitt beschrieben - auf die Erhöhung der Ionenstärke zurückgeführt werden.

Vergleicht man die zugehörigen Ergebnisse der Fit-Anpassung (s. Tab. IV.8) miteinander, erkennt man eine Halbierung des Wertes für  $\tau_{ads, M}$  bei der Verfünffachung der Pufferkonzentration. Zudem nimmt ebenfalls die Bindungsstärke der stärker mit den Polyelektrolytketten wechselwirkenden Proteinanteile im Vergleich zu den in der Peripherie des *brush* gebundenen Proteine ab, was in dem Parameter  $z$  Ausdruck findet. Im Bereich hoher Konzentration an freiem Protein ist bei höherer Pufferkonzentration eine besonders starke Zunahme des Belegungsgrads festzustellen (s. Abb. IV.18). Dies kann dadurch erklärt werden, dass nach Auffüllung der bevorzugten Adsorptionsplätze zunehmend äußere Schichten des *brush* besetzt werden. Diese erlauben keine allzu starke Anbindung an das Substrat, da nur eine Wechselwirkung mit einzelnen Polyelektrolytketten möglich ist. Dennoch ist diese zu beobachten aufgrund der abnehmenden Protein-Protein-Abstoßung bei Erhöhung der Pufferkonzentration und damit der Ionenstärke.

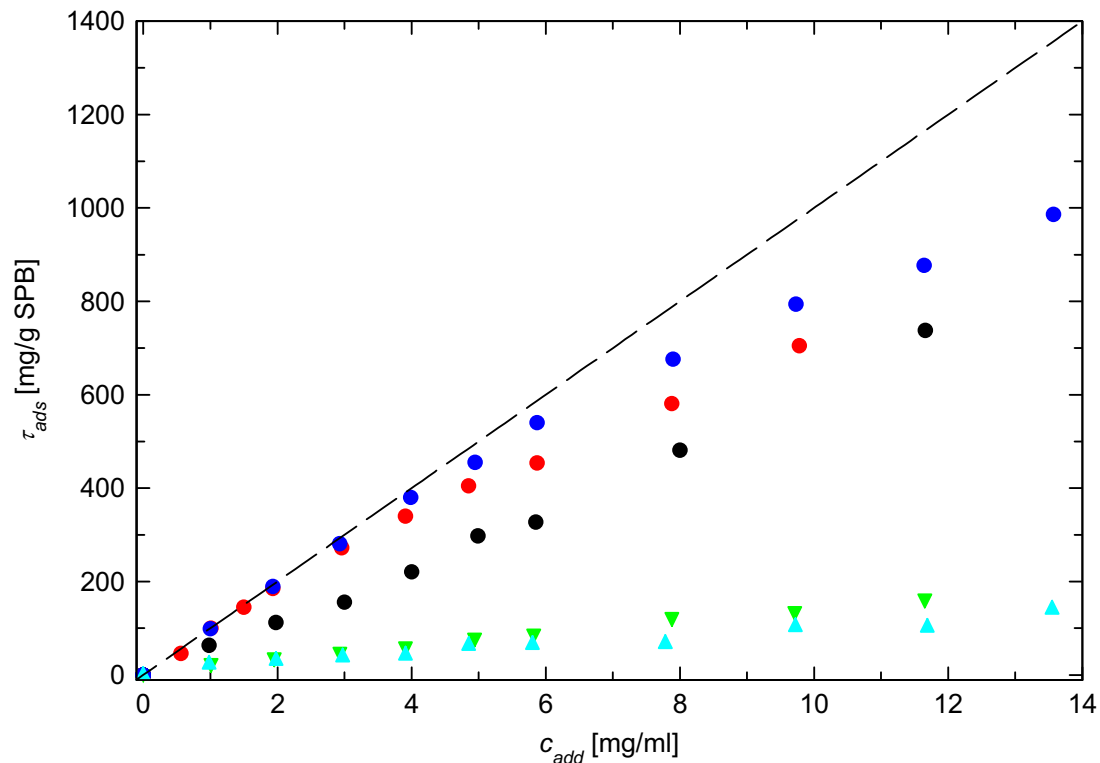


**Abb. IV.18:** Adsorption von BSA auf dem *annealed brush* KpS13 bei unterschiedlicher MES-Pufferkonzentration ( $pH$  6,1): Bei Erhöhung der Pufferkonzentration von 10 mM (blau) auf 50 mM (rot) zeigt sich ein deutlich geringerer Belegungsgrad. Erst im Bereich hoher freier Proteinkonzentration zeigt sich eine starke Zunahme des Adsorptionsgrads, welche durch eine Mehrschichtenadsorption in den äußeren Bereichen des *brush* erklärt werden kann. Die Linien entsprechen einer Fit-Anpassung der Werte nach Gleichung 3-7.

#### IV.4.2 Einfluss der Ionenstärke – *annealed brushes*

Die Abhängigkeit des Adsorptionsgrads von der Ionenstärke ist ein zentraler Punkt bei der Untersuchung der Triebkräfte der Proteinadsorption auf *brushes* (vgl. Kap. III.1.5). Allgemein sollte Proteinadsorption mit steigender Fremdsalzkonzentration zunehmen. Aufgrund des Abschirmungseffekts wird sowohl die Abstoßung zwischen Protein und gleichnamig geladenen Substrat, als auch die Abstoßung zwischen den Proteinen untereinander verringert. Ist allerdings die Adsorption auf die „*counterion release force*“ in Verbindung mit einem niedrigeren  $pH$ -Wert innerhalb des *brush* (s. Kap. III.1.5) zurückzuführen, sollte ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden. Der Entropiegewinn durch die Freisetzung zahlreicher Gegenionen von *brush* und Protein ist im Bereich des „osmotischen Limits“ maximal (s. Kap. III.1.5) und nimmt mit steigender Fremdsalz-

konzentration ab. Nach Übergang in den *salted brush*, d. h. bei Ionenstärken über 0,1 M, gleichen sich Ionenstärke und *pH*-Wert im *brush* den äußeren Verhältnissen an, wodurch die „*counterion release force*“ aufgehoben wird.

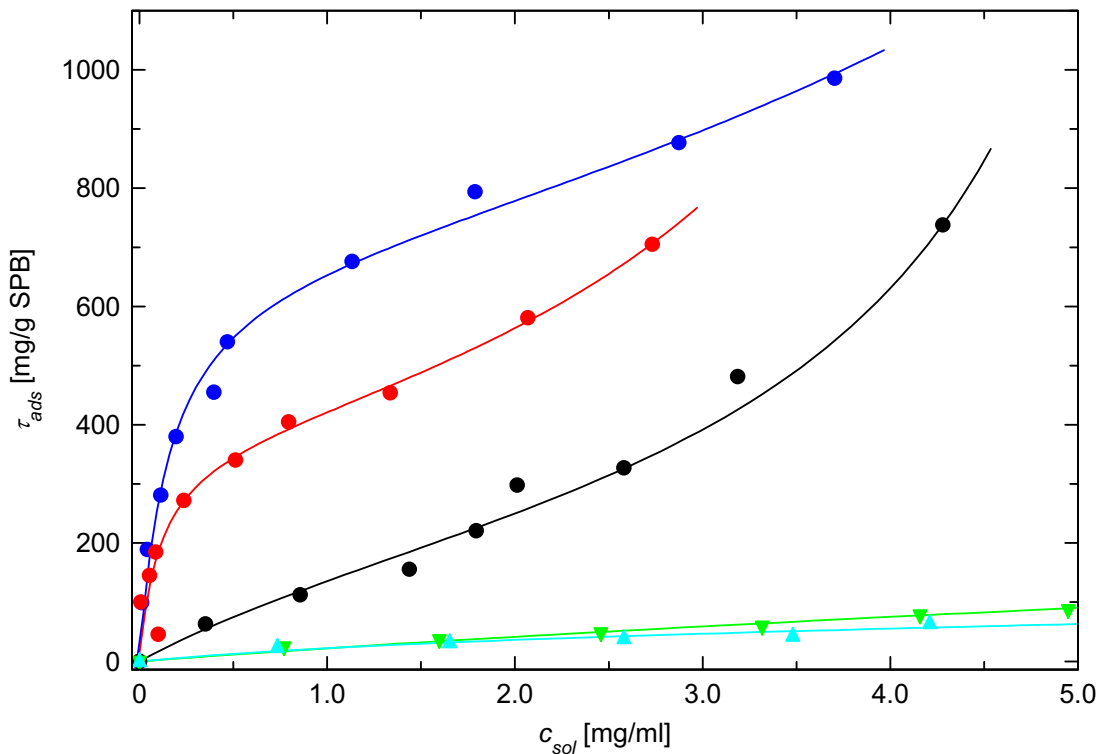


**Abb. IV.19:** Adsorptionsgrad von BSA auf dem *annealed brush* KpS13 bei unterschiedlicher Ionenstärke als Funktion der zugesetzten Proteinkonzentration  $c_{add}$ : Die Experimente wurden in 10 mM MES-Pufferlösungen (*pH* 6,1) durchgeführt, welche sich in der zugesetzten NaCl-Konzentration unterscheiden (dunkelblau: 0 mM, rot: 25 mM, schwarz: 50 mM, grün: 100 mM, hellblau: 150 mM). Im Bereich des *osmotic brush* (kreisförmige Symbole) ist eine hohe Proteinadsorption zu verzeichnen, während nach Übergang in den *salted brush* (Dreiecke) nur geringe Belegungsgrade erzielt werden können.

Zur experimentellen Überprüfung der obigen These wurden Adsorptionsversuche am *annealed brush* KpS13 in 10 mM MES Puffer (*pH* 6,1) ohne und mit unterschiedlichen Zusätzen an Natriumchlorid durchgeführt. Die Ionenstärke der reinen Pufferlösung ohne Natriumchlorid-Zusatz (10 mM MES) wurde mit 7 mM gering gehalten, um den Einfluss der Fremdsalzkonzentration besser studieren zu können. Wie dem in Abbildung IV.21 dargestellten Experiment zu entnehmen ist, gehen die KpS13-Partikel bei einer äußeren Ionenstärke von 100 mM vom *osmotic* in den *salted brush* über. Wie erwartet ist im Bereich des *osmotic brush* eine hohe Proteinadsorption zu verzeichnen (s. Abb. IV.19 bzw. IV.20). Da auch die Ionenstärke innerhalb eines langkettigen *brush*  $c_s$  (s. Abb. III.1) nicht



über den gesamten „osmotischen“ Bereich konstant ist, zeigt sich bereits bei Ionenstärken zwischen 10 - 60 mM ein signifikanter Rückgang des Adsorptionsgrades bei Fremdsalzzugabe. Bei weiterer Erhöhung der Ionenstärke auf etwa 100 mM erfolgt eine sprunghafte Abnahme des Adsorptionsgrads. So ist bei einer Ionenstärke von 107 mM (100 mM NaCl-Zusatz) nur eine geringe BSA-Adsorption festzustellen, da die Trägerpartikel als *salted brush* vorliegen.



**Abb. IV.20:** Adsorptionsisothermen von BSA auf dem *annealed brush* KpS13 bei unterschiedlicher Ionenstärke (Werte aus Abb. IV.19 entnommen): Die Experimente wurden in 10 mM MES-Pufferlösungen ( $pH$  6,1) durchgeführt, welche sich in der zugesetzten NaCl-Konzentration unterscheiden (dunkelblau: 0 mM, rot: 25 mM, schwarz: 50 mM, grün: 100 mM, hellblau: 150 mM). Im Bereich des *osmotic brush* (kreisförmige Symbole) zeigt das Protein eine hohe Affinität zu den *brushes*. Nach Übergang in den *salted brush* (Dreiecke) verbleibt das Protein hingegen überwiegend in Lösung. Die Linien entsprechen einer Fit-Anpassung der Werte nach Gleichung 3-7.

Folglich bestätigt der Verlauf des Adsorptionsgrades mit der Ionenstärke die in Kapitel III.1.5 aufgestellte These, dass die Proteinadsorption in der „*counterion release force*“ begründet liegt, welche im fremdsalzfreien Zustand („osmotisches Limit“) am stärksten ist. Der Rückgang des Adsorptionsgrads und der Bindungsstärke an die *annealed brushes* mit

zunehmendem Salzzusatz lassen sich quantitativ in den Werten für  $\tau_{ads, M}$  bzw.  $z$  verfolgen (Tab. IV.8).

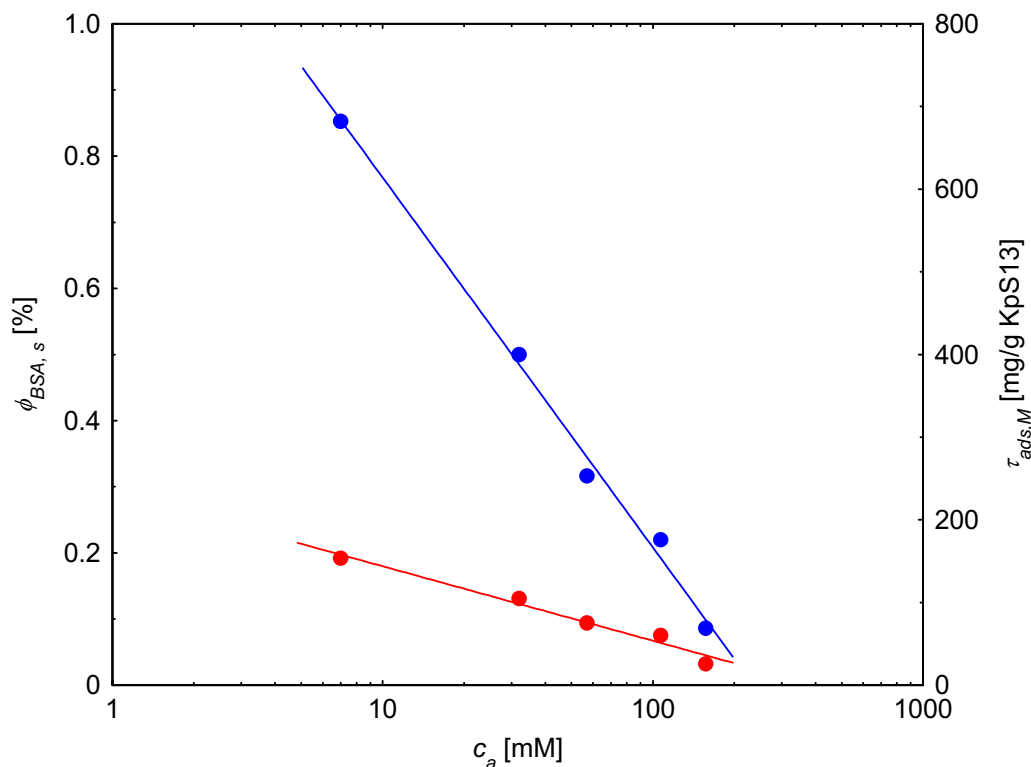
Bei einer Betrachtung der Adsorptionsisothermen bei niedriger äußerer Ionenstärke (s. Abb. IV.20) fällt darüber hinaus auf, dass mit zunehmender Ionenstärke eine erhöhte Zunahme des Adsorptionsgrades im Bereich hoher freier Proteinkonzentration erfolgt. Dieser Effekt konnte auch im vorherigen Abschnitt bei einer Erhöhung der Pufferkonzentration beobachtet werden. Da die direkte Bindungsstärke an das Substrat bei einer Erhöhung der Ionenstärke abnimmt, resultiert bei niedriger Proteinkonzentration – wie oben diskutiert – eine Absenkung des Adsorptionsgrads. Allerdings wird bei Erhöhung der Ionenstärke ebenfalls die elektrostatische Abstoßung zwischen dem Gesamtprotein und dem Substrat sowie zwischen den Proteinen untereinander reduziert. Bedingt durch eine hohe Konzentration an freiem Protein kann somit eine zusätzliche Adsorption von Protein ausgelöst werden, welches allerdings eine wesentliche schwächere Bindung an die *brushes* aufweist. Das in Kapitel III.1.6 vorgestellte Adsorptionsmodell berücksichtigt ausdrücklich unterschiedlich stark gebundene Proteinfractionen. Hierin liegt letztlich auch die hervorragende theoretische Beschreibung der Adsorptionsisothermen in Abb. IV.20 begründet.

**Tab. IV.8:** Adsorptionsparameter aus der Fit-Anpassung der Daten in Abb. IV.18, IV.20 und IV.23 nach Gleichung 3-7 ( $n = 1$ ): Die Werte für  $\tau_{ads, M}$  belegen die Abnahme des Adsorptionsgrads auf den KpS13-Partikel (*annealed brush*) mit steigender Ionenstärke. Die Abnahme des Parameters  $z$  zeigt zudem, dass parallel hierzu die Bindungsstärke abnimmt. Zusätzlich sind Vergleichswerte bei höherer Pufferkonzentration (50 mM MES) sowie für den *quenched brush* KpSS2 aufgeführt.

Latex	Konz. MES, <i>pH</i>	NaCl-Konz. [mM]	$\tau_{ads, M}$ [mg/g TP]	$z$	$w_{ads}$ [ml/mg]
KpS13	10 mM, <i>pH</i> 6,1	0	680 ± 40	71 ± 9	0,09 ± 0,02
KpS13	10 mM, <i>pH</i> 6,1	25	400 ± 60	40 ± 10	0,17 ± 0,03
KpS13	10 mM, <i>pH</i> 6,1	50	250 ± 20	4 ± 1	0,161 ± 0,004
KpS13	10 mM, <i>pH</i> 6,1	100	180 ± 90	5 ± 1	0,03 ± 0,02
KpS13	10 mM, <i>pH</i> 6,1	150	70 ± 20	11 ± 5	0,04 ± 0,02
KpS13	50 mM, <i>pH</i> 6,1	0	300 ± 40	10 ± 3	0,17 ± 0,01
KpSS2	10 mM, <i>pH</i> 6,1	100	770 ± 20	140 ± 20	0,17 ± 0,01
KpSS2	10 mM, <i>pH</i> 6,1	500	300 ± 10	57 ± 9	0,25 ± 0,01

In den bisherigen Überlegungen wurde dem Schrumpfen des *brush* bei Erhöhung der Ionenstärke nur unzureichend Rechnung getragen. Daher soll dies an dieser Stelle nachgeholt werden. Über  $\tau_{ads, M}$  (s. Tab. IV.8) und die *brush*-Dicke  $L$  der unbeladenen Teilchen (s. Abb. IV.11) bei der jeweiligen Ionenstärke ist der Volumenbruch des Proteins innerhalb

des *brush*  $\phi_{BSA, s}$  zugänglich. Diese Berechnung ist möglich, da sich die *brush*-Dicke während der Adsorption nicht verändert (s. Kap. IV.8). Abbildung IV.21 ist eine lineare Abnahme von  $\tau_{ads, M}$  und  $\phi_{BSA, s}$  mit der logarithmierten äußeren Ionenstärke  $c_a$  zu entnehmen. Somit erscheint es sogar möglich den Adsorptionsgrad eines *brush* durch einfache *scaling*-Modelle abzuschätzen. Da insbesondere im Bereich des *osmotic brush* kein Plateau in  $\phi_{BSA, s}$  vorliegt, lässt sich der Rückgang des Adsorptionsgrades keineswegs ausschließlich über den Rückgang des *brush*-Volumen erklären.

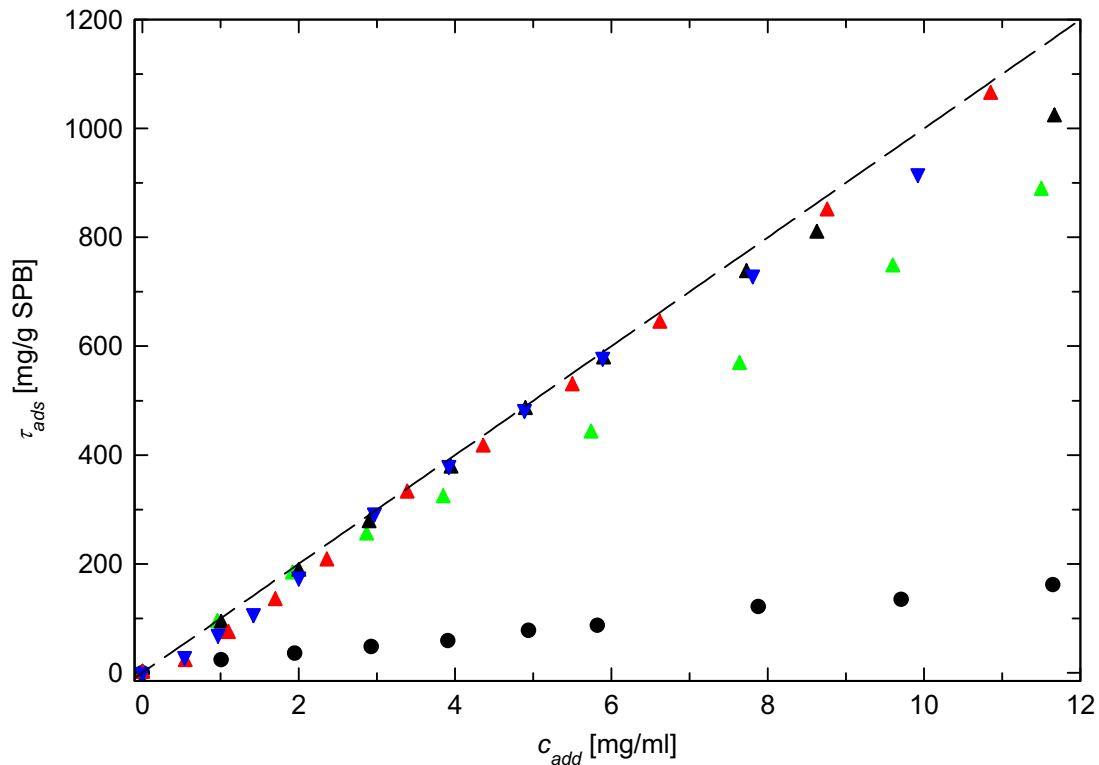


**Abb. IV.21:** Abhängigkeit des charakteristischen Belegungsgrads  $\tau_{ads, M}$  (blau) sowie des Volumenbruchs von adsorbiertem BSA innerhalb des *brush*  $\phi_{BSA, s}$  (rot) als Funktion der äußeren Ionenstärke  $c_a$ . Zur Aufstellung eines simplen *scaling*-Modells wurden die Daten einer linearen Regression unterzogen.

#### IV.4.3 Einfluss der Ionenstärke – *quenched brushes*

Die bisher beschriebenen Adsorptionsversuche wurden an *annealed brushes* aus Polyacrylsäure in MES-Puffer mit einem Pufferpunkt von 6,1 durchgeführt. Zwar weist Abbildung III.6 auf eine nahezu vollständige Dissoziation der Polyacrylsäure-Ketten bei diesem *pH*-

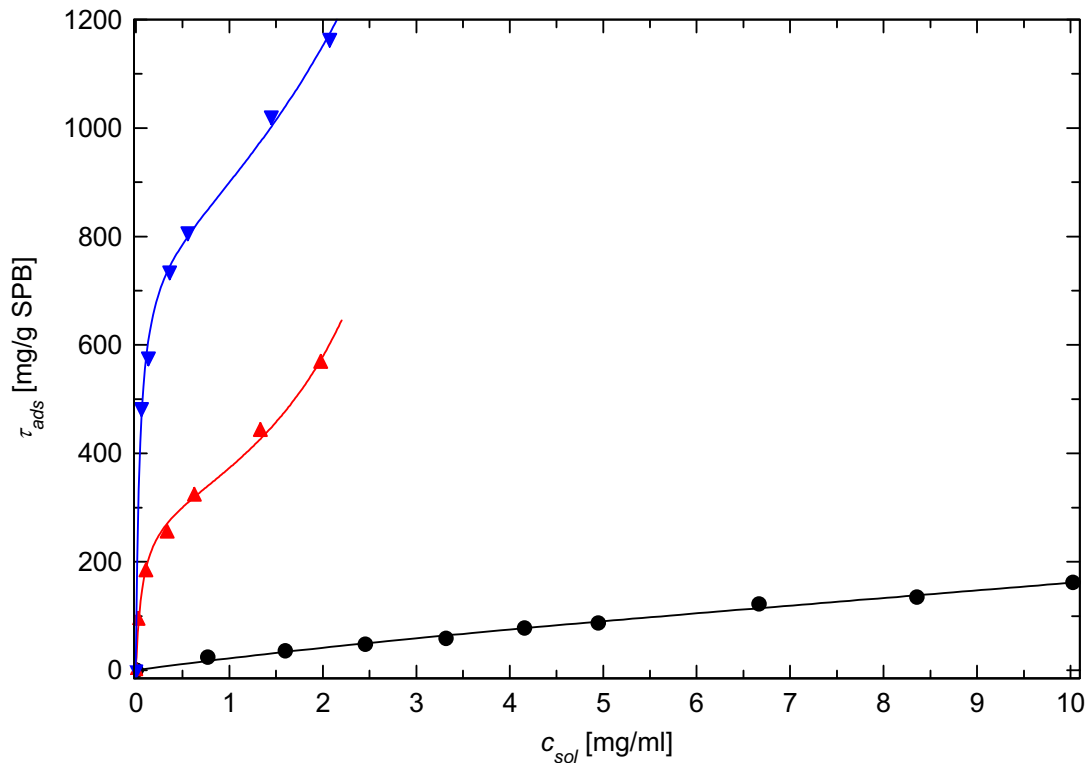
Wert hin, doch befindet man sich erst zu Beginn des Plateaus maximaler Schalendicke. Zudem wird die hydrodynamische Schalendicke von den längsten Polyelektrolytketten geprägt. Deshalb bleibt letztlich die Frage offen, wie stark teilweise undissoziierte Carboxylgruppen das Adsorptionsvermögen des *brush* herabzusetzen vermögen.



**Abb. IV.22:** Adsorptionsgrad von BSA auf dem *quenched brush* KpSS2 (Dreiecke) bei unterschiedlicher Ionenstärke als Funktion der zugesetzten Proteinkonzentration  $c_{add}$ : Die Experimente wurden in 10 mM MES-Pufferlösungen ( $pH$  6,1) durchgeführt, welche sich in der zugesetzten NaCl-Konzentration unterscheiden (dunkelblau: 0 mM, rot: 50 mM, schwarz: 100 mM, grün: 500 mM). Zum Vergleich wurde zusätzlich eine Adsorptionskurve von BSA auf dem *annealed brush* KpS13 (kreisförmige Symbole) aufgetragen, welche bei einer NaCl-Konzentration von 100 mM erhalten wurde. Der Rückgang des Adsorptionsgrades bei Erhöhung der Ionenstärke ist aufgrund der höheren Affinität des Proteins zu *quenched brushes* weniger ausgeprägt als bei *annealed brushes*.

Bei einem *quenched brush* hingegen liegen die Polyelektrolytketten unabhängig von  $pH$ -Wert stets vollständig dissoziiert vor. Damit ist auch die *brush*-Dicke unabhängig von  $pH$ -Einflüssen. Bei einem aus Polystyrolsulfonat als starkem Polyelektrolyten gebildeten System sollte der  $pH$ -Wert im Inneren des *brush* somit gegenüber der äußeren Lösung stärker abgesenkt sein als im Falle des schwachen Elektrolyten Polyacrylsäure. Entsprechend ist auch die osmotische Aktivität der Gegenionen der Polyelektrolytketten

geringer. Beides sollte gemäß den in Kapitel III.1.5 diskutierten Triebkräften des Adsorptionsprozess zu einem stärkeren Proteinbindungsvermögen der *quenched brushes* führen. Zudem ist Polystyrolsulfonat wesentlich hydrophober als Polyacrylsäure, was hydrophobe Wechselwirkungen mit den Proteinen hervorrufen könnte.



**Abb. IV.23:** Adsorptionsisothermen von BSA auf dem *quenched brush* KpSS2 bei unterschiedlicher Ionenstärke (Werte aus Abb. IV.22 entnommen): Die Experimente wurden in 10 mM MES-Pufferlösungen ( $pH$  6,1) durchgeführt, welche sich in der zugesetzten NaCl-Konzentration unterscheiden (dunkelblau: 100 mM, rot: 500 mM). Ein Vergleich mit der Adsorptionsisotherme von BSA auf dem *annealed brush* KpS13 (kreisförmige Symbole: 100 mM NaCl) zeigt, dass die Adsorption des Proteins auf den beiden *brush*-Typen bei gleicher äußerer Ionenstärke in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen an freiem Protein abläuft. Die daraus resultierenden höheren Belegungsgrade bestätigen die höhere Affinität des Proteins zu *quenched brushes*. Die Linien entsprechen einer Fit-Anpassung der Werte nach Gleichung 3-7 (Fitparameter s. Tab. IV.8).

Hierzu wurde die Wechselwirkung von BSA mit dem PS/PAA-Latex KpSS2 in Abhängigkeit der Ionenstärke untersucht. Eine nähere Untersuchung zur Affinität weiterer Proteine zu *quenched brushes* folgt weiter unten. Abbildung IV.23 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen. Im Bereich des *osmotic brush* bei geringer äußerer Ionenstärke ist nur eine geringe Abhängigkeit des erhaltenen Adsorptionsgrads von der Ionenstärke festzustellen. Bis zu einer Zugabemenge von 800 mg BSA pro 1000 mg Trägerpartikel wird das Protein

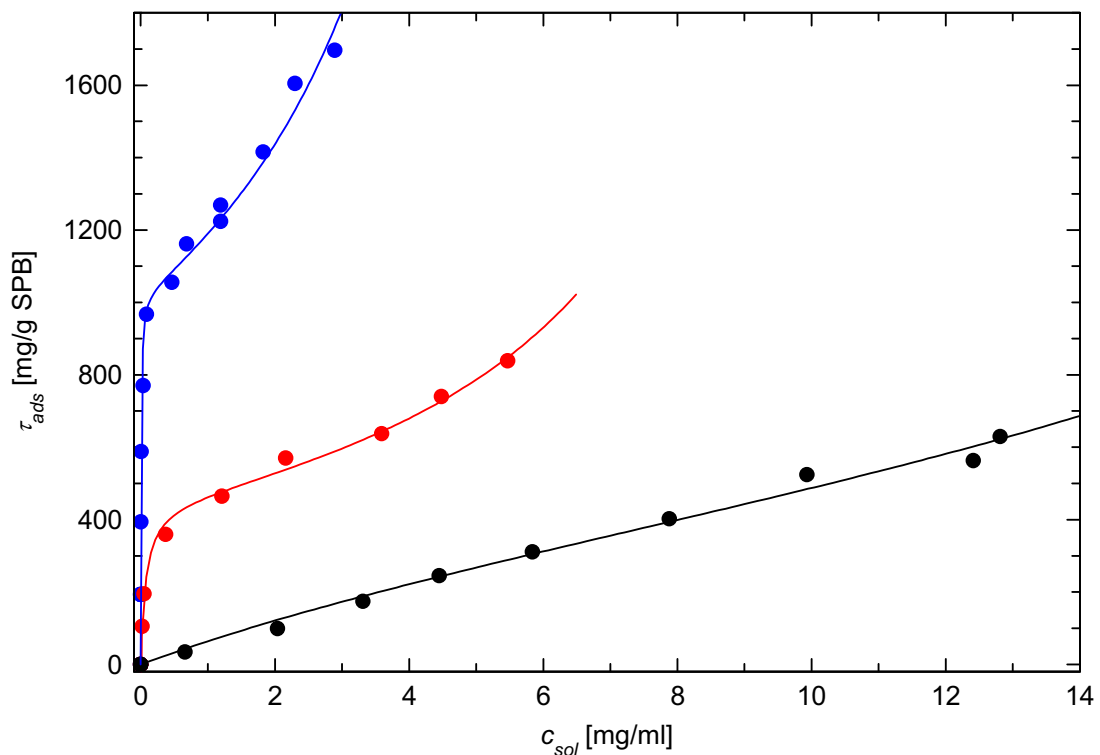
nahezu vollständig adsorptiv gebunden. Ein direkter quantitativer Vergleich zum *annealed brush* KpS13 ist aufgrund der unterschiedlichen Morphologie der beiden *brushes* nicht möglich. Dennoch sind die beobachteten Unterschiede im Adsorptionsgrad in einer Größenordnung, dass sie keinesfalls über die unterschiedlichen Längen und Packungsdichten der Polyelektrolytketten erklärt werden könnten.

Die Proteinbindung an den *quenched brush* erscheint somit wie erwartet wesentlich stärker als bei dem *annealed brush*-System gleicher Ionenstärke (vgl. Abb. IV.19 bzw. Abb. IV.20). Bei den vorliegenden Experimenten wurden bis zu 1550 mg Protein pro Gramm Latexpartikel gebunden. Allerdings führte die Anbindung derartig großer Proteinmengen zu einem deutlichen Rückgang an elektrostatischer Stabilisierung der Latexpartikel, was sich bei höher konzentrierten Dispersionen teilweise in einem Ausflocken der Partikel bemerkbar machte. Aufgrund des hohen Adsorptionsgrads von BSA an *quenched brush*-Systemen, was zu einer niedrigen Konzentration an freiem Protein in Lösung führt, sind entsprechende Adsorptionsisothermen deutlich schwieriger zugänglich. So ergaben sich erst bei einem Salzzusatz von mindestens 100 mM Natriumchlorid quantitativ modellierbare Isothermen ohne allzu starke Abweichungen der Werte von der Fitkurve (s. Abb. IV.23). Dabei ist deutlich zu erkennen, dass System KpSS2 auch Proteinadsorption bei höheren Ionenstärken zulässt. Zum einen erfolgt hier der Übergang zum *salted brush* aufgrund der höheren Ladung des Systems wahrscheinlich bei höherer Ionenstärke. Die eigentliche Ursache dürften allerdings hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Polystyrolsulfonatketten und hydrophoben Bereichen des Proteins sein, zumal dies die beobachtete Adsorption im Bereich des *salted brush* erklären würde. Ein weiterer Erklärungsansatz wären Strukturänderungen des Proteins bedingt durch den niedrigen *pH*-Wert innerhalb des *quenched brush*. So wurden beispielsweise bei der Wechselwirkung von BSA mit *quenched brushes* stärkere Strukturänderungen beobachtet als im Falle von *annealed brushes* (s. Kap. IV.6.1.3).

#### IV.4.4 Einfluss des *pH*-Wertes

BSA besitzt einen isoelektrischen Punkt von 5,1 (Cantarero *et al.* 1980). An diesem Punkt wirkt das Protein nach außen elektrisch neutral, d.h. die Anzahl positiv und negativ geladener *patches* entsprechen sich an diesem Punkt. Somit wäre hier der höchste Adsorptionsgrad zu erwarten, da keine elektrostatische Abstoßung zwischen Trägersystem und Gesamtprotein und auch zwischen den Proteinen untereinander vorliegt. Zur näheren Untersuchung der *pH*-Abhängigkeit des Adsorptionsgrades wurden entsprechende Experimente an einen *annealed brush* in 10 mM Acetatpuffer bei *pH* 4,0 sowie in 10 mM

MES-Puffer bei  $pH$  5,1, 6,1 und 7,2 durchgeführt. Die Ionenstärke wurde durch Zusatz entsprechender Mengen an Natriumchlorid zur Pufferlösung jeweils auf 12 mM eingestellt. Bei  $pH$  4,0 ist das Protein positiv geladen, die *brush*-Partikel aber negativ. Somit wäre aus elektrostatischen Gründen ein hoher Adsorptionsgrad zu vermuten. Allerdings war die experimentell beobachtete Wechselwirkung derart stark, dass ein sofortiges Ausflocken der Latexpartikel nach Proteinzugabe auftrat. Stabile BSA-beladene Dispersionen ließen sich nur erhalten, wenn das Protein ebenfalls negativ oder zumindest nach außen neutral geladen war ( $pH \geq pI$ ).



**Abb. IV.24:** Adsorptionsisothermen von BSA auf dem *annealed brush* KpS14 bei konstanter Ionenstärke (12 mM) aber unterschiedlichen  $pH$ -Werten (blau:  $pH$  5,1, rot:  $pH$  6,1, schwarz:  $pH$  7,2): Bei  $pH$ -Werten oberhalb des isoelektrischen Punkts des Proteins ( $pI = 5,1$ ; Cantarero *et al.* 1980) resultieren geringere Belegungsgrade aufgrund der zunehmenden elektrostatischen Abstoßung zwischen Protein und Substrat sowie den Proteinen untereinander. Die Linien entsprechen wiederum einer Fit-Anpassung der Werte nach Gleichung 3-7.

Die am bzw. oberhalb des isoelektrischen Punktes erhaltenen Adsorptionsisothermen (s. Abb. IV.24) bzw. die zugehörigen Adsorptionsparameter  $\tau_{ads, M}$  und  $z$  (s. Tab. IV.9) bestätigen, dass sowohl die Menge an adsorbiertem Protein, als auch die Bindungsstärke an die *brushes* am isoelektrischen Punkt am größten ist. Allgemein ist Proteinadsorption am

größten am isoelektrischen Punkt des Proteins. Lee *et al.* (1998) haben dies auf die fehlende elektrostatische Abstoßung am isoelektrischen Punkt zurückgeführt und die Adsorption einer rein hydrophoben Wechselwirkung zugeschrieben. Gemäß der Diskussion in Kapitel III.1.5 ist diese Beobachtung aber vielmehr auf eine elektrostatische Anziehung zwischen *brush*-Schicht und positiven *patches* auf der Proteinoberfläche zurückzuführen. Am isoelektrischen Punkt verschwindet lediglich die sonst zusätzlich auftretende Abstoßung zwischen *brush* und Gesamtprotein neben der Abstoßung der Proteine untereinander. Je nach Natur der Proteine können zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen auftreten. Jedoch können diese keinesfalls einen entscheidenden Beitrag im Falle von BSA darstellen, da sonst im Falle des *salted brush* bei hoher äußerer Ionenstärke die höchsten Adsorptionsgrade vorliegen müssten. Die in Abschnitt IV.5 vorgestellten Experimente belegen hingegen, dass eine Erhöhung der Ionenstärke nach erfolgter Adsorption zu einer gezielten Freisetzung der gebundenen Proteine genutzt werden kann.

**Tab. IV.9:** Adsorptionsparameter aus der Fit-Anpassung der Daten in Abb. IV.24 nach Gleichung 3-7 ( $n = 1$ ): Die Werte für  $\tau_{ads, M}$  und  $z$  sind ein Beleg für den hohen Adsorptionsgrad sowie die hohe Bindungsstärke an die *brushes* am isoelektrischen Punkt des Proteins ( $pI = 5,1$ ; Cantarero *et al.* 1980).

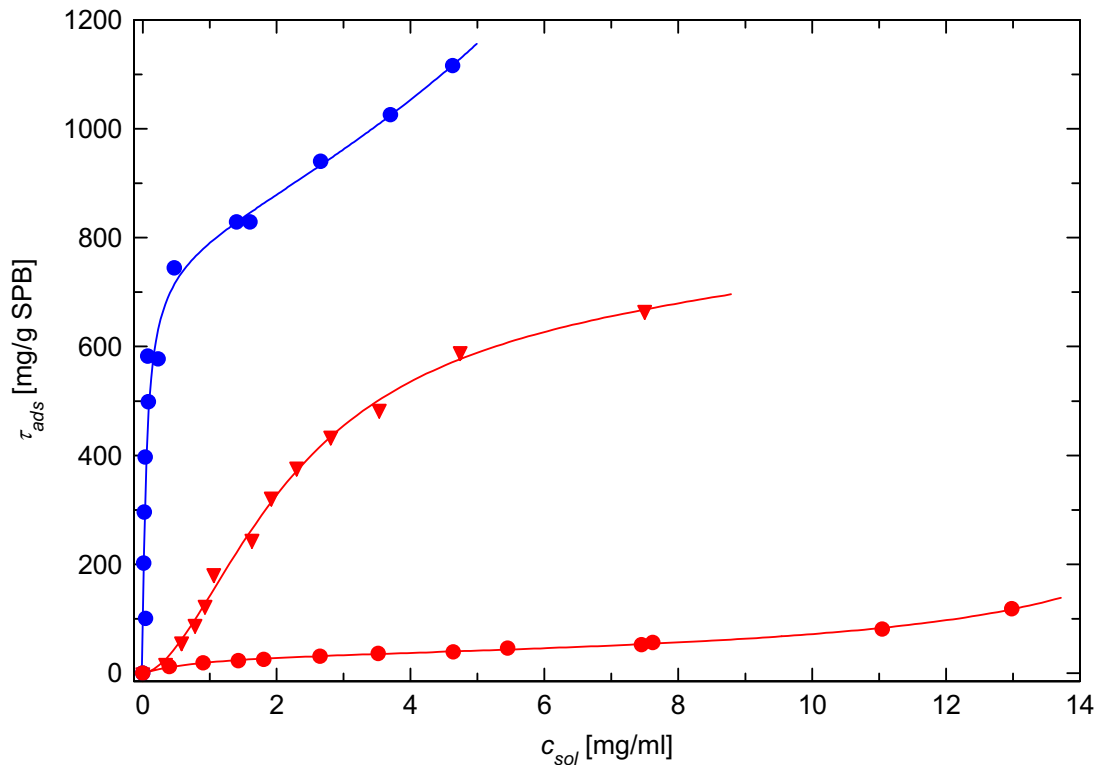
Latex	Konz. MES, $pH$	$\tau_{ads, M}$ [mg/g TP]	$z$	$w_{ads}$ [ml/mg]
KpS14	10 mM, $pH$ 5,1	$1020 \pm 40$	$1300 \pm 300$	$0,15 \pm 0,01$
KpS14	10 mM, $pH$ 6,1	$450 \pm 10$	$160 \pm 20$	$0,086 \pm 0,004$
KpS14	10 mM, $pH$ 7,2	undefiniert	undefiniert	$\rightarrow 0$

#### IV.4.5 Einfluss des Proteins

Das Konzept der Proteinadsorption auf Polyelektrolytbürsten, welches bisher modellhaft anhand von BSA untersucht wurde, soll im folgenden an weiteren Proteinen überprüft werden. Da eine Wechselwirkung der Proteine mit der negativ geladenen *brush*-Schicht nur über positiv geladene Bereiche an der Proteinoberfläche möglich ist (vgl. Kap. III.1.5), hängt die Adsorption empfindlich von der Oberflächenladung des Proteins und damit auch vom  $pH$ -Wert des Dispersionsmediums ab. Aus diesem Grunde wurde zunächst die Adsorption der Proteine  $\alpha$ -Amylase,  $\beta$ -Lactoglobulin und BSA auf einem *quenched brush* (KpSS2) untersucht. Diesen Proteinen ist ein isoelektrischer Punkt von etwa 5 (s. Tab. IV.6) gemeinsam. In einem weiteren Experiment wurde Glucoamylase mit einem isoelektrischen Punkt von 3,5 eingesetzt. Sämtliche Experimente wurden bei einem  $pH$ -Wert von 6,1 durchgeführt, wodurch die Proteine negativ geladen vorlagen. Es wurden



jeweils 80 mg Protein mit 100 mg Trägerpartikeln in 9,82 g 10 mM MES-Puffer versetzt. Nach Abtrennung des freien Proteins ergab sich, dass lediglich 40 mg  $\alpha$ -Amylase (5 %) pro Gramm KpSS2-Partikel gebunden wurden. Dagegen wurden 170 mg Glucoamylase (21 %), 398 mg BLG (50 %) sowie 731 mg BSA (94 %) adsorbiert.



**Abb. IV.25:** Adsorptionsisothermen von BSA (blau) und BLG (rot) auf dem *annealed brush* KpS14 (kreisförmige Symbole) und dem *quenched brush* KpSS2 (Dreiecke): Die Experimente wurden in 10 mM MES-Pufferlösung ( $pH$  6,1) durchgeführt. BSA zeigt gegenüber BLG eine wesentlich stärkere Affinität zu *annealed brushes*. Geht man vom *annealed brush* zum *quenched brush* über, lässt sich im Falle vom BLG der Adsorptionsgrad um ein Mehrfaches steigern. Die Linien entsprechen einer Fit-Anpassung der Werte nach Gleichung 3-7 (BSA) bzw. 3-10 (BLG) (Fitparameter s. Tab. IV.10).

Die unterschiedlich ausgeprägte Affinität der einzelnen Proteine zu den *brush*-Partikeln kann zum einen über die unterschiedliche Oberflächenladungsverteilung der Proteine bei vergleichbarem isoelektrischen Punkt hervorgerufen werden. Zum anderen kann die unterschiedliche Stabilität der nativen Proteinkonformation eine entscheidende Rolle spielen: So wurde im Falle von BSA, welches die höchsten Adsorptionsgrade aufwies, eine stark veränderte Tertiärstruktur bei einem weitgehenden Erhalt der Sekundärstruktur im adsorbierten Zustand festgestellt (s. Kap. IV.6.4 bzw. IV.6.1.2).

Eine recht einfache Methode zur Trennung von Proteingemischen erscheint aufgrund der stark unterschiedlich ausgeprägten Wechselwirkung von Proteinmolekülen mit Polyelektrolytbürsten möglich. Über Salzzugabe kann wiederum eine Rückgewinnung der gebundenen Proteine erfolgen. In diesem Zusammenhang ist die hohe Affinität von Albumin zu den Partikeln hervorzuheben, da dieses Protein das am häufigsten vorkommende Serumprotein darstellt und somit zur Isolierung anderer Proteine zunächst die Abtrennung von Albumin erforderlich ist.

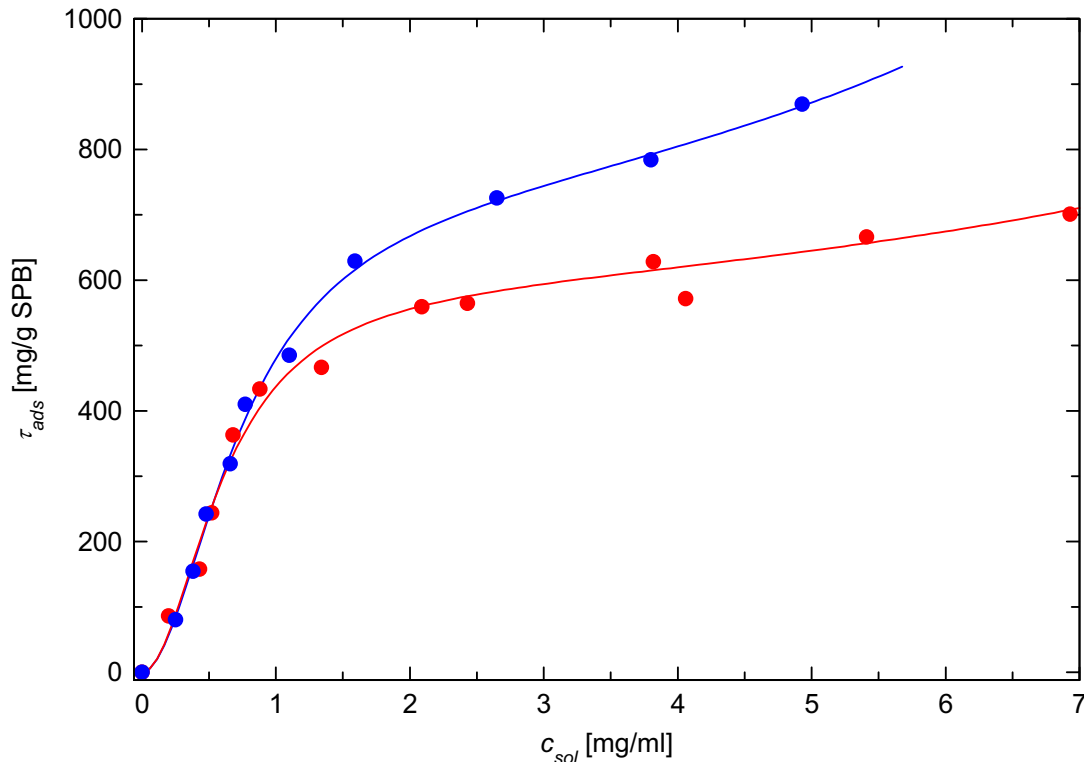
Nach den punktuellen Untersuchungen an dem *quenched brush*-System wurden systematische Studien am *annealed brush* KpS13 durchgeführt. Abbildung IV.25 gibt die dabei erhaltenen Adsorptionsisothermen für die Proteine BSA und BLG wieder. Wie auch schon im Falle der *quenched brushes* zu erkennen war, zeigt BLG ebenfalls eine deutlich schwächere Affinität zu den *annealed brushes* als BSA. Dies drückt sich in kleineren Belegungsgraden sowie einer geringeren Bindungsstärke des Proteins an das Substrat aus (s. Parameter  $\tau_{ads, M}$  bzw.  $z$ , Tab. IV.10).

**Tab. IV.10:** Adsorptionsparameter aus der Fit-Anpassung der Daten in Abb. IV.25 nach Gleichung 3-7 ( $n = 1$ ) bzw. 3-10: Die Werte für  $\tau_{ads, M}$  und  $z$  spiegeln den größeren Adsorptionsgrad sowie die höhere Bindungsstärke von BSA gegenüber BLG auf dem *annealed brush* KpS14 wieder. Die Menge an adsorbiertem BLG lässt sich bei Verwendung eines *quenched brush*-Systems (KpSS2) um ein Mehrfaches steigern.

Latex	Protein	$\tau_{ads, M}$ [mg/g TP]	$z$	$w_{ads}$ [ml/mg]	$n$
KpS14	BSA	$770 \pm 60$	$280 \pm 70$	$0,07 \pm 0,02$	1
KpS14	BLG	$34 \pm 5$	$30 \pm 10$	$0,05 \pm 0,01$	$0,9 \pm 0,1$
KpSS2	BLG	$710 \pm 100$	$(200 \pm 300)$	$(0,001 \pm 0,002)$	$0,6 \pm 0,5$

Vergleicht man die Adsorption von BLG auf *annealed* und *quenched brushes* (s. Abb. IV.25) miteinander, so zeigt sich – wie schon bei BSA – die deutlich stärkere Wechselwirkung des Proteins mit *quenched brushes*. Dies resultiert in einem 21-fach höheren Adsorptionsparameter  $\tau_{ads, M}$  (s. Tab. IV.10). Ein Effekt dieser Größenordnung kann nicht durch Unterschiede in der räumlichen Struktur der beiden *brush*-Systeme, sondern nur über die Natur der beteiligten Polyelektrolytketten verstanden werden (s. Kap. IV.2.2). Die Adsorptionsisothermen in Abb. IV.25 lassen sich beide ausgezeichnet mit dem in Kapitel III.1.6 vorgestellten Adsorptionsmodell (s. Glg. 3-10) beschreiben, welches eine Abhängigkeit der Adsorptionsenergie vom Belegungsgrad zulässt. Das vereinfachte Modell nach Gleichung 3-7, welches eine konstante Adsorptionsenergie vorsieht, erlaubt ebenfalls eine gute Beschreibung der Adsorption von BLG auf *annealed brushes*. Im Gegensatz zu BSA versagt dieses Modell allerdings bei *quenched brushes*. In diesem Fall zeigt der Adsorptionsgrad den Verlauf einer Langmuir-Freundlich-Isotherme (s. Glg. 3-12). Aufgrund der globulären Struktur des Proteins scheint bei dem hohen Adsorptions-

grad ( $\tau_{ads, M} = 710 \text{ mg BLG / g KpSS2}$ , s. Tab. IV.10) eine weitere Adsorption von der bereits vorhandenen Belegung an Protein abhängig zu werden. Dies scheint im Parameter  $n$  von 0,6 (s. Tab. IV.10) Ausdruck zu finden, wobei der relativ hohe Fehler bei der Ableitung dieses Parameters keine zweifelsfreie Aussage zulässt.



**Abb. IV.26:** Adsorption von RNase A auf *quenched brushes* unterschiedlicher Morphologie in 10 mM CHES-Puffer ( $pH$  9,3): Als Trägersysteme dienen die PS/PSS-Kern-Schale-Latices KpSS2 (blau) und KpSS1 (rot). Der höhere Adsorptionsgrad auf den KpSS2-Partikeln ist auf die höhere Schalendicke (KpSS2) zurückzuführen. Die Linien entsprechen einer Fit-Anpassung der Werte nach Gleichung 3-10 (Fitparameter s. Tab. IV.11).

RNase A bietet sich aufgrund seines reversiblen Entfaltungsverhaltens (s. IV.6.2) zur Untersuchung der Proteinfaltung an (Raines 1998). Zur Durchführung derartiger Studien am adsorbierten Protein mußte untersucht werden, ob dieses Protein in ausreichenden Mengen auf *brushes* bindet. Das Protein weist einen isoelektrischen Punkt von 9,6 (Tanford *et al.* 1956) auf, wäre somit in 10 mM MES-Puffer ( $pH$  6,1) stark positiv geladen. Dies würde zu einem Ausflocken der Latexpartikel führen, wie es experimentell im Fall von Lysozym ( $pI = 11$ , Lvov *et al.* 1996) festgestellt wurde (vgl. IV.4.4). Daher wurden die folgenden Experimente in 10 mM CHES-Puffer ( $pH$  9,3) durchgeführt. Da der gewählte  $pH$ -Wert nahezu dem isoelektrischen Punkt des Proteins entspricht, sollte eine

maximale Belegung an Protein erfolgen. Es wurden zunächst jeweils 78 mg des Proteins mit 100 mg Latexpartikeln in 9,82 g Pufferlösung inkubiert. Nach Abtrennung des nicht-gebundenen Proteins wurde ein Adsorptionsgrad von 525 mg RNase A (68 %) auf einem Gramm des *quenched brush* KpSS1 festgestellt. Auf dem *annealed brush* KpS15 konnten hingegen lediglich 8 % des eingesetzten Proteins (61 mg pro g KpS15-Partikel) adsorptiv gebunden werden. Dies bestätigt erneut die stärkere Wechselwirkung von Proteinen mit *quenched brushes*. Auf eine weitergehende Untersuchung der Adsorption des Proteins auf *annealed brushes* wurde aufgrund des geringen Belegungsgrads verzichtet.

Bei *quenched brushes* hingegen erlaubt der hohe Grad an adsorbiertem Protein die Untersuchung der temperaturinduzierten Entfaltung der Proteinstruktur (s. IV.6.2). Aus diesem Grunde wurde in diesem Fall die Adsorptionsstudien durch zusätzliche Experimente ergänzt. Abbildung IV.26 zeigt die zu den *quenched brush*-Systemen KpSS1 und KpSS2 zugehörigen Adsorptionsisothermen. In Analogie zu den Untersuchungen bei BSA ist beim System größerer Schalendicke (KpSS2) eine höhere Proteinbelegung zu beobachten.

Während im Falle des flexiblen Proteins BSA eine hervorragende Beschreibung des Adsorptionsgrads nach Gleichung 3-7 ( $n = 1$ , s. Kap. III.1.6) erzielt wurde, war dies im Falle des globulären Proteins RNase A nicht möglich. Abhilfe schaffte hier eine Beschreibung der Daten nach Gleichung 3-10 (s. Abb. IV.26). Der aus der Fit-Anpassung erhaltene Wert für  $n$  von 0,5 (s. Tab. IV.11) weist auf eine logarithmische Abnahme der Adsorptionswärme mit der Belegung an Protein hin. Dies ist wiederum auf die besonders hohe Konformationsstabilität des Proteins (Baron *et al.* 1999, Servagent-Noinville *et al.* 2000) zurückzuführen. Aus diesem Grunde ist eine Fit-Anpassung nach Gleichung 3-7 mit  $n = 1$  wie für das flexible Protein BSA hier unzureichend.

Weiter ergibt sich aus der Fit-Anpassung (s. Tab. IV.11), dass im Falle des Systems höherer Schalendicke (KpSS2) ein höherer Belegungsgrad  $\tau_{ads, M}$  möglich ist. Dies erfolgt aber auf Kosten der Bindungsstärke des Proteins an das Substrat (s. Parameter  $z$  in Tab. IV.11).

**Tab. IV.11:** Adsorptionsparameter aus der Fit-Anpassung der Daten in Abb. IV.26 nach Gleichung 3-10: Das System KpSS2 weist aufgrund seines größeren *brush*-Volumens ein höheres Proteinbindungsvermögen auf (s. Parameter  $\tau_{ads, M}$ ). Jedoch ist die Wechselwirkung mit dem Protein stärker im Falle des kurzkettigeren Systems KpSS1 (s. Parameter  $z$ ). Aus dem Parameter  $n < 1$  ergibt sich eine Abhängigkeit der Adsorptionswärme vom Belegungsgrad, was auf die hohe Stabilität des globulären Proteins zurückzuführen ist.

Latex	Protein	$\tau_{ads, M}$ [mg/g TP]	$z$	$w_{ads}$ [ml/mg]	$n$
KpSS1	RNase A	600 ± 30	800 ± 400	0,004 ± 0,002	0,51 ± 0,07
KpSS2	RNase A	740 ± 30	230 ± 60	0,008 ± 0,002	0,53 ± 0,04

Der beobachtete Effekt der Proteinadsorption auf Polyelektrolytbürsten ist somit nicht auf BSA beschränkt, wenn auch hierbei die höchste Affinität aller untersuchten Proteine feststellbar war. Im folgenden Kapitel soll nun untersucht werden, inwieweit Proteine durch gezielte Veränderung äußerer Parameter wieder von den *brushes* freigesetzt werden können. Neben der beobachteten unterschiedlichen Affinität der Proteine zu den *brush*-Partikeln stellt dies ein wichtiges Kriterium zur Auftrennung von Proteingemischen dar.

#### IV.5 Freisetzung adsorbierter Proteine

Wie die Adsorptionsexperimente im vorangehenden Kapitel gezeigt haben, lässt sich der Adsorptionsgrad gezielt über die Ionenstärke bzw. den *pH*-Wert steuern. So konnte beispielsweise bei der Adsorption von BSA auf *annealed brushes* ein hoher Adsorptionsgrad bei geringer äußerer Ionenstärke erzielt werden. Im Bereich des *salted brush* bei Ionenstärken über 100 mM war hingegen nur eine vergleichsweise geringe Adsorption zu verzeichnen. Daher stellt sich die Frage, ob dieser Effekt im Umkehrschluss zur kontrollierten Freisetzung der adsorbierten Proteine genutzt werden kann.

Hierzu wurde BSA auf dem *annealed brush* KpS15 und dem *quenched brush* KpSS2 in 10 mM MES-Puffer (*pH* 6,1) ohne weiteren Fremdsalzzusatz adsorbiert. Der überschüssige freie Proteinanteil wurde wiederum durch Ultrafiltration gegen frische Pufferlösung abgetrennt. Über die Menge des abgetrennten Proteins wurde der Adsorptionsgrad der Proteinbeladenen *brush*-Partikel ermittelt (s. VI.2.3). Die derart behandelte Suspensionen dienten als Ausgangssysteme für die anschließenden Desorptionsversuche.

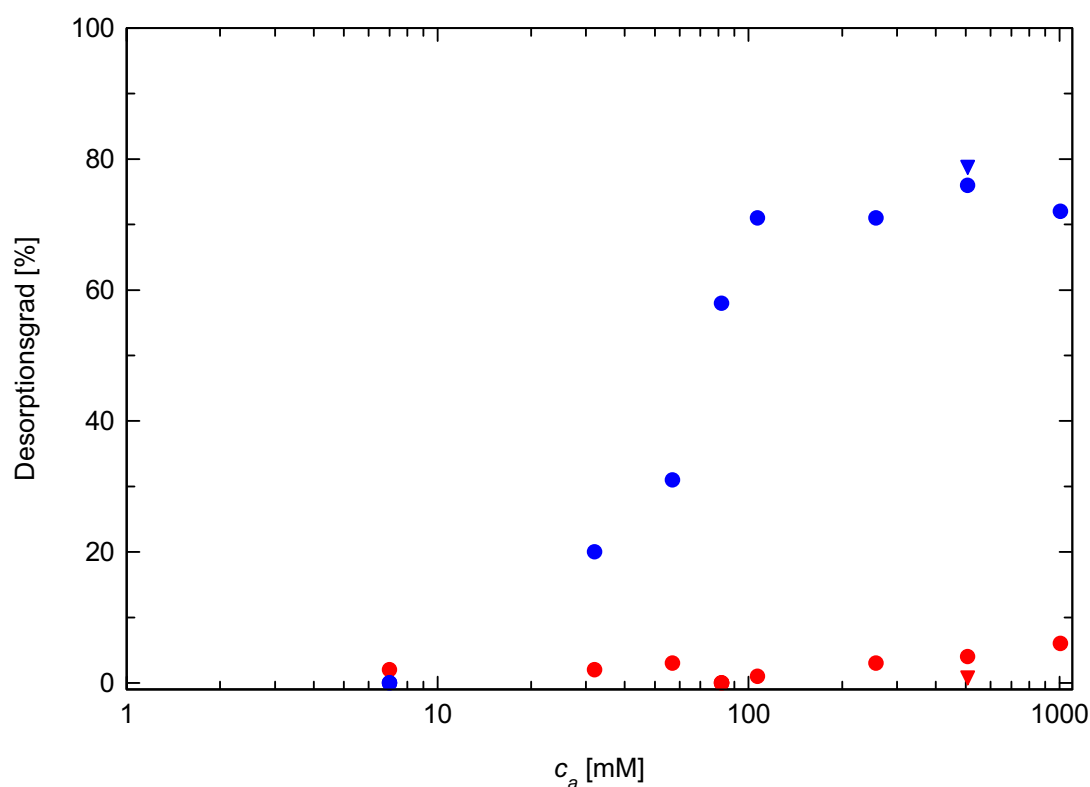
Hierzu wurde eine Ultrafiltration gegen 10 mM MES-Puffer (*pH* 6,1) durchgeführt, welchem eine NaCl-Konzentration von 500 mM zugesetzt wurde (s. VI.2.3). Die gewählte Ionenstärke stellt sicher, dass die *brushes* in den *salted brush* übergehen, welcher in den Adsorptionsexperimenten im Falle der *annealed brushes* nur eine geringe Proteinadsorption zuließ (s. Kap. IV.4.2). Auf diese Weise ließen sich 76 % der 948 mg BSA, welche pro Gramm des *annealed brush* KpS15 gebunden wurden, wieder freisetzen. Im Falle des *quenched brush* KpSS2 ließen sich hingegen nur 12 % der 688 mg BSA pro Gramm Latexpartikel wieder durch die Erhöhung der Ionenstärke desorbieren.

Somit sind die Desorptionsstudien mit den Adsorptionsexperimenten konform, bei welchen eine stärkere Wechselwirkung des Proteins mit *quenched brushes* beobachtet wurde (s. IV.4.3). Zumal bei letzteren sogar im Bereich des *salted brush* noch relativ hohe Belegungsgrade an Protein festgestellt wurden (vgl. Abb. IV.23).

BLG lässt sich auf *quenched brushes* in relativ hohen Mengen adsorptiv binden, wobei die Stärke der Wechselwirkung allerdings wesentlich niedriger ist als im Falle von BSA (s.

Abb. IV.25). Daher bot sich eine Untersuchung an, ob eine geringere Wechselwirkung mit dem Substrat auch eine effizientere Wiederfreisetzung des Proteins bei einem Heraufsetzen der Ionenstärke zur Folge hat. In der Tat ließen sich 92 % der adsorbierten 836 mg Protein pro Gramm KpSS2-Partikel desorbieren.

Die Ergebnisse der Desorptionsstudien ergänzen sich somit in ausgezeichneter Weise mit den Adsorptionsexperimenten. Die desorbierten Proteine wurden nach Befreiung von der Salzfracht (s. VI.2.3) einer Sekundärstrukturanalyse zur Bestimmung adsorptionsbedingter struktureller Veränderungen unterzogen (s. Kap. IV.6).



**Abb. IV.27:** Prozentualer Desorptionsgrad von auf dem *annealed brush* KpS15 adsorbierten BSA als Funktion der äußeren Ionenstärke bei  $pH$  5,1 (blaue Kreise): Bei Erhöhung der Ionenstärke ist eine zunehmende Desorption an Protein zu verzeichnen. Zu Beginn des Übergangs zum *salted brush* ( $c_a \approx 100$  mM) erfolgt eine sprunghafte Freisetzung des adsorbierten Proteins. Bei weiterer Erhöhung der Ionenstärke bleibt der Desorptionsgrad konstant. Bei einem herkömmlichen carboxylierten Polystyrol-Latex (PSAA, rote Kreise) ist keine Desorption des Proteins feststellbar. Eine gleichzeitige Erhöhung des  $pH$ -Werts auf 9,1 bei einer Ionenstärke von 507 mM (blaues und rotes Dreieck) führt in beiden Fällen zu keinem zusätzlichen Anstieg des Desorptionsgrads.

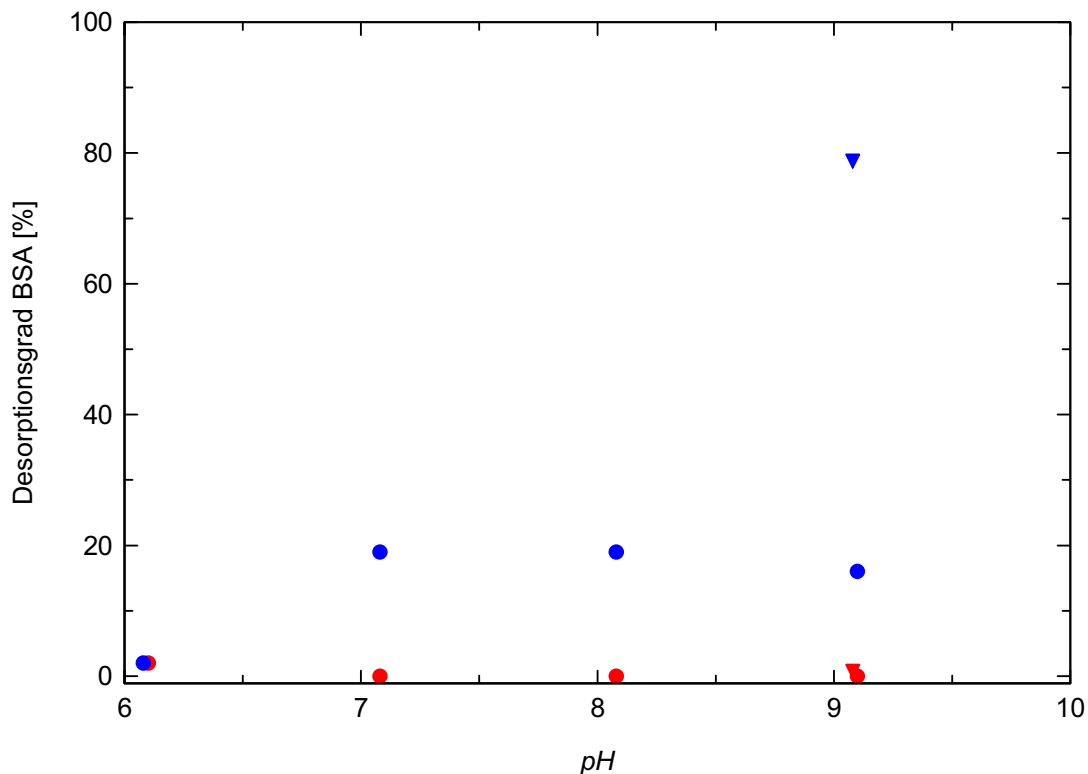
In den bisherigen Experimenten wurde zur Freisetzung der adsorbierten Proteine eine konstante Ionenstärke von 507 mM gewählt, um sicher zu gehen, dass die *brushes* als

*salted brush* vorliegen. Zudem sollte ein maximaler Desorptionsgrad bei einer derart hohen Ionenstärke zu erwarten sein. Zur genaueren Untersuchung der Abhängigkeit der desorbierten Proteinmenge von der Ionenstärke wurde eine Suspension des *annealed brush* KpS15 eingesetzt, auf welchem zuvor 948 mg BSA pro Gramm Latexpartikel adsorbiert wurden. Mehrere Proben dieser Ausgangssuspension wurden nun gegen 10 mM MES-Puffer (*pH* 6,1), welchem unterschiedliche Mengen an Natriumchlorid zugesetzt wurden, unter achtmaligem Austausch des Dispersionsmediums ultrafiltriert. Zusätzlich wurde ein Referenzexperiment in der Pufferlösung ohne weiteren Salzzusatz durchgeführt. Abbildung IV.27 gibt den jeweils erhaltenen prozentualen Anteil des desorbierten Proteins an. Bei sukzessiver Erhöhung der Ionenstärke im Bereich des *osmotic brush* (Ionenstärke < 100 mM) ist ein allmählicher Anstieg des Desorptionsgrads zu verzeichnen, welcher bei Ionenstärken zwischen 60 und 100 mM sprunghaft zunimmt. Die sprunghafte Freisetzung des Proteins setzt somit zu Beginn des Übergangs zum *salted brush* ein. Nach Übergang in den *salted brush* ist bereits der maximal mögliche Desorptionsgrad von 70 – 80 % erreicht. Eine weitere Erhöhung der Ionenstärke führt zu keiner Steigerung des Desorptionsgrads.

Selbst bei hoher Ionenstärke verbleiben 20 – 30 % des Proteins adsorptiv gebunden. Eine entsprechende Beobachtung wurde auch schon bei den Adsorptionsversuchen (s. Abb. IV.20) gemacht, wobei die Menge an gebundenem Protein hierbei geringer ausfiel. Der Unterschied könnte eventuell durch einen Einschluss eines Teils des Proteins beim Schrumpfen der Polyelektrolytschale bei hoher Ionenstärke bedingt sein, zumal die Abstoßung zwischen den Proteinmolekülen untereinander zurückgeht. Dieser Effekt scheint auch mit der Bindungsstärke des Proteins an das Substrat zusammenzuhängen, da im Falle des schwächer gebundenen BLG 92 % des auf *quenched brushes* adsorbierten Proteins wieder freigesetzt werden konnte.

Referenzexperimente am carboxylierten Polystyrol-Latex PSAA bestätigen die Vermutung, dass es sich bei der Freisetzung der Proteine von den *brushes* um eine herausragende Eigenschaft der *brushes* handelt, welche an herkömmlichen, an der Partikeloberfläche carboxylierten Systemen (Bangs Laboratories 1999) nicht feststellbar ist (s. Abb. IV.27). Bei letzteren verbleibt das Protein stets adsorbiert. Eine Erhöhung der Ionenstärke sollte hier sogar zu einer stärkeren Anbindung führen, da sowohl die elektrostatische Abstoßung des Proteins zum gleichnamig geladenen Substrat, als auch der Proteinmolekülen untereinander abnimmt. Im Falle der *brushes* hingegen werden bei Fremdsalzzusatz die bei der Adsorption des Proteins freigesetzten Gegenionen der *brush*-Ketten und des Proteins (s. Kap. III.1.5) wieder zugeführt. Damit wird die „*counterion release force*“ als Haupttriebkraft des Adsorptionsprozess aufgehoben.

Wie Abbildung IV.27 weiter zu entnehmen ist, kann bei gleichzeitiger Erhöhung von *pH*-Wert und Ionenstärke kein wesentlicher Zugewinn an freigesetztem Protein im Vergleich zu einer ausschließlichen Erhöhung der Ionenstärke erzielt werden.



**Abb. IV.28:** Prozentualer Desorptionsgrad von auf dem *annealed brush* KpS15 adsorbierten BSA als Funktion des äußeren *pH*-Werts (blaue Kreise): Bei *pH*-Erhöhung oberhalb 7,1 werden bis zu 20 % des adsorbierten Proteins freigesetzt. Dagegen ist bei dem herkömmlichen carboxylierten Polystyrol-Latex PSAA (rote Kreise) keine Freisetzung von Protein bei *pH*-Änderung festzustellen. Eine gleichzeitige Erhöhung des *pH*-Werts auf 9,1 bei einer Ionenstärke von 507 mM führt im Falle des auf dem *brush* adsorbierten BSA zu einer Freisetzung eines Großteils des Proteins (blaues Dreieck). Hingegen zeigt sich keinerlei Änderung im Falle des Systems PSAA (rotes Dreieck).

Neben der Ionenstärke beeinflusst der *pH*-Wert die Menge an gebundenem Protein (s. Abb. IV.24). Daher wurde ebenfalls untersucht, inwiefern eine *pH*-Änderung eine Wiederfreisetzung der adsorbierten Proteine bewirken kann. Die Vorgehensweise war dabei analog zu den oben skizzierten Experimenten, wobei die Suspensionen jeweils gegen 7 mM Natriumchlorid-Lösungen mit *pH* 6,1 – 9,1 ultrafiltriert wurden. Bei Erhöhung des *pH*-Werts des Dispersionsmediums um eine *pH*-Einheit gegenüber der Pufferlösung wurden bis zu 20 % des adsorbierten Proteins freigesetzt (s. Abb. IV.28). Weitere *pH*-Erhöhung bewirkte keine stärkere Desorption. BSA wird mit zunehmendem *pH*-Wert oberhalb des isoelektrischen Punkts von 5,1 (Cantarero *et al.* 1980) stärker negativ geladen. Somit sollte die *pH*-Erhöhung zum einen eine stärkere elektrostatische Abstoßung des Gesamtproteins vom ebenfalls negativ geladenen *brush* zur Folge haben. Zum anderen wird ebenfalls die elektrostatische Abstoßung der Proteine untereinander erhöht. Schwächer gebundene



Proteine, besonders diejenigen, welche in der Peripherie des *brush* lokalisiert sind und nur mit einzelnen Polyelektrolytketten wechselwirken, könnten durch die zusätzliche Abschwächung der Bindung an das Substrat freigesetzt werden. Dies würde erklären, wieso eine Fraktion von 20 % des Proteins desorbiert wird. Erst eine zusätzliche Erhöhung der Ionenstärke auf 507 mM führt aus den oben diskutierten Gründen zu einer Freisetzung von 79 % des adsorbierten BSA (s. Abb. IV.28).

Die Vergleichsexperimente am carboxylierten Polystyrol-Latex PSAA zeigen wiederum keine Änderung des Adsorptionsgrad bei Änderung des *pH*-Werts. Dies ist auf die starke hydrophobe Wechselwirkung des Proteins mit der Polystyrol-Oberfläche zurückzuführen. Letztere ist mit einer starken Deformation der nativen Proteinstruktur auf der Substratoberfläche verbunden (Wertz *et al.* 2001, 2002). Die Freisetzung eines zumindest teildenaturierten Proteins bei *pH*-Erhöhung erscheint deshalb wenig wahrscheinlich, was in den Experimenten Ausdruck findet.

## IV.6 Untersuchung der Konformation der adsorbierten Proteine

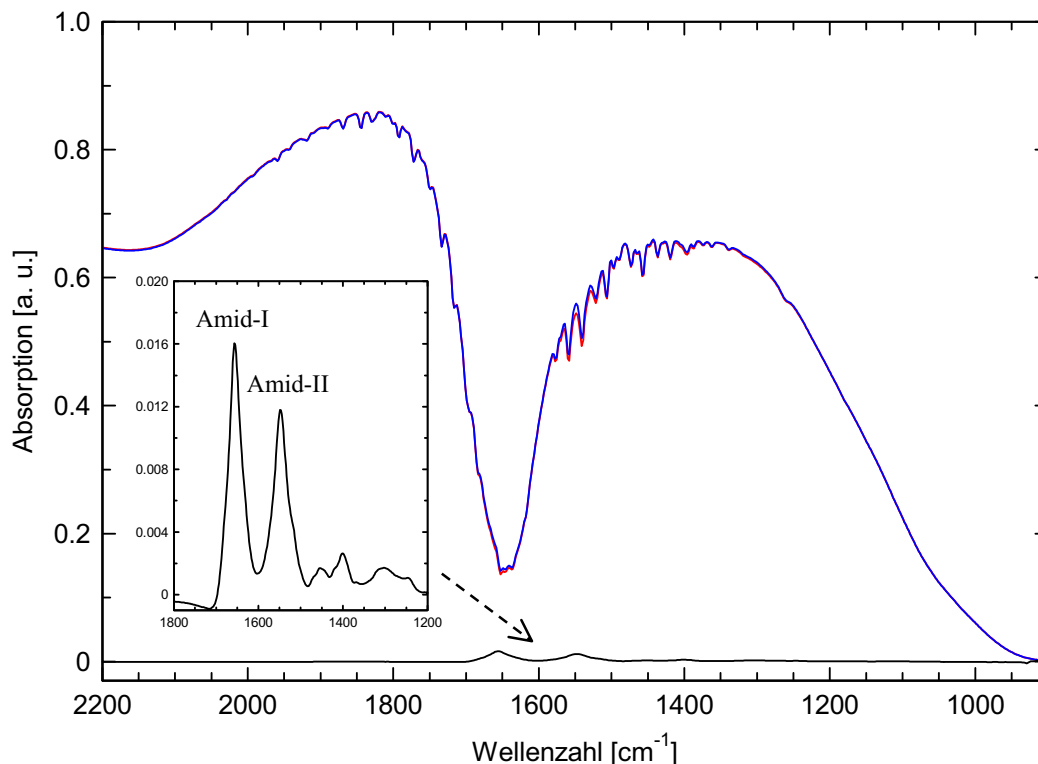
### IV.6.1 Analyse der Sekundärstruktur mittels FT-IR-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur der Proteine sowohl vor Beginn der eigentlichen Adsorptionsexperimente, als auch im adsorbierten Zustand wurde ein kommerzielles FT-Infrarotspektrometer (Bruker Optik Tensor 27) mit einer Flüssigkeitszelle von 6,5  $\mu\text{m}$  Schichtdicke (Aquaspec<sup>TM</sup> AS 1100 M) eingesetzt (s. VI.3.8). Die Ableitung der Sekundärstruktur aus der Amid-I-Bande der Proteinspektren erfolgte über ein Softwarepaket, welches auf einer PLS-Analyse beruht (s. Kapitel III.2.1).

#### IV.6.1.1 Proteine in Pufferlösung

Wie bereits in Kapitel III.2.1 angesprochen, hängt die Qualität der Sekundärstrukturanalyse in  $\text{H}_2\text{O}$  entscheidend vom sauberen Abzug des Wasserspektrums als Referenz ab, da sich Probe- und Referenzspektrum infolge der hohen Absorption des Wassers nur geringfügig unterscheiden (s. Abb. IV.29). Temperaturabweichungen sowie Änderungen in der Schichtdicke der Küvette zwischen Probe- und Referenzmessungen haben Vertikal-

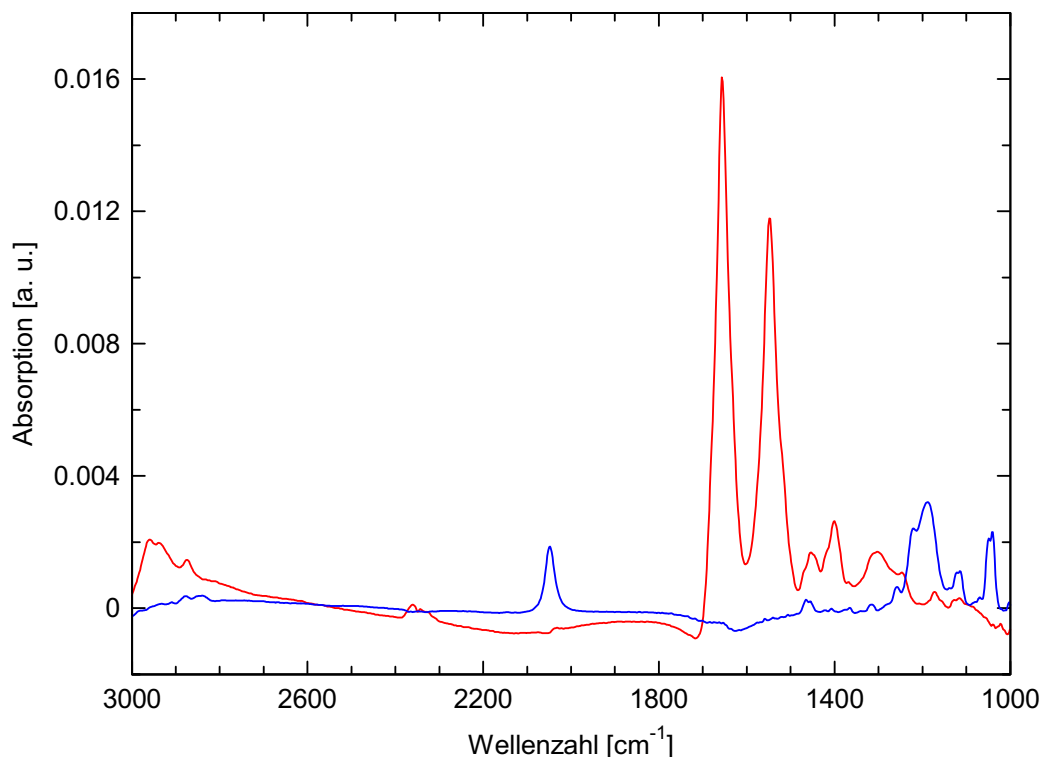
bzw. Höhenversetzungen der Spektren zur Folge. Der hier eingesetzte Versuchsaufbau gewährt die Einhaltung geringer Temperaturtoleranzen von kleiner 0,1 K, eine geringe Schichtdickenvariabilität von unter 0,1 % sowie eine automatische Wasserdampf-kompensation (s. VI.3.8). Hierdurch wird ein Zugang zu ausgezeichneten Proteinspektren ermöglicht (s. Abb. IV.30), sofern ein Konzentrationsbereich von 5 – 20 mg/ml an Protein eingehalten wird.



**Abb. IV.29:** Infrarotspektroskopie an gelöstem Protein anhand des Beispiels von in 10 mM MES-Puffer ( $pH$  6,1) gelöstem BSA (20 mg/ml). Die IR-Spektren von Probe- (rot) sowie Referenzlösung (blau) erscheinen in Anbetracht der dominierenden Wasserabsorption nahezu deckungsgleich. Dennoch ergibt sich als Differenz ein störungsfreies Spektrum des reinen Proteins (schwarz) mit klar erkennbarer Amid-I- und Amid-II-Bande (s. Inset sowie Abb. IV.30).

Zur einer, wie von Dousseau *et al.* (1990) geforderten Kontrolle der experimentellen Methodik, aber auch zur Überprüfung der Qualität der Proteine, wurden die eingesetzten Proteine einer Sekundärstrukturanalyse unterzogen. Abbildung IV.30 zeigt exemplarisch für diese Versuchsreihe das Spektrum von BSA. Besonders markant treten hierbei die Amid-I-Bande im Bereich von  $1600\text{ cm}^{-1}$  sowie die Amid-II-Bande bei  $1480 - 1575\text{ cm}^{-1}$  hervor. Zum Vergleich wurde ein Spektrum der MES-Puffermoleküle aufgetragen, welches durch Messung der Pufferlösung gegen entionisiertes Wasser erhalten wurde. Im

Wellenzahlbereich der Amid-I-Region, welche zur Konformationsanalyse herangezogen wird, weisen die Spektren der Puffermoleküle keine Eigenabsorption auf. Lediglich die durch die Puffermoleküle bedingte geringfügige Abnahme an Wasser im Vergleich zur Referenz führt zu einem leichten Absenken des Spektrums unterhalb der Basislinie. Dies wird aber durch die Messung der Proteinlösung gegen die reine Pufferlösung als Referenz kompensiert. Entsprechendes gilt auch für sämtliche anderen untersuchten Proteine und Puffersysteme.



**Abb. IV.30:** Vergleich der Infrarotspektren von BSA (Sigma; rot) und 10 mM MES-Puffer (*pH* 6,1; blau) gemessen gegen H<sub>2</sub>O als Referenz. Im Bereich der Amid-I-Region des Proteins (1600 – 1700 cm<sup>-1</sup>) weist die Pufferlösung keine signifikanten Eigenabsorptionen auf.

In Tabelle IV.12 sind die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse der einzelnen Proteine zusammengefasst. Ein Vergleich des experimentell erhaltenen  $\alpha$ -Helix- bzw.  $\beta$ -Faltblattgehaltes mit aus Röntgenstrukturdaten erhaltenen Werten zeigt eine Übereinstimmung der einzelnen Werte unter Berücksichtigung des experimentellen Fehlers von  $\pm 4\%$  für den Helixgehalt sowie  $\pm 3\%$  für den Faltblattanteil (s. VI.4). Hieraus lässt sich zum einen die Eignung der eingesetzten Methodik, insbesondere die Sekundärstrukturbestimmung mittels PLS-Analyse, verifizieren. Des Weiteren lässt sich feststellen, dass die Proteine im nativen

Zustand vorlagen, da die erhaltenen Werte mit der nativen Sekundärstruktur der Proteine übereinstimmen.

**Tab. IV.12:** Sekundärstrukturanalyse der eingesetzten Proteine in wässriger Pufferlösung mittels FT-IR-Spektroskopie. Zum Vergleich sind in Klammern durch Röntgenstrukturanalyse gewonnene Referenzwerte (soweit vorhanden) angegeben, welche einer Proteindatenbank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>) entnommen wurden.

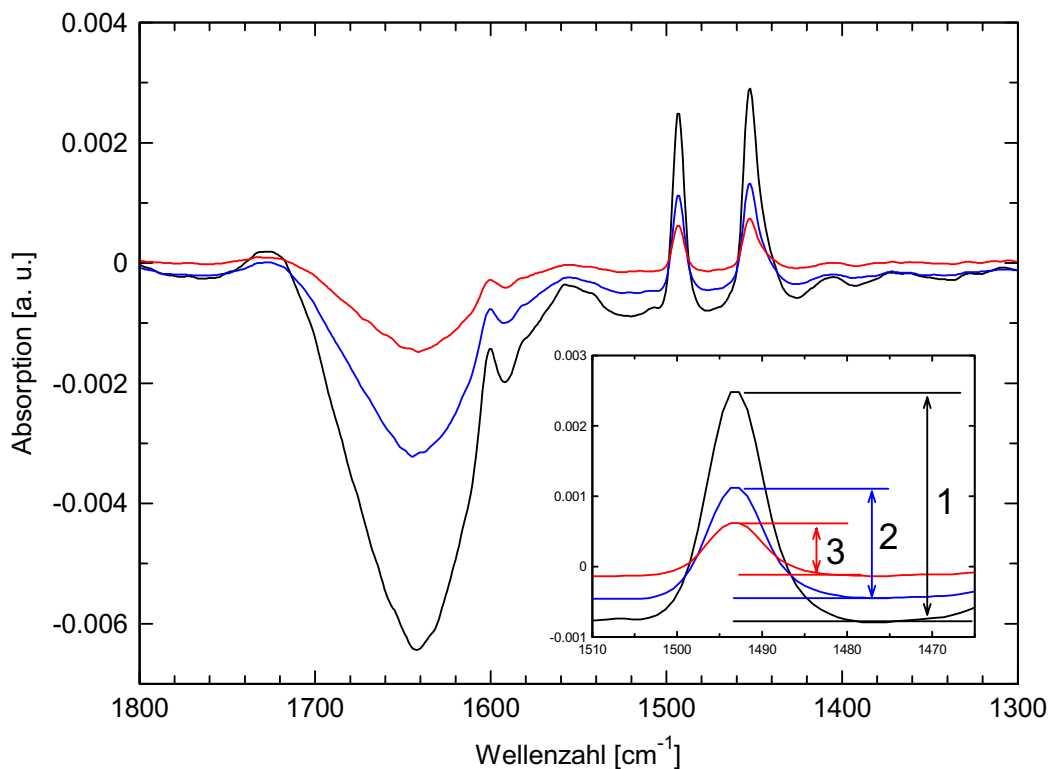
Protein (PDB-Code)	$\alpha$ -Helix [%]	$\beta$ -Faltblatt [%]
BSA, Sigma (1BM0)	67 (67,7)	2 (0,0)
FITC-BSA (1BM0)	66 (67,7)	4 (0,0)
BSA, Fluka (1BM0)	66 (67,7)	2 (0,0)
Dansyl-BSA1 (1BM0)	65 (67,7)	2 (0,0)
Dansyl-BSA2 (1BM0)	65 (67,7)	2 (0,0)
Myoglobin (1WLA)	71 (73,9)	2 (0,0)
Hämoglobin (4HHB)	70 (67,1- 68,8)	0 (0,0)
$\beta$ -Lactoglobulin (3BLG)	14 (12,4)	35 (36,4)
$\alpha$ -Amylase	35	29
Lysozym (1BB7)	33 (34,1)	4 (6,2)
Ribonuklease A (7RSA)	17 (17,7)	31 (31,5)

#### IV.6.1.2 BSA adsorbiert auf *annealed brushes*

Wie oben angesprochen dient die geringe Schichtdicke der Messzelle von 6,5  $\mu\text{m}$  zur Reduktion der Wasserabsorption. Bei Messungen in wässriger Suspension wird dadurch zusätzlich die Streuung des Infrarotlichts an den Latexpartikeln vernachlässigbar. Zur Überprüfung der Qualität von IR-Messungen in wässrigen Suspensionen wurden IR-Spektren einer Konzentrationsreihe von 0,35 – 1,41 Gew.-% des PS/PAA-Kern-Schale-Latex KpS14 in 10 mM MES-Puffer ( $pH$  6,1) als Dispersionsmedium aufgenommen (s. Abb. IV.31).

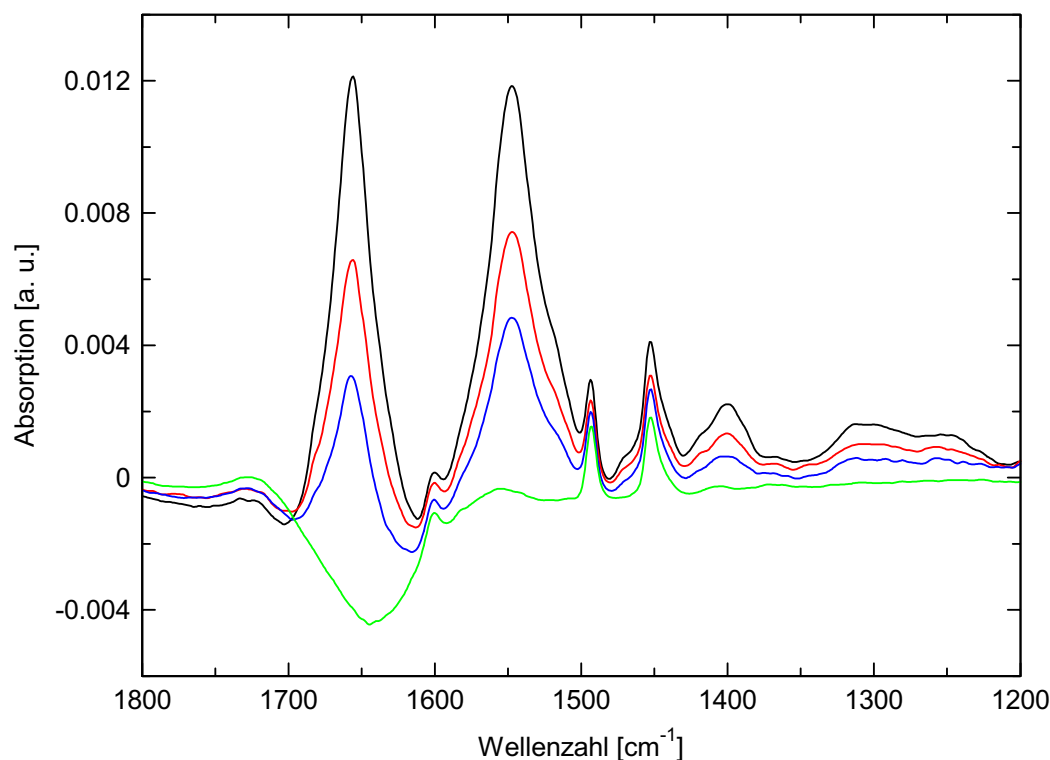
Bedingt durch das Eigenvolumen der Latexpartikel ist die Wassermenge in der Probe im Vergleich zur Pufferlösung geringer. Im Differenzspektrum äußert sich dies in einer negativen Bande im Bereich der Scherschwingung von  $\text{H}_2\text{O}$  ( $1645\text{ cm}^{-1}$ , Winter *et al.* 1998). Da diese Bande ein Maß für das Volumen der Latexpartikel darstellt, könnte sie zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden. Eine direkte Konzentrationsbestimmung kann über die Banden bei  $1580$  sowie  $1600\text{ cm}^{-1}$  erfolgen. Sie sind neben zwei

weiteren Banden bei 1452 und 1493  $\text{cm}^{-1}$  auf C=C-Streckschwingungen der aromatischen Gruppen des Polystyrol-Kerns zurückzuführen, wobei letztere durch die breite negative Bande bei 1645  $\text{cm}^{-1}$  überlagert werden und daher kaum hervortreten (s. Abb. IV.31). Sowohl die Fläche unter der Bande bei 1493  $\text{cm}^{-1}$ , als auch die Bandenhöhe sind proportional zur Teilchenzahl im untersuchten Konzentrationsbereich (vgl. Inset in Abb. IV.31). Daher könnte eine Konzentrationsbestimmung über das Lambert-Beer-Gesetz (s. VI.3.7) erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Auswertung der FT-IR-Spektren auf eine intrinsische Konzentrationsbestimmung zugunsten einer externen gravimetrischen Partikelgehaltsbestimmung verzichtet (s. VI.3.1). Die direkte Gesetzmäßigkeit zwischen Bandenhöhe und Probenkonzentration bestätigt aber, dass eine trübe Latexsuspension kein Hindernis für eine quantitative FT-IR-Analyse in Transmissionstechnik darstellt.



**Abb. IV.31:** Infrarotspektren des *annealed brush* KpS14, welche durch Messung gegen das Dispersionsmedium (10 mM MES-Puffer,  $pH$  6,1) bei verschiedenen Teilchenkonzentrationen (schwarz: 1,41 Gew.-%, blau: 0,70 Gew.-%, rot: 0,35 Gew.-%) erhalten wurden. Die breite negative Bande zwischen 1560 und 1720  $\text{cm}^{-1}$  wird durch die geringere Wassermenge in der Probe im Vergleich zum Dispersionsmedium hervorgerufen. Zwei der vier Banden (Bandenmaxima bei 1580 bzw. 1600  $\text{cm}^{-1}$ ), welche auf C=C-Streckschwingungen der aromatischen Gruppen des Polystyrol-Kerns zurückzuführen sind, werden durch die breite negative Bande überlagert. Die übrigen beiden Banden (Bandenmaxima bei 1452 bzw. 1493  $\text{cm}^{-1}$ ) unterliegen jedoch keinen Überlagerungen. Die Höhe dieser Banden skaliert linear mit der Partikelkonzentration (s. Inset: 1) 0,00075; 2) 0,00158; 3) 0,00325).

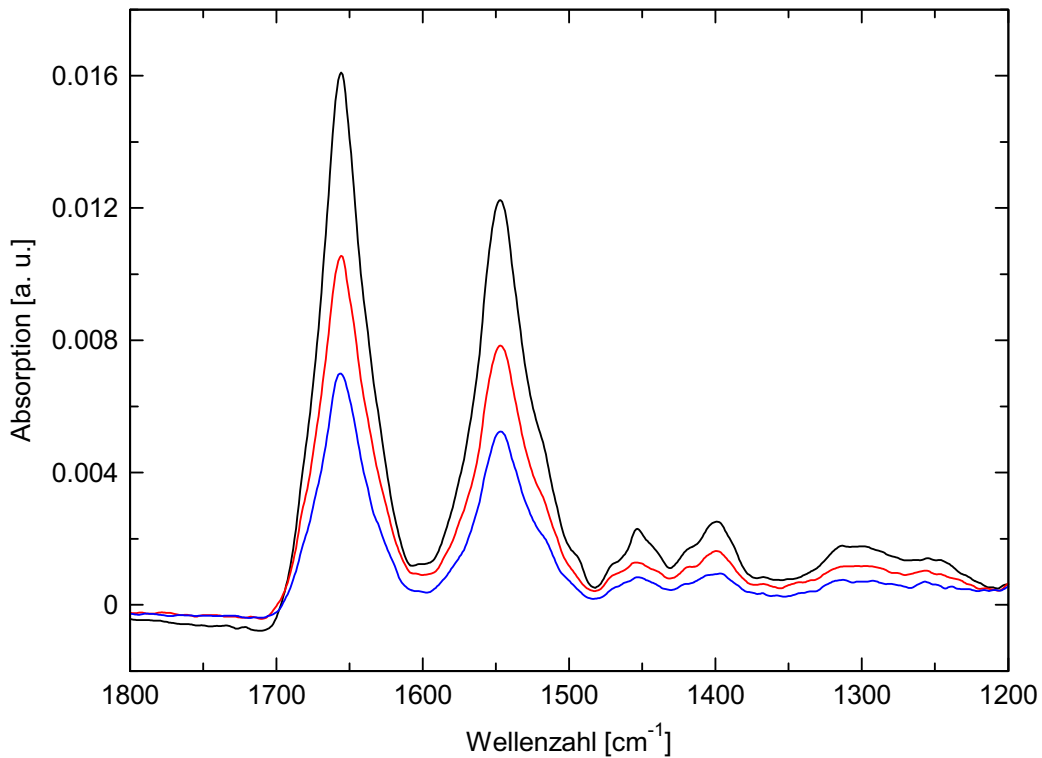
Somit konnten im nächsten Schritt Latexpartikel mit darauf adsorbierten Proteinen untersucht werden. Diese Untersuchung wurde zunächst an BSA durchgeführt. Hierzu wurden drei Proben entlang der Adsorptionsisotherme in Abbildung IV.20 ausgewählt, die sich signifikant in der adsorbierten Proteinmenge unterschieden. Aufgrund der enormen Bindungskapazität der *brushes* dominieren die Amid-I- ( $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ ) und die Amid-II-Bande ( $1480 - 1575 \text{ cm}^{-1}$ ) der Proteine die Spektren (s. Abb. IV.32).



**Abb. IV.32:** Infrarotspektren des *annealed brush* KpS14 mit unterschiedlichen Mengen an adsorbiertem BSA (schwarz: 1116, rot: 828, blau: 577 mg BSA pro g KpS14), welche durch Messung gegen das Dispersionsmedium (10mM MES-Puffer, *pH* 6,1) erhalten wurden. Zum Vergleich wurde zusätzlich ein Spektrum der unbeladenen *brushes* aufgetragen (grün). Sämtliche Spektren wurden auf einen Gehalt von einem Gew.-% an KpS14-Partikeln normiert.

Das Spektrum des adsorbierten Proteins ergibt sich nach Abzug des Spektrums des reinen *brush*-Latex. Sofern ein Adsorptionsgrad von mindestens 400 mg Protein pro g Latexpartikel eingehalten wurde, wiesen die resultierenden Proteinspektren keine signifikante Zunahme des Untergrundrauschens auf im Vergleich zu den Spektren von Proteinlösungen (s. Abb. IV.33). Die Flächen unter der Amid-I- und der Amid-II-Bande skalieren dabei näherungsweise linear mit der adsorbierten Proteinmenge, wobei allerdings zu einer genaueren Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge eine entsprechende Eichkurve über

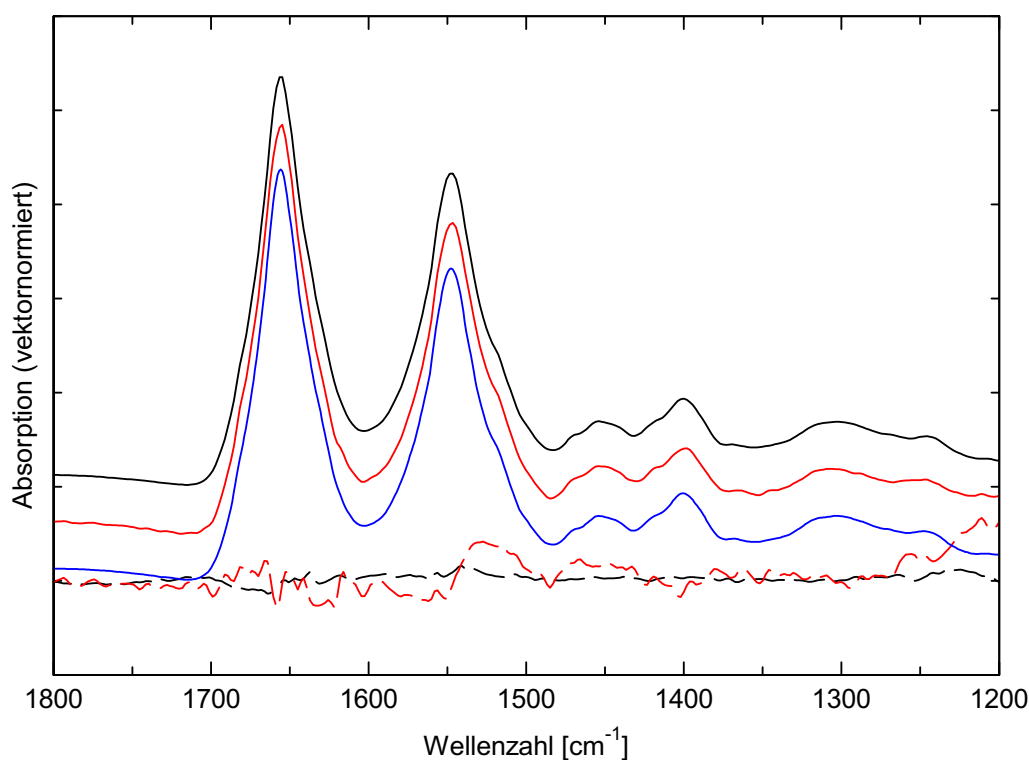
den in Frage kommenden Konzentrationsbereich erstellt werden müsste. Hierauf wurde jedoch verzichtet, da die indirekte Bestimmung des Adsorptionsgrads mittels UV/VIS-Spektroskopie (s. Kap. VI.2.2) über die Menge des nicht-adsorbierten Proteins einer derartigen Vorgehensweise an Genauigkeit überlegen ist.



**Abb. IV.33:** Infrarotspektren von auf dem *annealed brush* KpS14 adsorbierten BSA (schwarz: 1116, rot: 828, blau: 577 mg BSA pro g KpS14), welche nach Abzug des Spektrums der Trägerpartikel erhalten wurden. Die Flächen unter der Amid-I-Bande (1600 – 1700  $\text{cm}^{-1}$ ) skalieren mit der adsorbierten Proteinmenge (0,61; 0,41; 0,27).

Wie in Kapitel IV.5 beschrieben, lässt sich das auf einem *annealed brush* adsorbierte BSA bei Erhöhung der Ionenstärke auf 500 mM größtenteils wieder desorbieren. Abbildung IV.34 zeigt die IR-Spektren des Proteins im adsorbierten Zustand und nach Desorption von den Latexpartikeln im Vergleich zum Spektrum des Ausgangsproteins. Da allenfalls minimale Unterschiede in den einzelnen Spektren auszumachen sind, kann von einem weitgehenden Erhalt der Sekundärstruktur bei der Adsorption von BSA auf Polyacrylsäure-*brushes* ausgegangen werden. Ein quantitatives Maß hierfür sind die in Tabelle IV.13 aufgelisteten Werte für die jeweiligen  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblattanteile des Proteins. Der  $\alpha$ -Helixgehalt des adsorbierten Proteins liegt zwischen 60 und 64 %. Im Rahmen des experimentellen Fehlers von  $\pm 4$  % (s. VI.4) lässt sich somit keine Abhängigkeit vom

Adsorptionsgrad feststellen. Gegenüber dem  $\alpha$ -Helixgehalt des Proteins vor Beginn der Adsorptionsversuche von 67 % ist der Helixanteil leicht erniedrigt. Diese Absenkung liegt allerdings ebenfalls noch innerhalb des experimentellen Fehlers. Nach Desorption des Proteins von den Trägerpartikeln wurden wiederum dieselben Sekundärstrukturanteile erhalten, wie zu Beginn der Adsorptionsexperimente (s. Tab. IV.13).



**Abb. IV.34:** Infrarotspektren von nativem BSA (Sigma A-6003) in Pufferlösung (blaue Linie), BSA adsorbiert auf dem *annealed brush* KpS15 (950 mg BSA pro g KpS15; rote Linie), BSA nach Desorption von den *brush*-Partikeln (schwarze Linie). Zum Ausgleich von Konzentrationsfehlern wurden die Spektren im Bereich von 1200 – 1750 cm<sup>-1</sup> auf die gleiche Fläche normiert und zur besseren optischen Unterscheidung versetzt aufgetragen. Die nahezu vollständige Übereinstimmung der Spektren zeigt, dass die adsorptive Immobilisierung von BSA auf den *brushes* unter Erhalt der Sekundärstruktur des Proteins erfolgt. Dies findet auch in den 15-fach vergrößerten Differenzspektren des adsorptiv gebundenen Protein (rote gestrichelte Linie) sowie des desorbierten Proteins (schwarze gestrichelte Linie) zum nativen Protein Ausdruck. Das etwas höhere „Rauschen“ im Differenzspektrum des adsorbierten Proteins dürfte hauptsächlich auf den Abzug des Trägerpartikelspektrums zurückzuführen sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass trotz der starken Wechselwirkung von BSA mit *annealed brushes*, welche im hohen Adsorptionsgrad Ausdruck findet (s. Kap. IV.4), das Protein weitestgehend seine Sekundärstruktur behält. Zudem lässt sich das Protein



ohne größere Änderungen in der Sekundärstruktur wieder von den *brushes* durch Heraufsetzen der Ionenstärke freisetzen und über Ultrafiltration isolieren (s. Kap. IV.5).

Eine Analyse weiterer Proteine wie RNase A oder BLG auf *annealed brushes* war nicht möglich, da diese einen zu geringen Adsorptionsgrad auf diesen Systemen zeigen (s. IV.4.5). Zur Durchführung präziser Sekundärstrukturanalysen war ein Adsorptionsgrad von mindestens 400 mg Protein pro g Trägerpartikel erforderlich. Andernfalls waren die durch den Abzug des Trägerpartikelspektrums bedingten Fehler nicht mehr vernachlässigbar in bezug auf das Differenzspektrum des Proteins vor und während der Adsorption, in welchem die Konformationsänderungen zum Ausdruck kommen. Aus demselben Grund war eine direkte Vergleichsanalyse mit BSA auf den Oberflächen-carboxylierten PSAA-Latexpartikeln nicht möglich. Eine Monoschichtbelegung der Oberfläche derartiger Partikel mit einem Teilchendurchmesser von 100 nm entspräche 140 mg BSA pro g Latexteilchen.

Im Falle von *quenched brushes* ließen sich mit sämtlichen untersuchten Proteinen wesentlich höhere Adsorptionsgrade erzielen (s. Kap. IV.4.5). Hierdurch kann eine Sekundärstrukturanalyse analog zu den obigen Fällen erfolgen, worauf im folgenden näher eingegangen werden soll.

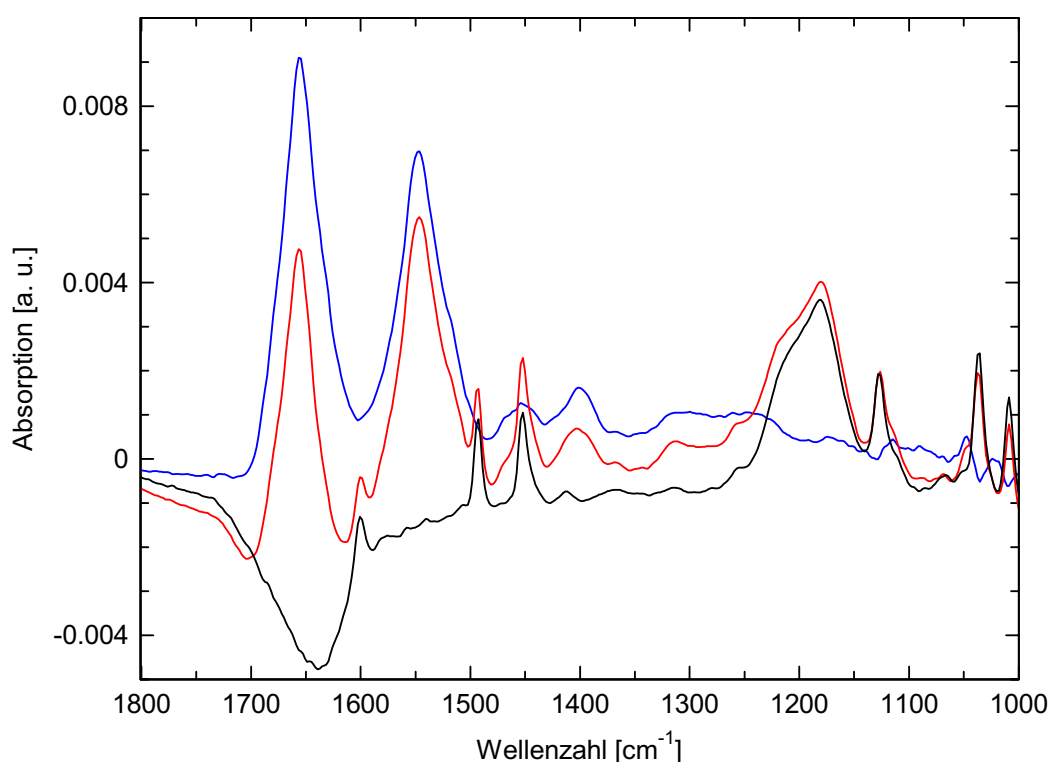
**Tab. IV.13:** Adsorption von BSA auf *annealed brushes*: Sekundärstrukturanalyse des Proteins im nativen und adsorbierten Zustand sowie nach Desorption von den Latexpartikel. Es wurden zwei PS/PAA-Kern-Schale-Latices unterschiedlicher Morphologie eingesetzt (s. Tab. IV.3). Zusätzlich wurde der Adsorptionsgrad variiert.

Experiment	adsorbierte Proteinmenge [mg/g SPB]	$\alpha$ -Helix [%], FT-IR	$\beta$ -Faltblatt [%], FT-IR
BSA	-	67	2
BSA adsorbiert auf KpS14	577	60	5
BSA adsorbiert auf KpS14	829	60	5
BSA adsorbiert auf KpS14	1116	64	2
BSA adsorbiert auf KpS15	950	64	1
BSA adsorbiert auf KpS15	948	61	2
BSA desorbiert von KpS15	-	67	2

#### IV.6.1.3 Proteine adsorbiert auf *quenched brushes*

Wie in Kapitel IV.4.3 näher erläutert, weisen die untersuchten Proteine eine stärkere Wechselwirkung mit den aus starken Polyelektrolyten aufgebauten *quenched brushes* auf

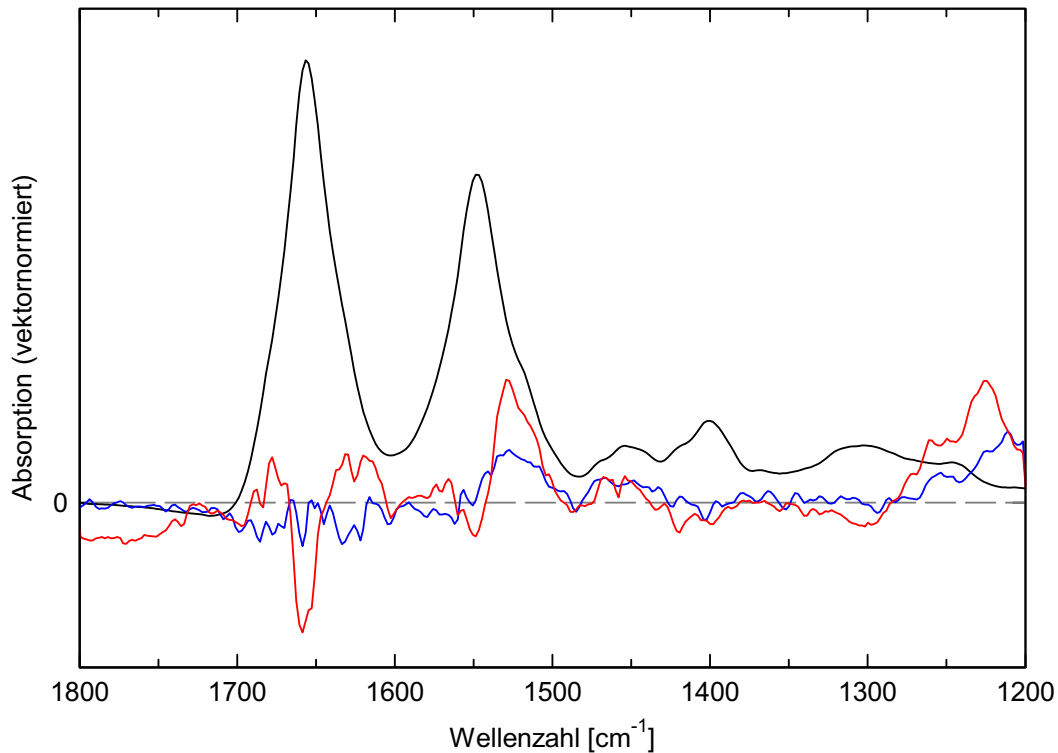
als mit den aus schwachen Polyelektrolyten aufgebauten *annealed brushes*. Im Falle der Adsorption von BSA auf *quenched brushes* ließ sich die höchste Belegung an Protein erzielen. Des Weiteren konnten in diesem Fall bei Erhöhung der Ionenstärke auf 507 mM nur geringe Proteinmengen wieder freigesetzt werden. Aus diesem Grunde musste auf eine Strukturanalyse des desorbierten Proteins verzichtet werden, da ein derartiges Experiment nicht repräsentativ für alle Proteinmoleküle wäre. Die FT-IR-Spektren des Systems BSA/*quenched brush* sind in Abbildung IV.35 zusammengefasst.



**Abb. IV.35:** Infrarotspektren des *quenched brush* KpSS2 mit (rot, 688 mg BSA pro g KpSS2) bzw. ohne (schwarz) darauf adsorbiertes BSA, welche durch Messung gegen das Dispersionsmedium (10mM MES-Puffer, *pH* 6,1) erhalten wurden. Als Differenz der beiden Spektren ergibt sich das Spektrum des adsorbierten Proteins (blau). Sämtliche Spektren wurden auf einen Gehalt von einem Gew.-% an KpSS2-Partikeln normiert.

Es stellte sich die Frage, ob die stärkere Wechselwirkung des Proteins mit dem *quenched brush* strukturelle Änderungen hervorruft, welche ja im Falle des *annealed brush* ausblieben. In der Tat ließ sich ein geringerer  $\alpha$ -Helixgehalt des Proteins im adsorbierten Zustand von 55 % feststellen (s. Tab. IV.14). Verglichen zum nativen Protein entspricht dies einer Abnahme des Helixanteils um 12 %, während der Faltblattanteil unverändert blieb. Damit liegt der Rückgang an  $\alpha$ -Helix außerhalb des experimentellen Fehlers von

$\pm 4\%$ . Somit ist der Rückgang an Helixstruktur wesentlich deutlicher ausgeprägt als bei den *annealed brushes*, wo sich die Differenz noch innerhalb der Fehlertoleranzen bewegte.



**Abb. IV.36:** Vergleich der Adsorption von BSA auf *annealed* und *quenched brushes*: Nach Vektornormierung zum Ausgleich von Konzentrationsfehlern wurden die Spektren der adsorbierten Proteine vom Spektrum des Proteins vor Beginn der Adsorptionsversuche (schwarz) abgezogen und zur besseren Unterscheidung um den Faktor 5 hochskaliert. Das Differenzspektrum des auf dem *annealed brush* adsorbierten BSA (blau) gibt lediglich das Untergrundrauschen wieder (vgl. Abb. IV.34) und lässt auf einen Erhalt der Sekundärstruktur schließen. Der negative *Peak* bei  $1658\text{ cm}^{-1}$  im Differenzspektrum des auf dem *quenched brush* adsorbierten Proteins (rot) weist auf einen Verlust an  $\alpha$ -Helixstruktur hin zugunsten der Entstehung von ungeordneten Strukturen ( $1640 - 1650\text{ cm}^{-1}$ ) bzw. Schleifen ( $1660 - 1690\text{ cm}^{-1}$ ).

Abbildung IV.36 verdeutlicht die Änderungen der Helixstruktur von BSA bei der Adsorption auf *quenched brushes*. Die Differenzspektren des adsorbierten Proteins zum Protein vor Beginn der Adsorptionsexperimente untermauern die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse: So lassen die Differenzspektren des auf *annealed brushes* adsorbierten Proteins auf einen kompletten Erhalt der Sekundärstruktur im Rahmen des experimentellen Fehlers schließen. Die Abnahme des  $\alpha$ -Helixanteils bei der Adsorption des Proteins auf *quenched brushes* ist hingegen klar aus den Differenzspektren in Form eines *Peaks* bei  $1658\text{ cm}^{-1}$  (s. Abb. IV.36) ersichtlich. An dieser Stelle kommt – wie oben diskutiert – die stärkere Wechselwirkung des Proteins mit dem aus starken Polyelektrolyten

gebildeten *quenched brush* zum Ausdruck. Somit zeigt sich hier eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Resultaten der Adsorptionsexperimente auf der einen Seite (s. Kap. IV.4.3), als auch zu den theoretischen Vorhersagen über die Triebkräfte der Proteinadsorption auf derartigen Systemen (s. Kap. III.1.5).

Im Gegensatz zu BSA zeigte BLG in den Adsorptionsversuchen eine zwar noch relativ hohe, aber deutlich geringere Affinität zu den *quenched brushes*. Neben einem geringeren Adsorptionsgrad äußert sich dies vor allem darin, dass das Protein bei Erhöhung der Ionenstärke weitgehend wieder desorbiert werden kann (s. Kap. IV.5). In Tabelle IV.14 sind die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse für das Protein vor Beginn und nach Adsorption auf den *brush*-Partikeln sowie nach Desorption von denselben aufgeführt. Der  $\alpha$ -Helixanteil blieb in allen drei Fällen unverändert, während der  $\beta$ -Faltblattanteil im adsorbierten Zustand um 5 % erniedrigt war, sich aber nach Desorption wieder zurückbildete. Allerdings kann unter Berücksichtigung des experimentellen Absolutfehlers von  $\pm 4$  % für den Helixanteil bzw. von  $\pm 3$  % für die Faltblattstruktur von einem weitgehenden Erhalt der Sekundärstruktur von BLG bei der Wechselwirkung mit *quenched brushes* ausgegangen werden.

In weiteren Experimenten wurde die Sekundärstruktur von RNase A untersucht, welche zuvor auf zwei *quenched brush*-Systemen unterschiedlicher Morphologie adsorptiv immobilisiert wurde. In Lösung zeichnet sich dieses Protein durch ein vollständig reversibles Faltungs-/Entfaltungsverhalten auf und nimmt daher diesbezüglich eine Sonderrolle unter den Proteinen ein. Neben dieser herausragenden Eigenschaft ist das Protein für seine ausgesprochen hohe Konformationsstabilität bekannt (Baron *et al.* 1999, Servagent-Noinville *et al.* 2000). Die Analyse sollte somit die an BSA gewonnenen Erkenntnisse erweitern, denn BSA gilt als strukturell anpassungsfähig (Carter *et al.* 1994). Weiterhin liegt der Adsorptionsgrad von RNase A auf *quenched brushes* zwischen den mit BSA und BLG erzielten Werten.

In Tabelle IV.14 sind die Resultate der Sekundärstrukturanalyse zusammengefasst. Der  $\beta$ -Faltblattanteil des adsorbierten Proteins ist gegenüber dem nativen Protein um 5 % erniedrigt. Hierbei ist keine Abhängigkeit vom Adsorptionsgrad sowie von der Morphologie der PS/PSS-Trägerpartikel festzustellen. Für den  $\alpha$ -Helixgehalt gilt entsprechendes, wobei sich hier gewisse Unterschiede bei den beiden *quenched brush*-Systemen zeigen. Im Falle des Systems höherer *brush*-Dicke (KpSS2) ist nur eine Abnahme von 1 - 2 % an Helixstruktur zu verzeichnen, wohingegen ein Rückgang von 4 - 5 % im Falle des kurz-kettigeren *brush* (KpSS1) erfolgt. Zwar liegen die Änderungen im Vergleich zum Bezugsprotein immer noch innerhalb des experimentellen Fehlers (s. VI.4), dennoch konnte der leichte Rückgang an Sekundärstruktur bei sämtlichen untersuchten Proben (s. Tab. IV.14) in derselben Größenordnung festgestellt werden.

**Tab. IV.14:** Adsorption von BSA, BLG sowie RNase A auf *quenched brushes*: Sekundärstrukturanalyse des Proteins im nativen und adsorbierten Zustand sowie soweit möglich nach Desorption von den Latexpartikel. Im Falle der RNase A wurden zwei unterschiedliche PS/PSS-Kern-Schale-Latices eingesetzt (s. Tab. IV.3). Weiterhin wurde der Adsorptionsgrad variiert.

Experiment	adsorbierte Proteinmenge [mg/g SPB]	$\alpha$ -Helix [%], FT-IR	$\beta$ -Faltblatt [%], FT-IR
BSA	-	67	2
BSA adsorbiert auf KpSS2	688	55	2
BLG	-	14	35
BLG adsorbiert auf KpSS2	666	14	31
BLG desorbiert von KpSS1	-	13	34
RNase A	-	17	31
RNase A adsorbiert auf KpSS1	559	13	26
RNase A adsorbiert auf KpSS1	572	12	27
RNase A adsorbiert auf KpSS2	485	15	26
RNase A adsorbiert auf KpSS2	726	16	26
RNase A adsorbiert auf KpSS2	869	15	26

Bei ebenen Oberfläche wird allgemein eine adsorptionsbedingte Deformation bzw. ein Spreiten der Proteinmoleküle auf dem Substrat beobachtet (Wertz *et al.* 2001, 2002, Czeslik *et al.* 2001, 2003, Jackler *et al.* 2002, Fragneto *et al.* 2000). Eine Modifizierung der Oberfläche durch dicht gepackte Polyelektrolytbürsten kann, wie die obigen Ergebnisse gezeigt haben, hingegen zu einer schonenderen Immobilisierung des Proteins herangezogen werden. Lediglich im Falle der Adsorption von BSA auf *quenched brushes* ließ sich eine signifikante Abnahme an Helixstruktur ausmachen. Bei Immobilisierung des Proteins auf den *annealed brushes* blieben hingegen Sekundärstrukturänderungen aus.

Da sich der Adsorptionsgrad von BSA auf *annealed brushes* in einem vergleichbaren Rahmen zu RNase A auf *quenched brushes* bewegt, scheint es auf den ersten Blick überraschend, dass im Vergleich zum strukturell adaptiveren BSA (Carter *et al.* 1994) größere Sekundärstrukturänderungen im Falle von RNase A auftreten. Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass die Proteine bei der Adsorption auf den *brushes* weitgehend ihre native Sekundärstruktur behalten. Dennoch scheinen geringe strukturelle Anpassungen der Proteine an ihre Umgebung innerhalb des *brush* zu erfolgen. Bedingt durch eine relativ flexible Tertiärstruktur (Carter *et al.* 1994) kann Albumin mit den Polyelektrolytketten des *brush* unter fast vollständigem Erhalt seiner Sekundärstruktur in Wechselwirkung treten (vgl. Kap. IV.6.4). Strukturelle Anpassungen globulärer Proteinen wie RNase A scheinen hingegen sowohl mit Änderungen in der Sekundär- als auch in der Tertiärstruktur verbunden zu sein.

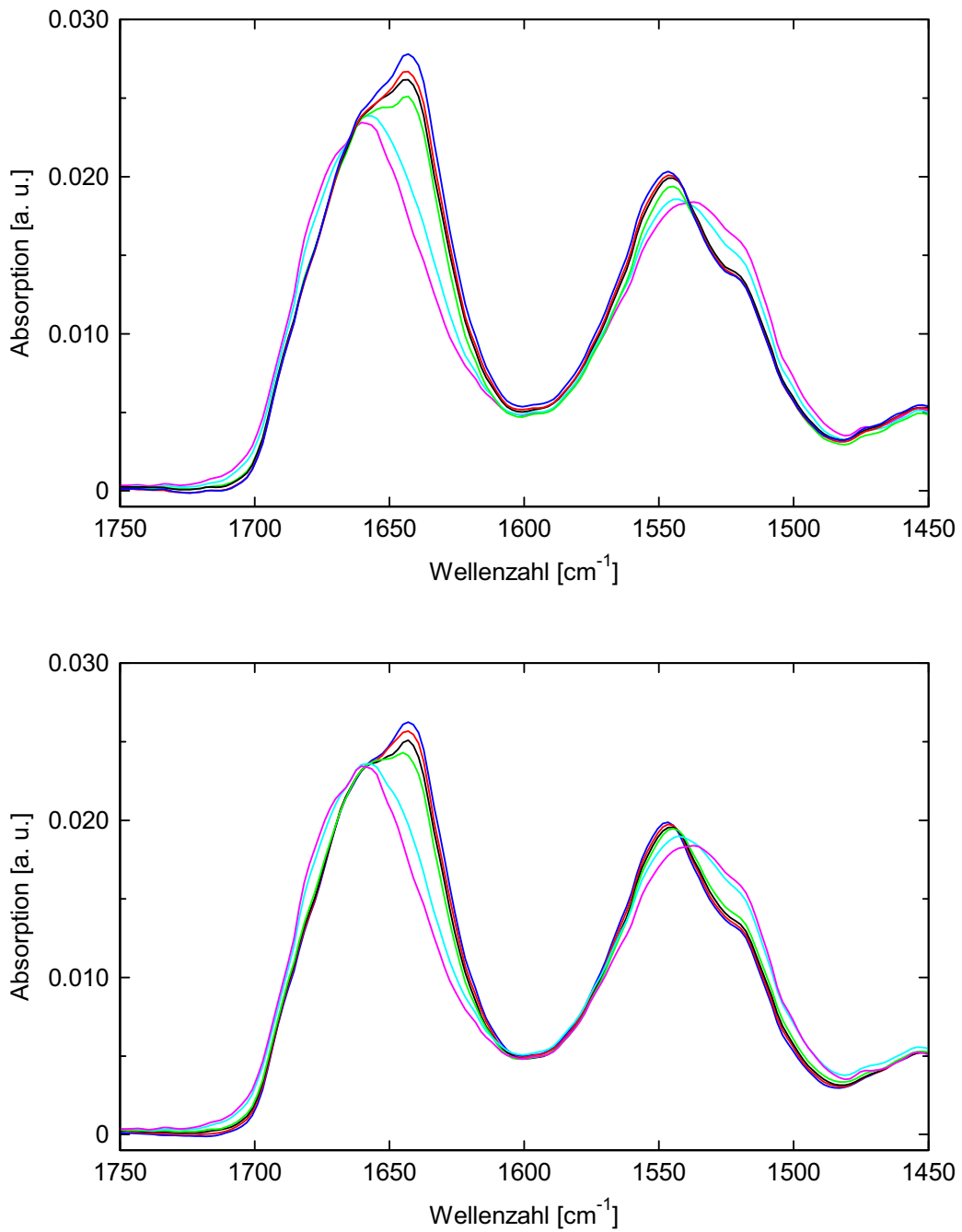
#### IV.6.2 Temperaturinduzierte Entfaltung freier und adsorbierter RNase A

Die frühe Aufklärung der Aminosäuresequenz sowie der dreidimensionalen Struktur hat Ribonuklease zu einem Modellsystem zur Untersuchung der Proteinfaltung werden lassen (Raines 1998). Das Protein besitzt zudem die Fähigkeit nach thermisch induzierter Denaturierung wieder in seine native Konformation zurückzufalten (Chatani *et al.* 2001). Die vorherrschenden Strukturmerkmale des Proteins sind ein viersträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt neben drei kurzen  $\alpha$ -Helixbereichen (Raines 1998). Insgesamt sind 17,7 % der 124 Aminosäuren des Proteins an der Ausbildung der  $\alpha$ -Helix- sowie 31,5 % an der Ausbildung der  $\beta$ -Faltblatt (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>) beteiligt. Die hohe Stabilität des Proteins ist auf vier Disulfidbrücken zurückzuführen, was eine außergewöhnlich hohe Anzahl für ein Protein dieser Größe darstellt (Scheraga *et al.* 2001).

Im Vordergrund der Entfaltungsstudien des Proteins stand in den letzten Jahrzehnten die Frage, ob die Proteinfaltung nach einem einfachen Zweizustandsmodell erfolgt oder aber über teilentfaltete Zwischenstufen verläuft. Ein weiterer zentraler Punkt war die Frage nach der Reststrukturierung des Proteins im denaturierten Zustand. Die kinetischen Untersuchungen hierzu wurden über H/D-Austausch in Kombination mit 2D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie geführt (Robertson *et al.* 1991, Kiefhaber *et al.* 1996, Neira *et al.* 1997).

Yamamoto *et al.* (1991) sowie Fabian *et al.* (1993) untersuchten das Entfaltungs-/Rückfaltungsverhalten der A-, S- und T-Spezies der Ribonuklease mittels FT-IR-Spektroskopie. Aufgrund der hohen Sensitivität in bezug auf  $\beta$ -Faltblattstrukturen eignet sich diese Methode hervorragend zur Untersuchung derartiger Fragestellungen (Raines 1998).

RNase A und T zeigen dabei in wässriger Lösung ein vollständig reversibles Faltungsverhalten, während die Entfaltung bei der S-Form irreversibel verläuft. Das unterschiedliche Verhalten ist umso bemerkenswerter, da die A- und die S-Spezies nahezu identische Sekundärstrukturen im nativen Zustand aufweisen. Der wesentliche Unterschied ist ein proteolytisch wirksames aktives Zentrum zwischen Ala-20 und Ser-21 bei RNase S, was die thermische Stabilität reduziert (Yamamoto *et al.* 1991). Bei zahlreichen Proteinen war im Bereich niedriger Proteinkonzentration mit Hilfe anderer Techniken ein reversibles temperaturinduziertes Entfaltungsverhalten feststellbar. Jedoch führte der für IR-spektroskopische Untersuchungen erforderliche Konzentrationsbereich unweigerlich zur Ausbildung intermolekularer  $\beta$ -Faltblattstruktur aufgrund einer Aggregation der Proteine („ $\beta$ -Aggregation“). Das Ausbleiben dieses Effekts bei RNase A und T wurde auf eine Stabilisierung des denaturierten Zustands durch zwei der vier Disulfidbrücken des Moleküls zurückgeführt. Hierdurch bleiben lokal geordnete Bereiche im entfalteten Protein auch bei hohen Temperaturen bestehen, was eine inter- sowie intramolekulare „ $\beta$ -Aggregation“ verhindert (Fabian *et al.* 1993).



**Abb. IV.37:** Temperaturinduzierte Entfaltung/Rückfaltung von RNase A in 10 mM CHES-Puffer (*pH* 9,3): Zur besseren Unterscheidung der einzelnen Spektren gibt das obere Diagramm den Aufheizzyklus, das untere den Abkühlzyklus wieder (blau: 25°C, rot: 35°C, schwarz: 45°C, grün: 55°C, hellblau: 65°C, violett: 75°C). Die Entfaltung/Rückfaltung des Proteins erfolgt zwischen 55 und 65°C, was sich in einer Verschiebung bzw. einem Rückgang der Absorption des Maximums der Amid-I-Bande (1600 – 1700 cm<sup>-1</sup>) äußert (vgl. Abb. IV.41 bzw. IV.40).

Im vorherigen Kapitel wurde auf adsorptionsbedingte Änderungen in der Sekundärstruktur der RNase A bei Raumtemperatur eingegangen. Im folgenden soll das temperaturinduzierte Entfaltungs-/Rückfaltungsverhalten sowohl des adsorbierten Proteins, als auch des freien Proteins in Lösung betrachtet werden. Zu letzterem wurde eine Lösung von 19,76 mg/ml des Proteins in 10 mM CHES-Puffer ( $pH$  9,3) hergestellt. Die Proteinlösung wurde in Stufen von 10°C von 25°C auf 75°C erwärmt. Anschließend wurde die Probelösung analog von 75°C auf 25°C heruntergekühlt. Bei jeder Stufe wurden nach einer Temperierungsphase von 5 Minuten IR-Spektren aufgenommen. Abbildung IV.37 gibt die erhaltenen Proteinspektren des Aufheiz- sowie des Abkühlzyklus wieder. Da sich die entsprechenden Spektren beider Zyklen nahezu nicht voneinander unterscheiden, bestätigt sich an dieser Stelle bereits qualitativ die Reversibilität der Proteinfaltung auch bei hoher Proteinkonzentration. Zudem lassen sich die IR-Spektren aufgrund ihrer Form in zwei Gruppen einteilen: So stellen die Spektren im Bereich von 25 – 55°C ein typisches IR-Spektrum eines  $\beta$ -Faltblatt-reichen Proteins dar mit einem Maximum der Amid-I-Bande um  $1643\text{ cm}^{-1}$ . Vereinfacht kann man sich die Form der Spektren aus der Überlappung aus einem auf die  $\beta$ -Faltblattstruktur zurückführenden *Peak* um  $1633\text{ cm}^{-1}$  und einer breiten Bande um  $1646\text{ cm}^{-1}$  zusammengesetzt denken (Fabian *et al.* 1993). Letztere ist durch ungeordnete Strukturbereiche (*random coil*) im Protein bedingt. Nach der oberhalb 55°C einsetzenden Entfaltung des Proteins und dem damit verbundenen Abbau der Faltblattstruktur, wird diese Bande zum allein dominierenden Merkmal der Spektren. Das Maximum der Amid-I-Bande liegt nun bei  $1657 - 1660\text{ cm}^{-1}$  (vgl. Abb. IV.37). In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (Fabian *et al.* 1993) ist der Abbau der Faltblattstruktur nicht von einer Zunahme an ungeordneter Struktur begleitet. Dagegen ist die Ausbildung einer leichten Schulter bzw. eines Maximums im Differenzspektrum (s. Abb. IV.39) um  $1678\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen, was auf Entstehung schleifenartiger Struktur zurückgeführt werden kann (vgl. Tab. III.2).

Die Beobachtung eines Spektrensatzes unterhalb sowie oberhalb der Entfaltungstemperatur von 55-65°C spricht für einen Ablauf der Entfaltung nach einem Zweizustandsmodell in Analogie zu früheren Untersuchungen mittels FT-IR-Spektroskopie (Yamamoto *et al.* 1991, Fabian *et al.* 1993). Nach Robertson *et al.* (1991) und Scheraga *et al.* (2001) sollten im thermischen Gleichgewicht nur zwei Zustände besetzt werden können, der des nativen sowie des denaturierten Proteins. Die Differenz der freien Energie beider Zustände bestimmt die Stabilität des Proteins. Bei kinetischen Studien mittels H/D-Austausch wurden hingegen Zwischenstufen des Proteins bei der Entfaltung festgestellt (Neira *et al.* 1997, Kiefhaber *et al.* 1996). Diese Intermediate sollen dem nativen Zustand in der Sekundärstruktur gleichen. Sie sind somit nicht mit der IR-Spektroskopie vom nativen Zustand zu unterscheiden. Die Zwischenstufen zeichnen sich in strukturellen Fluktuationen verbunden mit der freien Rotierbarkeit der Seitenketten aus, welche bei Erreichen der Übergangstemperatur zunehmen. Raines (1998) weist auf die Existenz zweier entfalteter

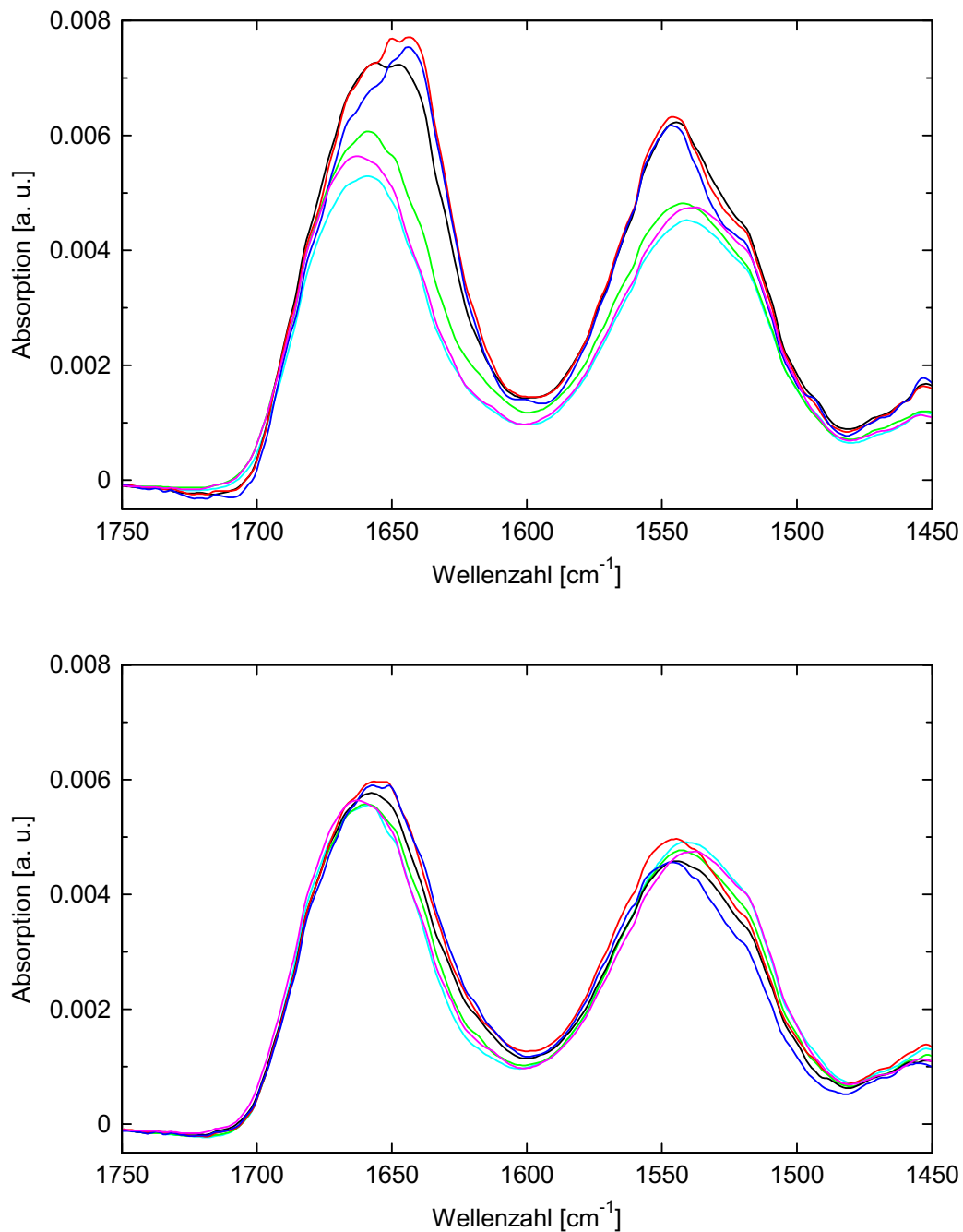


Zustände des Proteins hin: Bei schneller Entfaltung geht das Protein in einen Zustand über, aus welchem es schnell wieder zurückfalten kann. Bei zeitlicher Verzögerung des Entfaltungsvorgangs erfolgt hingegen eine langsame Rückfaltung des Proteins.

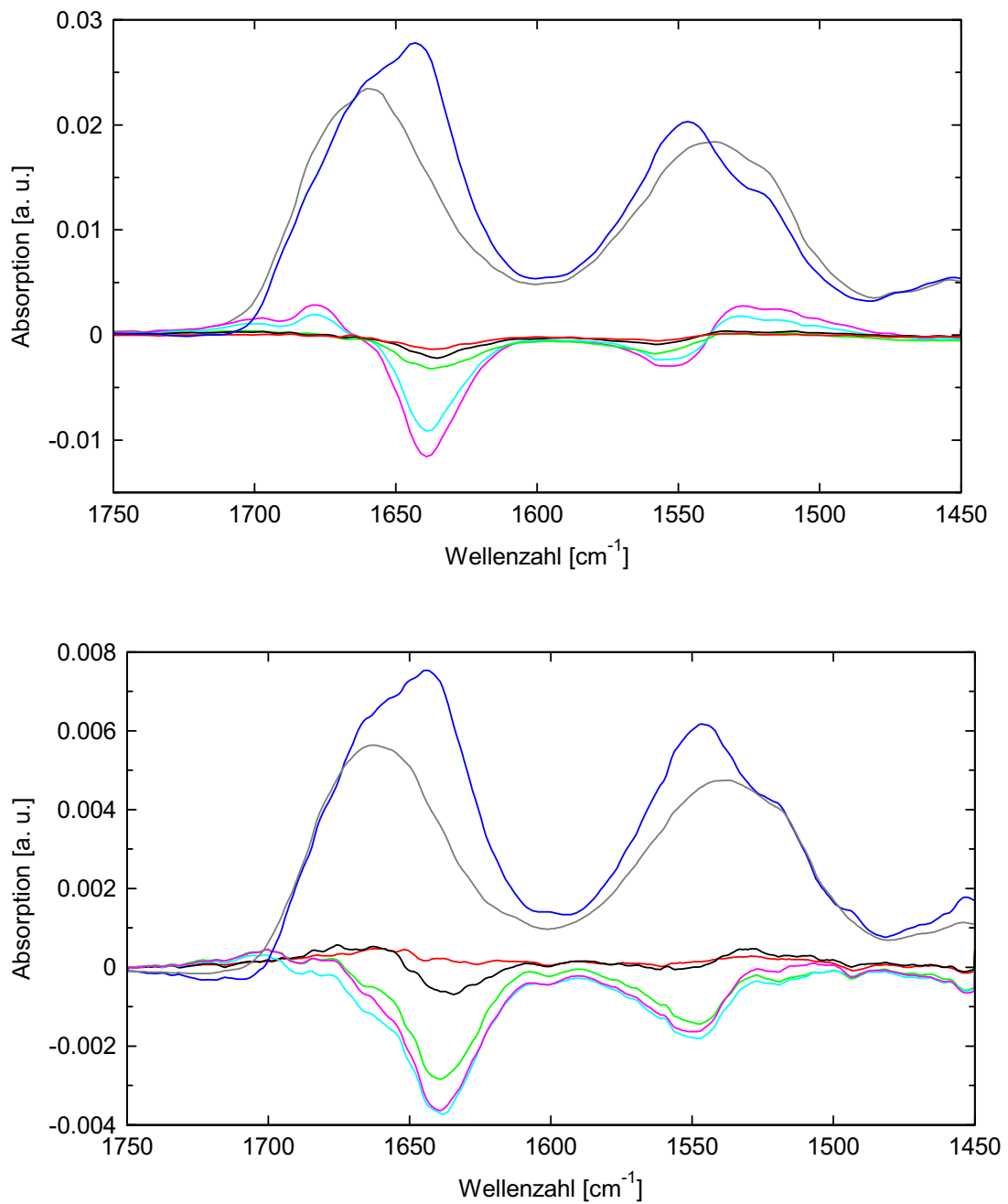
Zur Untersuchung des Entfaltungsverhaltens des adsorbierten Proteins, wurde eine zur Adsorptionsisotherme in Abbildung IV.26 gehörige Probe herangezogen. Als Trägersystem fungierte das *quenched brush*-System KpSS1 auf welchem 559 mg RNase A pro Gramm Latexpartikel adsorbiert wurden. Als Dispersionsmedium diente 10 mM CHES-Puffer (*pH* 9,3). Analog zur Herangehensweise beim freien Protein wurden IR-Spektren im Temperaturbereich von 25 – 75°C aufgenommen. Zusätzlich wurden die Spektren des Protein-freien Latex bei den jeweiligen Messtemperaturen aufgezeichnet. Bedingt durch die thermische Ausdehnung der Latexpartikel ergaben sich Unterschiede in der durch die Partikel verdrängten Wassermenge (s. IV.6.1.2).

Abbildung IV.38 zeigt die nach Abzug der Trägerpartikelspektren erhaltenen Spektren des adsorbierten Proteins. Die Entfaltung des adsorbierten Proteins erfolgt im Vergleich zum freien Protein bei einer niedrigeren Übergangstemperatur. Zudem findet nur eine minimale Rückfaltung des Proteins statt. Die Irreversibilität der Entfaltung des adsorbierten Proteins ist nicht überraschend, entstehen doch bei der Entfaltung der globulären Struktur zusätzliche Kontaktstellen zum Substrat. Zudem wird eine optimierte Ausrichtung der Kontaktstellen zu den Polyelektrolytketten und damit eine zusätzliche Erhöhung der Bindungsstärke des Proteins an den *brush* möglich.

Im folgenden soll nun eine detaillierte Analyse der Entfaltung der RNase A erfolgen. Dazu wurde jeweils das Spektrum des Proteins bei 25°C von den Spektren des Heizzyklus abgezogen. Änderungen in der Zusammensetzung des Proteins aus den einzelnen Strukturelementen und damit in der Sekundärstruktur lassen sich in derartigen Differenzspektren qualitativ analysieren (s. Abb. IV.39). Aus den Differenzspektren des freien Proteins sind im Bereich von 25 – 55°C keine größere Änderungen in der Sekundärstruktur ersichtlich. Zwischen 55 und 65°C macht sich die Entfaltung der  $\beta$ -Faltblattstruktur in einer negativen Bande bei 1637  $\text{cm}^{-1}$  bemerkbar. Daneben tauchen zwei positive Banden bei 1678 sowie 1697  $\text{cm}^{-1}$  mit einem dazwischenliegenden Minimum bei 1691  $\text{cm}^{-1}$  auf. Yamamoto *et al.* (1991) führten dies auf eine breite positive Bande um 1660  $\text{cm}^{-1}$  zurück, welche von einer scharfen negativen Bande um 1690  $\text{cm}^{-1}$  überlagert wird. Letztere ist wie die Bande bei 1637  $\text{cm}^{-1}$  auf den Abbau der Faltblattstruktur zurückzuführen. Die breite positive Bande wurde ungeordneten Strukturbereichen zugeschrieben. Allerdings wurde von Fabian *et al.* (1993), welche sehr detaillierte Strukturanalysen an RNase T durchgeführt haben, die Zunahme an irregulärer Struktur ausgeschlossen und die Bande auf schleifenartige Konformationen zurückgeführt.

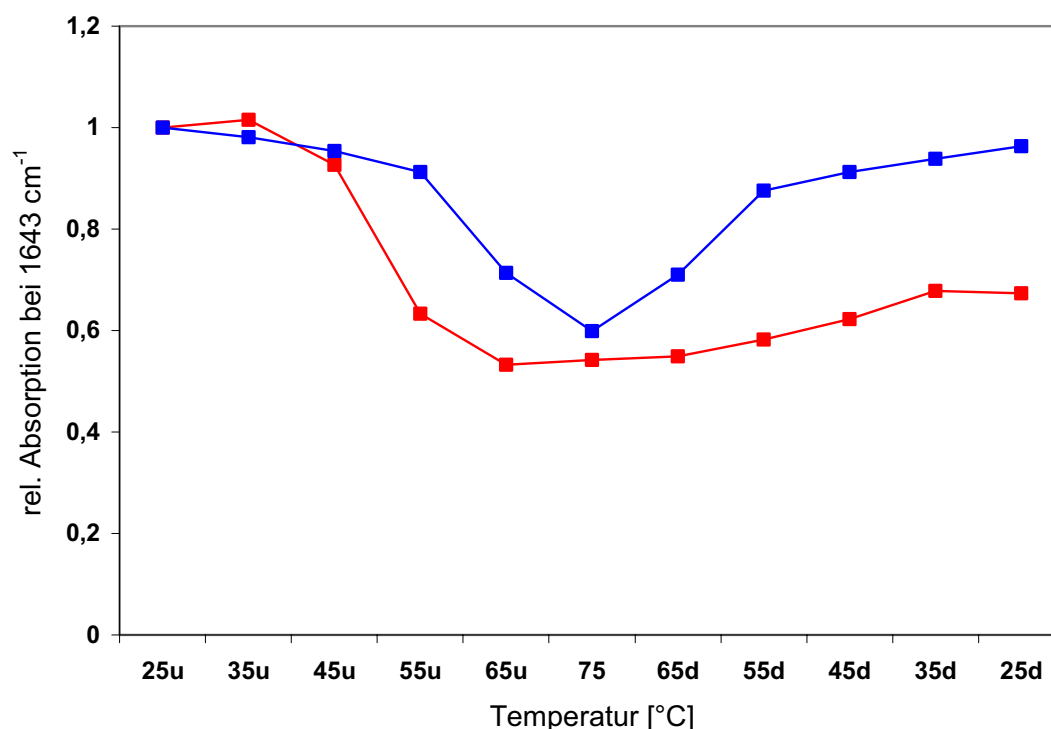


**Abb. IV.38:** Temperaturinduzierte Entfaltung/Rückfaltung auf KpSS1-Partikeln adsorbierter RNase A: Zur besseren Unterscheidung der einzelnen Spektren gibt das obere Diagramm den Aufheizzyklus, das untere den Abkühlzyklus wieder (blau: 25°C, rot: 35°C, schwarz: 45°C, grün: 55°C, hellblau: 65°C, violett: 75°C). Das adsorbierte Protein entfaltet zwischen 45 und 55°C, was sich in einer Verschiebung bzw. einer Abnahme der Absorption des Maximums der Amid-I-Bande (1600 – 1700  $\text{cm}^{-1}$ ) bemerkbar macht (vgl. Abb. IV.41 bzw. IV.40). Die beim freien Protein beobachtete Rückfaltung des Proteins bleibt im adsorbierten Zustand nahezu aus (unten).



**Abb. IV.39:** Temperaturinduzierte Entfaltung von freier RNase A in 10 mM CHES-Puffer (oben) sowie von auf KpSS1-Partikeln adsorbierter RNase A (unten): Differenzspektren der Messungen bei 35°C (rot), 45°C (schwarz), 55°C (grün), 65°C (hellblau), 75°C (violett) zum Spektrum des Proteins bei 25°C. Zum besseren Vergleich wurde das Bezugsspektrum bei 25°C (blau) sowie das Spektrum der entfalteten RNase A bei 75°C (grau) aufgetragen. Die Zunahme des „negativen“ Peaks bei 1635 – 1639  $\text{cm}^{-1}$  spiegelt den beim freien Protein ab 55°C, beim adsorbierten Protein bei 45°C sprunghaft einsetzenden Abbau der  $\beta$ -Faltblattstruktur wieder.

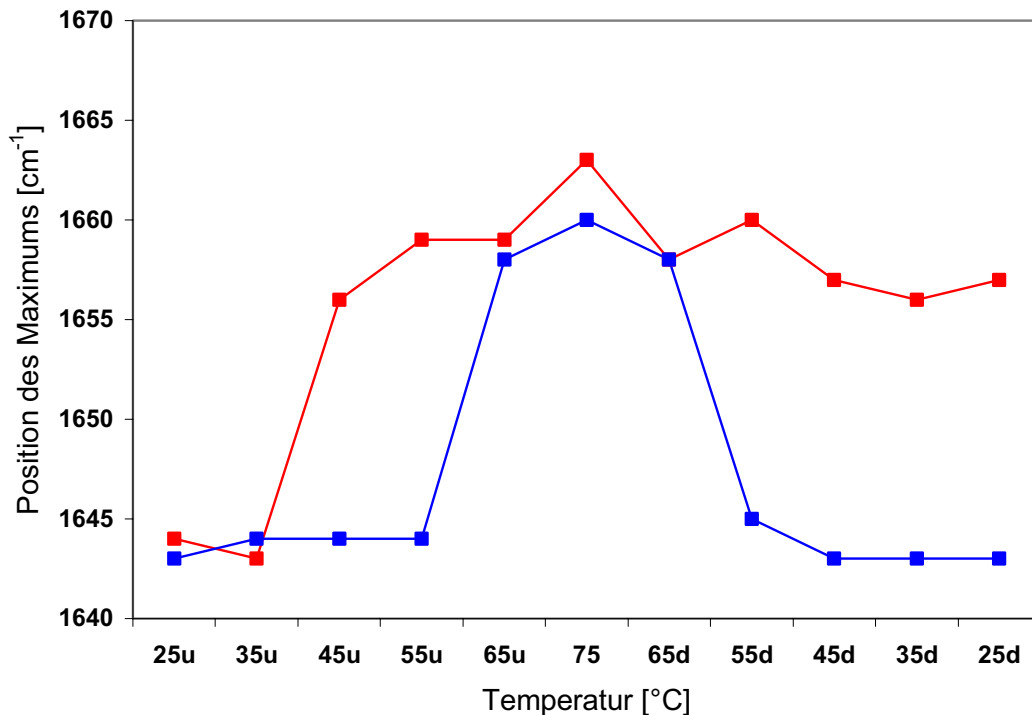
Aus der Bande um  $1637\text{ cm}^{-1}$  der Differenzspektren der adsorbierten RNase A (s. Abb. IV.39) geht ebenfalls klar der thermisch-induzierte Abbau der Faltblattstruktur hervor, wobei eine Absenkung der Übergangstemperatur um  $10^\circ\text{C}$  feststellbar ist. Die frühere Entfaltung im Falle des adsorbierten Proteins ist auf das oben diskutierte Bestreben des Proteins zurückzuführen, seine Wechselwirkung mit den Polyelektrolytketten zu optimieren.



**Abb. IV.40:** Rückgang der Absorption bei  $1643\text{ cm}^{-1}$  (Position des Maximums des nativen Proteins) als Maß für die Entfaltung von RNase A: Das freie Protein (blau) zeigt ein reversibles Entfaltungsverhalten mit einem Übergang zwischen 55 und  $65^\circ\text{C}$ . Nach Adsorption (rot) entfaltet das Protein irreversibel zwischen 45 und  $55^\circ\text{C}$ .

Zur genaueren Bestimmung der Übergangstemperatur bzw. zur Verdeutlichung des Entfaltungsvorganges wurden die Absorption bei  $1643\text{ cm}^{-1}$  (s. Abb. IV.40) sowie die Lage des Maximums der Amid-I-Bande (s. Abb. IV.41) gegen die Messtemperatur aufgetragen. Beide Messgrößen stellen ein Maß für den Grad der Entfaltung der RNase A dar (Yamamoto *et al.* 1991, Fabian *et al.* 1993). Beiden Auftragungen ist die Reversibilität der Entfaltung des freien Proteins mit einer Übergangstemperatur zwischen 55 und  $65^\circ\text{C}$  zu entnehmen. Nach Adsorption des Proteins auf die *brush*-Partikel setzt die Entfaltung bei niedrigeren Temperaturen ein und verläuft irreversibel. Lediglich eine leichte Zunahme in

der Absorption bei  $1643\text{ cm}^{-1}$  ist nach Wiederabkühlen der Probe festzustellen (s. Abb. IV.40), was auf eine geringfügige Rückfaltung einzelner Bereiche des Proteins schließen lässt.

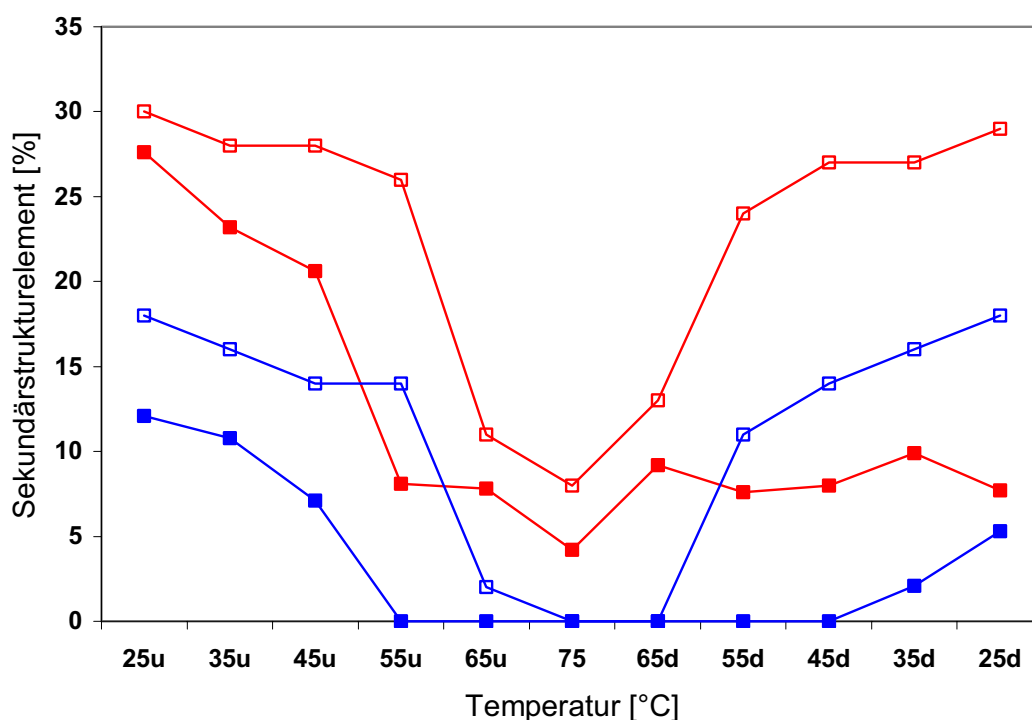


**Abb. IV.41:** Verschiebung des Maximums der Amid-I-Bande ( $1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$ ) bei der Entfaltung der RNase A: Aus der Auftragung geht die reversibel oberhalb  $55^\circ\text{C}$  ablaufende Entfaltung des freien Proteins (blau) hervor, während das adsorbierte Protein (rot) irreversibel bei einer niedrigeren Übergangstemperatur entfaltet.

Diese Beobachtungen werden durch die Sekundärstrukturanalyse bestätigt (s. Abb. IV.42 und Tab. IV.15). Die Helixstruktur entfaltet oberhalb der Übergangstemperatur beim freien wie auch beim adsorbierten Protein vollständig. Im Falle des freien Proteins stimmen die  $\alpha$ -Helixanteile wie auch die  $\beta$ -Faltblattanteile bei den entsprechenden Temperaturen im Heiz- und Kühlzyklus im Rahmen des experimentellen Fehlers überein. Beim adsorbierten Protein hingegen bildet sich nach Entfaltung lediglich die Helixstruktur unterhalb  $45^\circ\text{C}$  teilweise zurück. Oberhalb der Entfaltungstemperatur bleibt sowohl beim freien, als auch beim adsorbierten Protein jeweils ein signifikanter Anteil an Faltblattstruktur erhalten.

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde darauf hingewiesen, dass im denaturierten Zustand der Ribonuklease keine vollständige *random coil*-Konformation vorliegt

(Robertson *et al.* 1991, Neira *et al.* 1997, Scheraga *et al.* 2001). So wurde experimentell ein kleinerer Gyrationradius beobachtet, als es für eine derartige Konformation zu erwarten wäre (Neira *et al.* 1997, Scheraga *et al.* 2001). Weiter sollte die Ausbildung eines aufgeweiteten Zufallsknäuels nur in einem guten Lösungsmittel erfolgen, in dem alle Gruppen des Proteins solvatisiert vorliegen. Da Wasser dies nicht leisten kann, lassen sich intramolekulare Wechselwirkungen, beispielsweise zwischen hydrophoben Gruppen, nicht gänzlich ausschalten. Zudem wurde argumentiert, dass zur Denaturierung eines Proteins keine zwangsläufige Entfaltung des Gesamtproteins erforderlich sei, sondern eine Störung in der Packungsdichte der Strukturelemente ausreichend sei. In diesen Zusammenhang wurden auch Studien mittels CD-Spektroskopie angeführt, in denen ein Erhalt von bis zu 50 % der Helixstruktur in der entfalteten Ribonuklease festgestellt wurde (Robertson *et al.* 1991). Diese Beobachtung steht allerdings in Widerspruch zur obigen Analyse und zu weiteren IR-Studien (Fabian *et al.* 1993) sowie zu kalorimetrischen Daten (Robertson *et al.* 1991).



**Abb. IV.42:** Verlauf des  $\alpha$ -Helix- (blau) bzw. des  $\beta$ -Faltblattgehaltes (rot) während der temperaturinduzierten Entfaltung von RNase A: Das freie Protein (offene Symbole) zeigt oberhalb 55°C eine kooperative Entfaltung beider Strukturelemente und gewinnt nach Abkühlung seine native Sekundärstruktur zurück. Das adsorbierte Protein (ausgefüllte Symbole) entfaltet bereits oberhalb 45°C ebenfalls kooperativ. Allerdings verläuft die Entfaltung in diesem Falle irreversibel.

Der teilweise Erhalt der  $\beta$ -Faltblattstruktur im denaturierten Protein dürfte wohl darauf zurückzuführen sein, dass die Disulfidbrücken die Ausbildung einer reinen Zufallsknäuelstruktur verhindern. Dadurch ließe sich eine lokal geordnete entfaltete Struktur stabilisieren. Dies würde die außergewöhnliche thermische Resistenz des Moleküls sowie das Ausbleiben einer intra- bzw. intermolekularen „ $\beta$ -Aggregation“ erklären.

Aus den Abbildungen IV.40 , IV.41 sowie IV.42 geht, wie bereits oben diskutiert wurde, hervor, dass sich die Entfaltung der freien wie der adsorbierten RNase A über ein einfaches Zweizustandsmodell beschreiben lässt. Entsprechendes gilt für die Rückfaltung des freien Proteins. Unter Annahme eines thermischen Gleichgewichts zwischen dem gefalteten und entfalteten Zustand lassen sich unter Zuhilfenahme einer von Heyn *et al.* (1981) beschriebenen Methodik die Übergangstemperaturen und die zugehörigen Van't Hoff-Enthalpien bestimmen (Fabian *et al.* 1993). Hierzu werden die Werte bei niedriger sowie hoher Temperatur einer linearen Extrapolation über den gesamten Temperaturbereich unterzogen. Der Anteil an entfalteten Proteinmolekülen  $\theta$  wird durch Normalisierung der experimentellen Daten erhalten und über den gesamten Temperaturbereich aufgetragen. Die Übergangstemperatur  $T_c$  ergibt sich aus dem Punkt der Kurve, an dem die Hälfte der Proteine ( $\theta = 0,5$ ) entfaltet vorliegt. Die Van't Hoff-Enthalpie erhält man über die Steigung an diesem Punkt:

$$\Delta H_{vH} = 4 R T_c^2 \left( \frac{d\theta}{dT} \right)_{T_c} \quad (4-1)$$

$\Delta H_{vH}$ :	Van't Hoff-Enthalpie
R:	Gaskonstante
$T_c$ :	Übergangstemperatur
$\theta$ :	Anteil an entfalteten Proteinen ( $0 \leq \theta \leq 1$ )
T:	Temperatur

Die Ableitung der Van't Hoff-Enthalpien des freien Proteins erfolgte sowohl aus der Auftragung der Absorption bei  $1643 \text{ cm}^{-1}$  (s. Abb. IV.40), als auch der Position des Maximums der Amid-I-Bande (Abb. IV.41) gegen die Messtemperatur. Hierbei ergab sich für die Entfaltung des Proteins eine Übergangstemperatur von  $63^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  sowie eine Van't Hoff-Enthalpie von  $428 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 50 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Im Rahmen des experimentellen Fehlers stimmen diese Werte mit den Ergebnissen für die Rückfaltung des Proteins überein ( $T_c = 62^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  bzw.  $\Delta H_{vH} = 424 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 50 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Da Van't Hoff-Enthalpien ein Maß für die Kooperativität des Prozess darstellen (Winter *et al.* 1998), erfolgt die Ent- bzw. die Rückfaltung des Proteins mit derselben Kooperativität. Im Falle von RNase T hingegen

wurde eine höhere Kooperativität der Rückfaltung festgestellt (Fabian *et al.* 1993). Die experimentell bei *pH* 9,3 erhaltene Übergangstemperatur von 63°C stimmt mit mittels optischer Rotation bei *pH* 7 und vergleichbarer Fremdsalzkonzentration erhaltenen Werten von 62°C (von Hippel *et al.* 1965) überein.

Die entsprechende Analyse für das adsorbierte Protein erfolgte ausschließlich aus der Absorptionsabnahme bei 1643 cm<sup>-1</sup> (s. Abb. IV.40). Das Auftreten eines Doppelmaximums im IR-Spektrum bei 45°C (s. Abb. IV.41) würde einen früheren Übergang vortäuschen, wenn die Position des Maximums der Amid-I-Bande herangezogen würde.

Es resultiert eine Übergangstemperatur von 50°C ± 1°C sowie eine Van't Hoff-Enthalpie von 217 kJ mol<sup>-1</sup> ± 50 kJ mol<sup>-1</sup>. Der relativ große Absolutfehler in der Enthalpiebestimmung ist auf die geringe Anzahl an Messpunkten zurückzuführen. Dennoch resultiert eine signifikante Absenkung der Van't Hoff-Enthalpie bedingt durch die Wechselwirkung der RNase A mit den Polyelektrolytketten der *brushes*. Da sich die Van't Hoff-Enthalpie aus dem Produkt der kalorimetrischen Enthalpie und der Kooperativität des Übergangs ergibt (Winter *et al.* 1998), lässt sich dieser Effekt zum einen auf eine Destabilisierung des Proteins oder auf eine Erhöhung der Kooperativität der Entfaltung zurückführen.

**Tab. IV.15:** Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse über die FT-IR-Spektren in Abb. IV.37 und Abb. IV.38: Die mit ↑ gekennzeichneten Temperaturen gehören dem Heizzyklus (25°C → 75°C), die mit ↓ markierten Temperaturen dem Kühlzyklus (75°C → 25°C). Im entfalteten Zustand des Proteins wurden im Rahmen des experimentellen Fehlers zum Teil negative Werte für den α-Helixgehalt erhalten, welche auf Null gesetzt wurden.

Temperatur [°C]	RNase A in Lösung		RNase A adsorbiert auf KpSS1	
	α-Helix	β-Faltblatt	α-Helix	β-Faltblatt
25 ↑	18	30	12	28
35 ↑	16	28	11	23
45 ↑	14	28	7	21
55 ↑	14	26	0	8
65 ↑	2	11	0	8
75	0	8	0	4
65 ↓	0	13	0	9
55 ↓	11	24	0	8
45 ↓	14	27	0	8
35 ↓	16	27	2	10
25 ↓	18	29	5	8



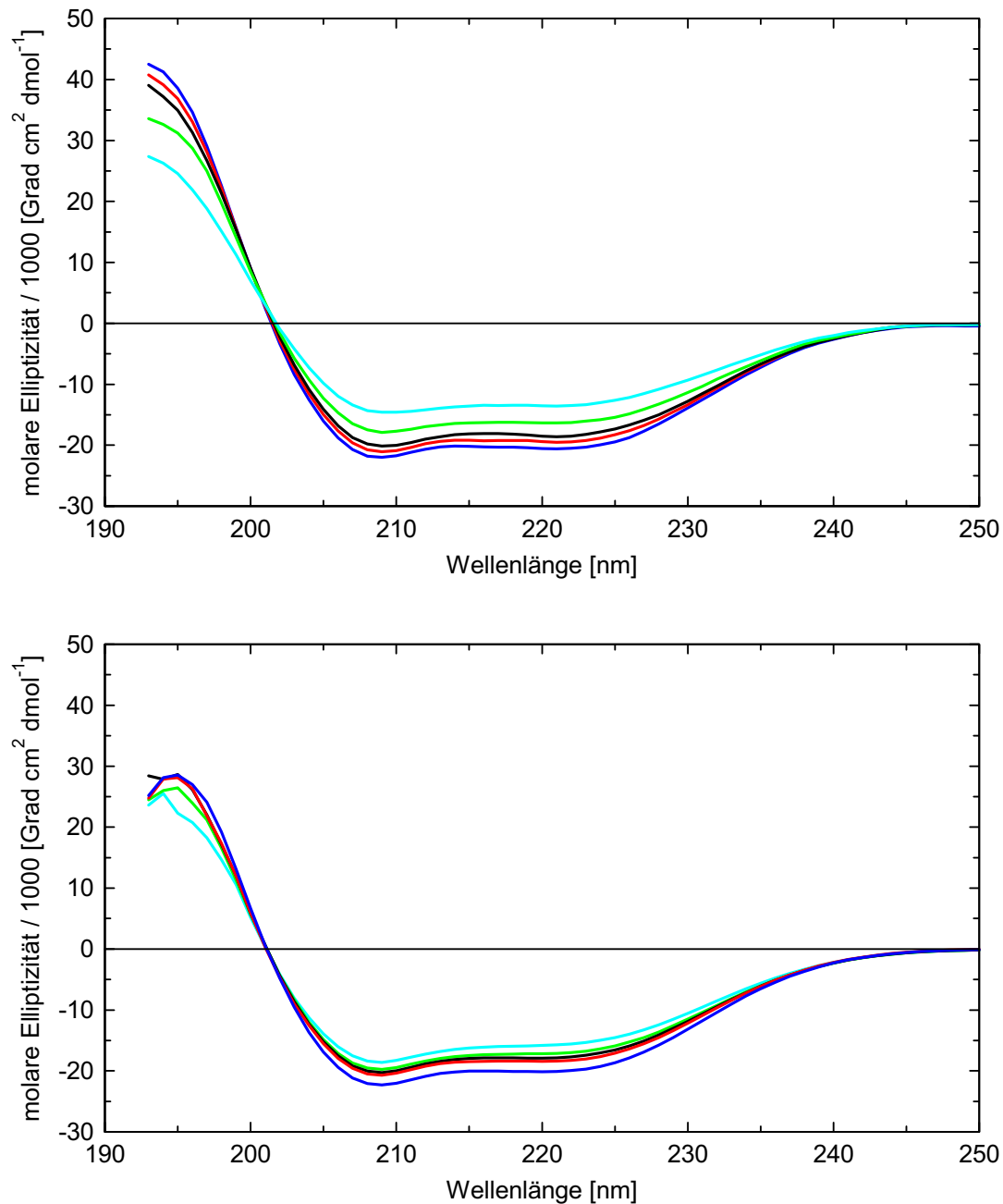
### IV.6.3 Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie

Neben der in Kapitel IV.6.1 vorgestellten Sekundärstrukturanalyse gelöster Proteine mittels Infrarotspektroskopie sind entsprechende Analysen unter Ausnutzung des Circular-dichroismus (CD) möglich (s. Kap. III.2.1). FT-IR- und CD-Spektroskopie sind aufgrund der zur Verfügung stehenden Methoden zur Ableitung der Strukturinformation aus den erhaltenen Spektren mit ähnlichen Prämissen behaftet (Surewicz *et al.* 1993). Allgemein gilt die FT-IR-Spektroskopie als die empfindlichere Methode in bezug auf  $\beta$ -Faltblattstruktur. Die CD-Spektroskopie kann entsprechendes für  $\alpha$ -Helixstruktur in Anspruch nehmen. Damit bot sich die Kombination beider Methoden in der vorliegenden Arbeit an, zumal die potentiellen Fehlerquellen beider Methoden voneinander unabhängig sind.

Leider sind aufgrund der starken Absorption und Streuung von UV-Licht an Latexpartikeln keine CD-Studien der adsorbierten Proteine möglich. Daher beschränkt sich die hier vorgestellte Untersuchung auf das Protein vor Beginn der Adsorptionsexperimente sowie nach Desorption und Abtrennung von den Latexpartikeln. Diese Experimente wurden an Dansyl-gelabeltem BSA (DanBSA2, s. VI.3.10) durchgeführt, welches in 10 mM MES-Puffer ( $pH$  6,1) über einen Konzentrationsbereich von 0,02 – 0,5 mg/ml gelöst wurde. Die Verwendung des fluoreszenzmarkierten Proteins diente dazu, um eine bessere Vergleichsmöglichkeit zu den Strukturuntersuchungen mittels Fluoreszenzspektroskopie zu gewährleisten (s. Kap. IV.6.4). Aufgrund des geringen Markierungsgrads des Proteins von 1,2 Dansylfluorophoren pro Proteinmolekül zeigten sich bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten keine Unterschiede im Vergleich zum unmarkierten Protein (vgl. Kap. IV.3 und Tab. IV.12). Das desorbierte Dansyl-markierte BSA wurde über eine gezielte Erhöhung der Ionenstärke vom *annealed brush* KpS13 freigesetzt (s. VI.2.3). Des weiteren wurden Vergleichsexperimente am Ausgangsprotein bei  $pH$  3,4 durchgeführt.

Die Abbildungen IV.43 und IV.44 geben die erhaltenen Spektren über einen Temperaturbereich von 10 – 60°C wieder. Ein Vergleich dieser Spektren mit den Einzelkomponentenkurven in Abbildung VI.9 zeigt, dass sowohl die Struktur des Proteins vor und nach der Adsorption auf den *brush*-Partikeln von helikalen Bereichen geprägt ist. Jedoch ist eine signifikante Abnahme der molaren Elliptizität bei 195 nm festzustellen, welche auf einen leichten Rückgang an  $\alpha$ -Helixstruktur nach dem Adsorptions-/Desorptionsprozess hindeutet.

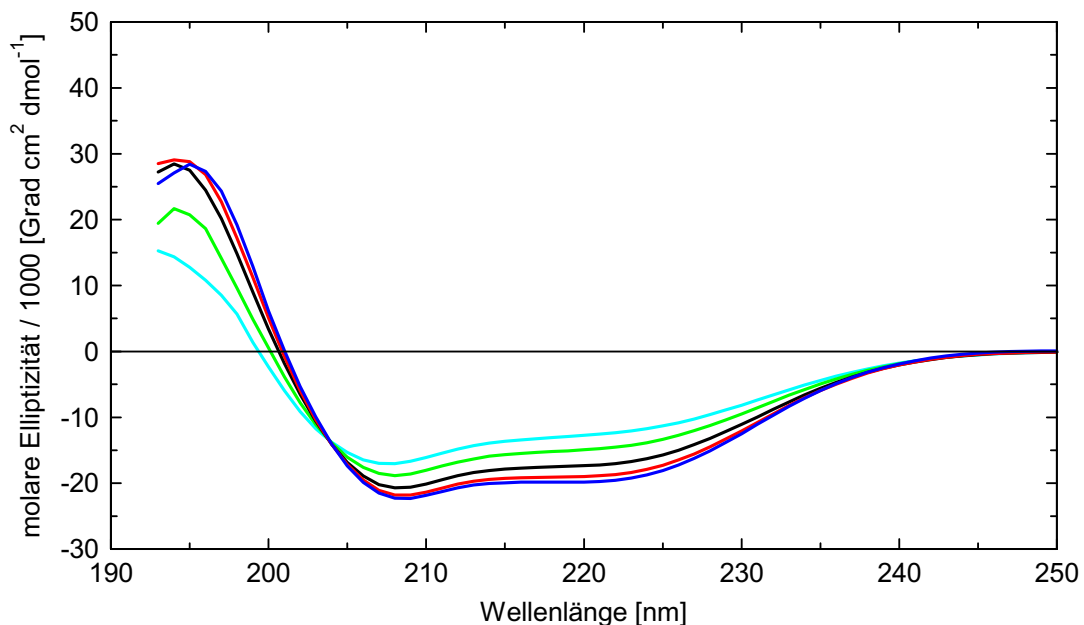
Wie in Kapitel VI.3.9 beschrieben, wurden die CD-Spektren mittels CCA (*convex constraint*-Analyse) in die jeweiligen Einzelbeiträge von  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt, Schleifen sowie Zufallsknäuel zerlegt. Die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturmerkmale des Ausgangsproteins bei  $pH$  6,1 bzw. 3,4 sowie derselben Proteincharge nach Durchlaufen des kompletten Adsorptions-/Desorptionszyklus sind in Tabelle IV.16 zusammengestellt.



**Abb. IV.43:** CD-Spektren von BSA vor Adsorption (oben) sowie nach Desorption und Isolierung vom *annealed brush* KpS13 (unten): Die Spektren wurden über einen Temperaturbereich von 20 – 60°C aufgenommen (dunkelblau: 20°C, rot: 30°C, schwarz: 40°C, grün: 50°C, hellblau: 60°C). Die Spektren bei 20°C weisen ein für  $\alpha$ -Helix-reiche Proteine charakteristisches Aussehen auf.

Der  $\alpha$ -Helixgehalt des Ausgangsproteins bei *pH* 20°C von 68 % zeigt eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit dem mittels FT-IR-Spektroskopie bei 25°C erhaltenen Wert von 67 % (s. Tab. IV.12) sowie Werten aus Proteindatenbanken von 67,7 % (PDB,

<http://www.rcsb.org/pdb/>). Mit steigender Temperatur nimmt dieser Anteil stetig auf 48 % bei 60°C ab. Dies wird durch eine Zunahme der Anteile an  $\beta$ -Faltblatt bzw. Zufallsknäuel kompensiert. Der höhere Anteil an  $\beta$ -Faltblattstruktur bei höheren Temperaturen resultiert in der Ausbildung intermolekularer  $\beta$ -Faltblattstruktur aufgrund einsetzender Proteinaggregation (Green *et al.* 1999, Peters 1985). Die intermolekulare Ausbildung von  $\beta$ -Faltblattstruktur wurde auch bei anderen Proteinen mittels FT-IR-Spektroskopie und Röntgenstreuung beobachtet (Meersman *et al.* 2002, Panick *et al.* 1999).



**Abb. IV.44:** CD-Spektren von BSA bei  $pH$  3,4 (dunkelblau: 20°C, rot: 30°C, schwarz: 40°C, grün: 50°C, hellblau: 60°C): Bei diesem  $pH$ -Wert liegt das Protein in der F-Form vor (Carter *et al.* 1994).

BSA, welches auf *annealed brushes* adsorbiert war und wieder von den Partikeln freigesetzt wurde, weist nahezu seine native Sekundärstruktur auf. Im Vergleich zum Ausgangsprotein (s. Tab. IV.16) ist zwar bei 20°C ein um 11 % kleinerer  $\alpha$ -Helixanteil feststellbar, die Anteile bei 60°C stimmen hingegen wieder überein. Änderungen im Faltblattanteil sowie eine Zunahme an ungeordneten Strukturbereichen, welche wie oben diskutiert auf eine Aggregation bzw. eine Denaturierung des Proteins hinweisen würden, sind nicht festzustellen. Der Verlust an Helixstruktur scheint durch die Zunahme schleifenartiger Struktur ausgeglichen zu werden.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass im Falle der FT-IR-Spektroskopie bei 25°C lediglich eine Abnahme an Helixstruktur von 2 % bei derselben Proteincharge festgestellt wurde. In Anbetracht der experimentellen Fehlerquellen der voneinander unabhängigen Methoden ist

dennoch eine recht gute Übereinstimmung zu verzeichnen. Ferner muss in Betracht gezogen werden, dass das desorbierte Protein erst nach langwierigen Ultrafiltrationsschritten (s. VI.2.3) mit einer Gesamtdauer von bis zu 14 Tagen erhalten wurde. Aus diesem Grunde sind strukturelle Änderungen nicht ausschließen, welche auf die lange Verweilzeit in wässriger Lösung zurückzuführen sind.

**Tab. IV.16:** Sekundärstruktur von BSA zu Beginn der Adsorptionsexperimente sowie nach Freisetzung und Isolierung von den Latexpartikeln KpS13. Zum Vergleich sind zusätzlich Werte für das Ausgangsprotein bei einem reduziertem *pH*-Wert von 3,4 aufgeführt

Temperatur [°C]	Anteil des jeweiligen Sekundärstrukturelements <sup>1</sup> [%]				RMS- Fehler <sup>2</sup>
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Schleifen	Zufallsknäuel	
BSA vor Adsorption, <i>pH</i> 6,1					
20	68	0	27	5	1,4
30	66	3	26	5	1,2
40	64	5	24	7	1,2
50	59	9	22	10	1,8
60	48	17	23	12	2,6
BSA nach Desorption von den <i>brush</i> -Partikeln, <i>pH</i> 6,1					
20	57	1	36	5	4,2
30	57	2	32	9	2,0
40	56	3	31	10	2,2
50	56	4	30	11	1,6
60	49	9	31	11	3,1
BSA bei <i>pH</i> 3,4					
20	58	0	29	13	2,9
30	56	0	29	15	1,6
40	52	1	30	18	1,7
50	43	4	32	20	2,3
60	32	9	37	22	5,0

1) Größtfehler der jeweiligen Strukturanteile:  $\pm 2\%$  ( $\alpha$ -Helix),  $\pm 2\%$  ( $\beta$ -Faltblatt),  $\pm 4\%$  (Schleifen) sowie  $\pm 4\%$  (Zufallsknäuel)

2) Abweichung zwischen aufgenommenem CD-Spektrum und dem aus den daraus abgeleiteten Einzelkomponentenkurven zusammengesetzten Spektrum (s. VI.3.9)

Der *pH*-Wert der äußeren Umgebung der *brushes* ist über das Puffersystem auf 6,1 eingestellt. Der *pH*-Wert innerhalb der Polyelektrolytbürsten und damit der Mikroumgebung der adsorbierten Proteine ist jedoch im Vergleich zur äußeren Umgebung erniedrigt (s. Kap.

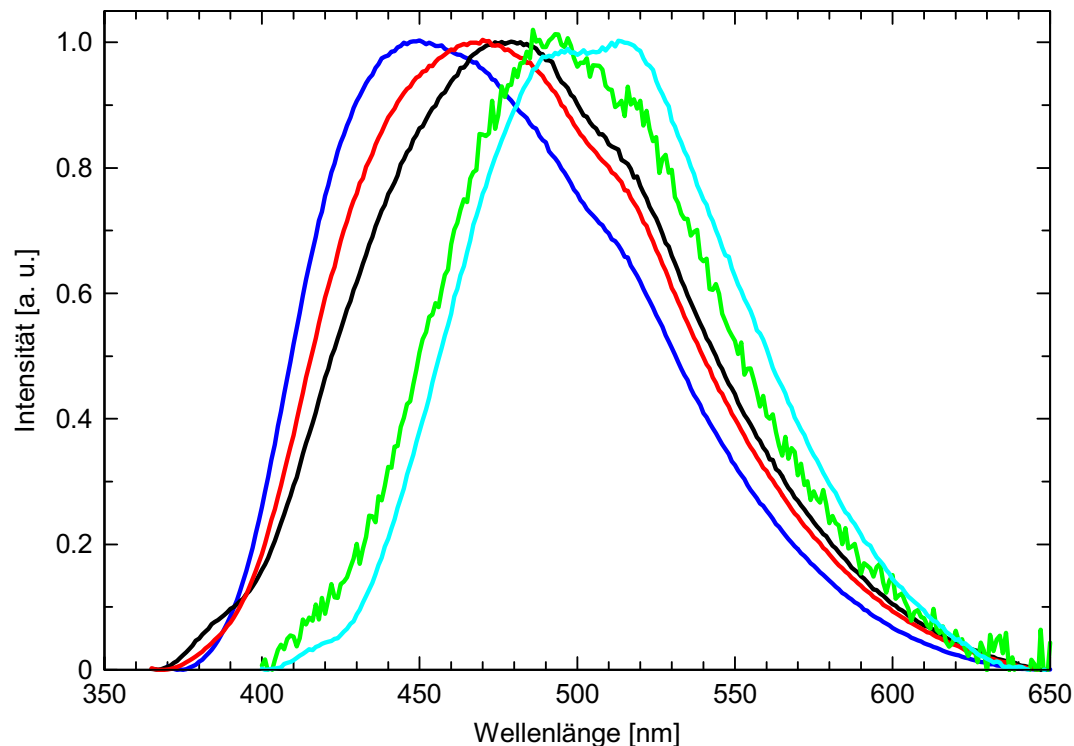
III.1.5). Natives BSA geht bei *pH*-Erniedrigung unter 4,3 von der sogenannten N-Form in die F-Form über. Bei *pH* 2,7 erfolgt ein weiterer Übergang in die E-Form des Proteins (Peters 1985). Die F-Form lässt sich wahrscheinlich auf die Entfaltung einer der drei Domänen des Proteins zurückführen (Carter *et al.* 1994). Im Falle von *annealed brushes* ist eine derart saure Umgebung der Proteinmoleküle auszuschließen (vgl. Kap. III.1.5). Jedoch könnte ein Übergang in die F-Form bedingt durch die Wechselwirkung mit den Polyelektrolytketten dennoch bevorzugt sein. Aus diesem Grunde wurden die oben erwähnten Referenzexperimente am Ausgangsprotein bei *pH* 3,4 durchgeführt (s. Abb. IV.44). Aus den Ergebnissen der Messung bei 20°C ist eine durch die *pH*-Erniedrigung bedingte Abnahme an  $\alpha$ -Helixstruktur zu erkennen, welche wiederum durch eine Zunahme an ungeordneter Struktur kompensiert wird (Tab. IV.16). Dies ist mit der Teilentfaltung des Proteins beim Übergang in die F-Form konsistent (Carter *et al.* 1994). Da zudem bei Temperaturerhöhung signifikante Unterschiede sowohl im Helixgehalt, als am Anteil an ungeordneter Struktur auftreten, können die oben geschilderten Beobachtungen nicht auf einen adsorptionsinduzierten Übergang des Proteins in die F-Form zurückgeführt werden.

In Übereinstimmung mit den FT-IR-spektroskopischen Untersuchungen (s. IV.6.1) bestätigen die CD-Analysen die einzigartige Fähigkeit der *brushes*, Proteine ohne größere Eingriffe in deren Sekundärstruktur adsorptiv zu binden. Im Falle der Proteinadsorption auf einer festen Oberfläche ist das Protein gezwungen sich an die Substratoberfläche anzupassen, während die Polyelektrolytketten der *brushes* aufgrund deren Flexibilität den Kontakt zu den Proteinmolekülen optimieren können.

#### IV.6.4 Analyse der Tertiärstruktur mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die IR- bzw. CD-spektroskopischen Untersuchungen ermöglichten den Zugang zur Sekundärstruktur der Proteine sowohl im adsorbierten Zustand, als auch nach Wiederfreisetzung von den *brushes* (s. IV.6.1 u. IV.6.3). Die gewonnenen Strukturinformationen sollten durch eine Tertiärstrukturanalyse ergänzt werden. Czeslik *et al.* (2001) machten sich die intrinsische Fluoreszenz der Tryptophan-Einheiten in Lysozym zunutze, um die Entfaltung des Proteins auf Silica-Partikel zu studieren. Neben Tryptophan mit einem Absorptionsmaximum bei 280 nm (Winter *et al.* 1998) würden jedoch ebenfalls die aromatischen Gruppen des Polystyrol-Kerns der *brushes* angeregt werden. Daher war eine analoge Vorgehensweise nicht möglich. Es musste auf eine extrinsische Fluoreszenzsonde zurückgegriffen werden. Die Wahl fiel auf das Dansyl-Fluorophor, da diese Gruppe eine außergewöhnliche Sensitivität in bezug auf seine Umgebung zeigt. So tritt bei Erhöhung

der Polarität oder der Hydrophilie des Lösungsmittels eine starke Stokes-Verschiebung im Emissionsspektrum des Fluorophors auf (Wang *et al.* 1993). Konformationsänderungen der Proteinmoleküle können daher über die Fluoreszenz einer an das Protein gebundenen Dansyl-Gruppe detektiert werden.



**Abb. IV.45:** Fluoreszenzspektren von Dansyl-markiertem BSA in Lösung: Als Bezugspunkt dient das bei  $pH$  6,1 und  $20^{\circ}C$  aufgenommene Spektrum des Proteins vor Beginn der Adsorption (dunkelblau). Das Spektrum des von den *brush*-Partikeln wieder freigesetzten Proteins (rot) ist bei den gleichen Versuchsbedingungen leicht rotverschoben. Eine deutlich höhere Rotverschiebung weist hingegen das Spektrum des adsorbierten Proteins auf (grün). Zusätzlich sind Spektren des Ausgangsproteins bei  $pH$  3,7 und  $20^{\circ}C$  (schwarz) sowie im thermisch denaturierten Zustand bei  $pH$  6,1 und  $75^{\circ}C$  (hellblau) aufgetragen. Sämtliche Spektren sind auf ihrem Maximalwert normiert.

Die kovalente Anbindung des Fluorophors an die BSA-Moleküle erfolgte nach einer von Wang *et al.* (1993) beschriebenen Methodik (s. VI.3.10). Die Anregung des Fluorophors erfolgte bei 340 nm. Das Maximum der Fluoreszenzbande des Dansyl-markierten BSA liegt bei 445 nm (s. Abb. IV.45). Bei Temperaturerhöhung verschiebt sich das Maximum zu höheren Wellenlängen und ist bei  $75^{\circ}C$  bei 505 nm lokalisiert. Die Rotverschiebung des Emissionsspektrums von 60 nm kann auf eine Zunahme der mittleren Polarität der unmittelbaren Umgebung der Fluorophore zurückgeführt werden, welche wiederum durch die thermische Entfaltung des Proteins hervorgerufen wird.

Zur Untersuchung adsorptionsinduzierter Einflüsse auf die Proteinstruktur wurde Dansyl-markiertes BSA mit KpS13-Partikeln (*annealed brush*) im Verhältnis 0,4 : 1 in 10 mM MES-Puffer (*pH* 6,1) inkubiert. Im Gegensatz zu anderen Experimenten wurde an dieser Stelle auf eine Abtrennung von nicht-adsorbiertem Protein verzichtet. Der Anteil an freiem Protein ist bei diesem Mischungsverhältnis vernachlässigbar.

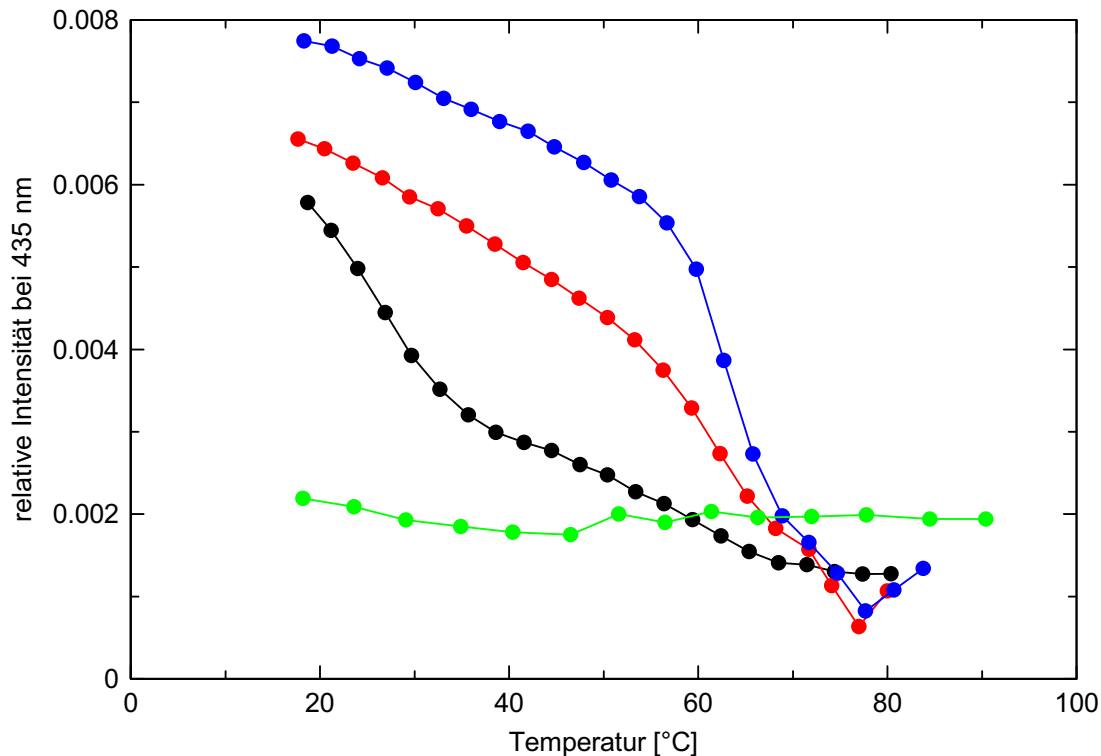
Wie Abbildung IV.45 zu entnehmen ist, weist das Spektrum des adsorbierten Proteins eine starke Rotverschiebung relativ zum Spektrum des Ausgangsproteins und gleicht dem Spektrum des thermisch-denaturierten Proteins. Dieses Ergebnis deutet auf eine durch die Adsorption ausgelöste Störung der Tertiärstruktur des Proteins hin, wodurch Wassermoleküle in das Proteininnere gelangen. Es ist jedoch keineswegs aus den Ergebnissen zu schließen, dass eine Denaturierung des Proteins vorliegt, wie die Sekundärstrukturanalysen gezeigt haben (s. Kap. IV.6.1.2 u. IV.6.3). Die erhaltenen Fluoreszenzspektren spiegeln vielmehr ausschließlich lokale Änderungen um das Fluorophor wieder. Dennoch geht aus den Resultaten eine Änderung der Tertiärstruktur des Proteins hervor.

Die thermische Entfaltung von freiem wie adsorbierten Dansyl-BSA lässt sich aus der Auftragung der Fluoreszenzintensitäten bei 435 nm über einen Temperaturbereich von 18 - 80°C verfolgen (s. Abb. IV.46). Die Intensität des freien Dansyl-BSA zeigt einen S-förmigen Verlauf mit einem Übergangsbereich von 60 – 63°C, welcher der Entfaltungstemperatur der Proteinstruktur entspricht. Dieser Temperaturbereich stimmt mit der kalorimetrisch von La Rosa *et al.* (1994) bestimmten Übergangstemperatur von 62°C für BSA bei *pH* 7 überein.

Nach Adsorption des Proteins auf die *brush*-Partikel ist keine Temperaturabhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität mehr feststellbar (s. Abb. IV.46). Dies ist auf eine bereits bei niedriger Temperatur veränderte Tertiärstruktur der adsorbierten Proteinmoleküle zurückzuführen. Dadurch liegen die Dansyl-Fluorophore des adsorbierten Proteins vollständig hydratisiert vor, wodurch die Dansyl-Fluoreszenz nicht mehr zur Beobachtung einer thermischen Entfaltung herangezogen werden kann.

In einem weiteren Experiment wurde adsorbiertes Dansyl-markiertes BSA durch Erhöhung der Ionenstärke wieder von den KpS13-Partikeln freigesetzt (s. VI.2.3) und einer Fluoreszenzuntersuchung unterzogen. Abbildung IV.45 bzw. IV.46 ist zu entnehmen, dass die adsorptionsbedingte Änderung der Tertiärstruktur des Proteins überwiegend reversibel verläuft. Dennoch ist das Spektrum des desorbierten Proteins gegenüber dem Spektrum des Ausgangsproteins leicht rotverschoben, was auf eine unvollständige Rückfaltung der Moleküle in ihre native Tertiärstruktur hindeutet. Die Temperaturabhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität bei 435 nm weist denselben Übergangsbereich wie die Kurve des Proteins zu Beginn der Adsorptionsexperimente auf (s. Abb. IV.46). Damit besitzt das freigesetzte Protein dieselbe Entfaltungstemperatur wie zu Beginn der Adsorption. Zudem überlappen sich die Kurven der relativen Fluoreszenzintensität des Proteins vor und nach der Adsorption auf den *brushes* oberhalb 65°C. Folglich bleibt die

thermische Stabilität des Dansyl-BSA durch die zwischenzeitige Adsorption auf den *brushes* unbeeinflusst.

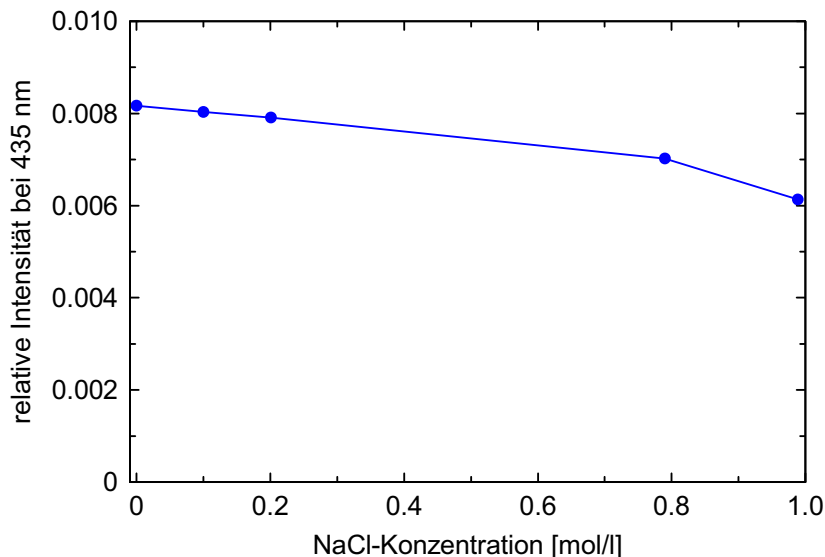


**Abb. IV.46:** Auf die Gesamtintensität normierte Fluoreszenzintensität von Dansyl-markiertem BSA bei 435 nm in Abhängigkeit der Temperatur: Die blaue Kurve gibt den Intensitätsverlauf des Proteins vor Beginn der Adsorption bei  $pH$  6,1 wieder. Die Fluoreszenzintensität des von den *brush*-Partikeln wieder freigesetzten Proteins (rot) zeigt einen ähnlichen Verlauf. Einen nahezu temperaturunabhängigen Verlauf weist hingegen die Fluoreszenzintensität des adsorbierten Proteins auf (grün). Als Vergleich sind die entsprechenden Daten für das Ausgangsprotein bei  $pH$  3,7 (schwarz) aufgetragen. Die abgeschätzten Fehler der Intensitäten betragen  $\pm 2 \cdot 10^{-4}$  für die Proteinlösungen bzw.  $\pm 5 \cdot 10^{-4}$  bei den Messungen des adsorbierten Proteins in wässriger Suspension.

Um die Ergebnisse der Fluoreszenzstudien zu untermauern, waren verschiedene Kontroll-experimente erforderlich. Zum einem wurde untersucht, ob BSA bedingt durch den niedrigeren  $pH$ -Wert innerhalb des *brush* in die F-Form des Proteins übergeht. Die Möglichkeit eines derartigen Übergangs wurde schon in Zusammenhang mit der CD-Spektroskopie (s. Kap. IV.6.3) erörtert. In Lösung liegt die F-Form zwischen  $pH$  2,7 und 4,3 vor (Peters 1985). Zwar sollten die Proteine im *brush* keine derart saure Umgebung vorfinden, dennoch könnte bedingt durch die Wechselwirkung mit den Polyelektrolyt-ketten die Ausbildung der F-Form begünstigt sein.



Aus diesem Grunde wurden Referenzexperimente an Dansyl-BSA-Lösungen bei  $pH$  3,7 durchgeführt. Hierbei wurde ein Maximum der Fluoreszenzintensität bei 479 nm beobachtet (s. Abb. IV.45). Damit unterscheidet es sich vom Fluoreszenzspektrum des adsorbierten Proteins mit einem Maximum bei 491 nm. Bereits aus diesem Experiment geht hervor, das BSA während der Adsorption nicht in die F-Form entfaltet. Dies wird auch bei Betrachtung des Verlaufs der relativen Fluoreszenzintensität über einen Temperaturbereich von 18 - 80°C ersichtlich (s. Abb. IV.46). Im Gegensatz zum adsorbierten Protein entfaltet die F-Form bei  $pH$  3,7 in zwei Stufen mit einer Zwischenstufe um 40 – 65°C. Wie auch die CD-Studien gezeigt haben (s. IV.6.3), ist die adsorptionsinduzierte Änderung der Tertiärstruktur des strukturell anpassungsfähigen Proteins (Carter *et al.* 1994) somit nicht durch einen Übergang des Proteins in die F-Form erklärbar.



**Abb. IV.47:** Einfluss der Ionenstärke auf die Fluoreszenz von Dansyl-markiertem BSA bei 25°C und  $pH$  6,1 (10 mM MES-Puffer). Der experimentelle Fehler der Intensitäten beträgt  $\pm 2 \cdot 10^{-4}$ .

Neben einem erniedrigten  $pH$ -Wert im Inneren des *brush* liegt bedingt durch die Gegenionen der Polyelektrolytketten eine höhere Ionenstärke im Vergleich zum äußeren Medium vor (vgl. Kap. III.1.1). Folglich musste zusätzlich der Einfluss der Ionenstärke auf die Fluoreszenzintensität des Fluorophors untersucht werden. Abbildung IV.47 gibt die auf die Gesamtfluoreszenzintensität normierten Fluoreszenzintensitäten bei 435 nm als Funktion der Fremdsalzkonzentration wieder. Im Bereich hoher Proteinadsorption bei Ionenstärken unter 0,1 M (s. Kap. IV.4.2) zeigt sich keine signifikante Abhängigkeit des Fluoreszenzspektrums von der Ionenstärke.

Die FT-IR- und die CD-Studien (s. IV.6.1.2 bzw. IV.6.3) ließen Änderungen der Sekundärstruktur bei der Adsorption von BSA auf *annealed brushes* ausschließen. Somit kann die adsorptionsbedingte Rotverschiebung des Fluoreszenzspektrums des Dansyl-BSA allein auf einer Änderung der Tertiärstruktur des Proteins beruhen. Im Umkehrschluss stützen die Fluoreszenzstudien die These (s. IV.6.1), dass der weitgehende Erhalt der Sekundärstruktur des Proteins während der Adsorption auf die Flexibilität der Tertiärstruktur von BSA (Carter *et al.* 1994) zurückzuführen ist.

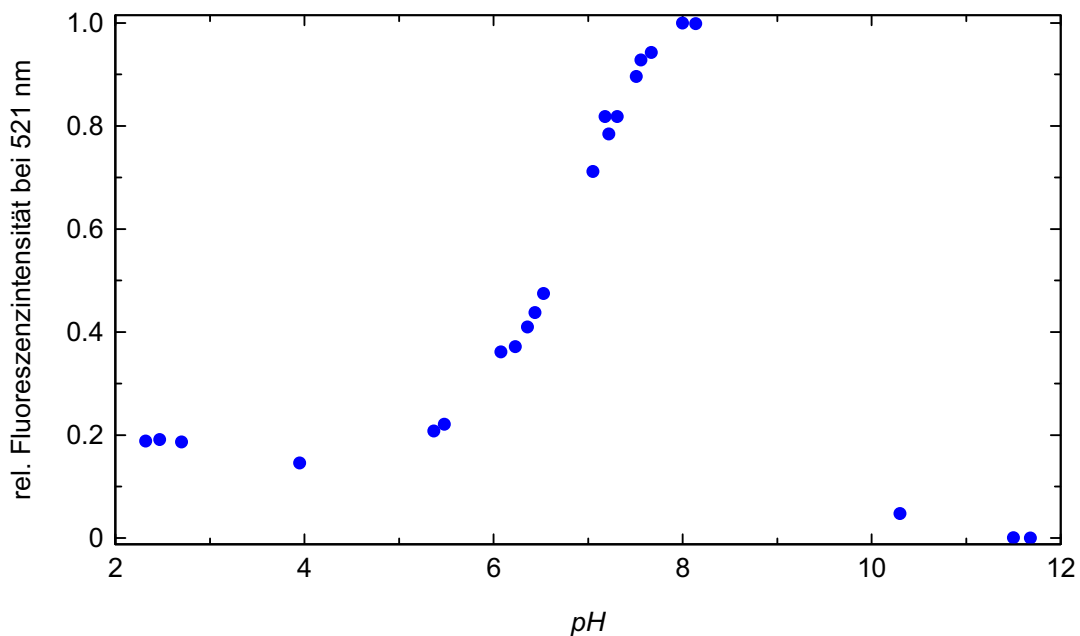
### IV.7 Visualisierung der adsorbierten Proteine mittels Konfokalmikroskopie

In Kooperation mit dem Institut für Nanotechnologie (INT) des Forschungszentrums Karlsruhe sollte zur Ergänzung der bisher vorgestellten Experimente zusätzlich ein optischer Beleg für die Proteinadsorption auf den *brush*-Partikeln erbracht werden. Als Methode wurde hierbei auf die am INT etablierte Technik der Laser-Scanning-Konfokalmikroskopie (LSCM) zurückgegriffen (s. VI.3.11). Da hierbei letztlich die Fluoreszenzintensität der Probe detektiert wird, war der Einsatz von fluoreszenzgelabeltem Protein erforderlich. Hierzu wurde FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markiertes BSA (Sigma) eingesetzt. Pro BSA-Molekül waren bei der eingesetzten Proteincharge im Schnitt 10 Moleküle der extrinsischen Fluoreszenzsonde kovalent angeknüpft. Das Absorptionsmaximum des Fluorophors liegt bei 495 nm. Das Maximum der Fluoreszenzintensität ist bei 516 nm zu beobachten (Winter *et al.* 1998), wobei die Fluoreszenzintensitäten sehr stark vom *pH*-Wert des Lösungsmittels bestimmt werden (Robeson *et al.* 1996).

Vor Beginn der eigentlichen konfokalmikroskopischen Untersuchungen wurde daher die *pH*-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des FITC-BSA untersucht. Hierzu wurden 0,3  $\mu\text{M}$  Proteinlösungen unterschiedlichen *pH*-Werts aber gleicher Ionenstärke von 40 mM hergestellt. Mit einem Spektrometer der Firma Jobin Yvon (FluoroMax-3) wurde die Fluoreszenzintensität der Lösungen bei 521 nm bestimmt, wobei das Fluorophor bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wurde. Es zeigte sich dabei ein Maximum der Fluoreszenzintensität bei *pH* 8 (s. Abb. IV.48). Bei niedrigem *pH* betrug die Intensität nur 15 - 20 % des Maximalwerts. Im Bereich von *pH* 5 – 8 war eine steile Zunahme der Fluoreszenzintensität festzustellen. Nach Erreichen des Maximums bei *pH* 8 war wiederum ein Rückgang der Fluoreszenz zu verzeichnen. Oberhalb *pH* 11 konnte keine Fluoreszenz mehr beobachtet werden.

Die Fluoreszenzintensität beträgt bei dem durch den MES-Puffer vorgegebenen *pH*-Wert von 6,1 knapp 40 % des Maximalwerts bei *pH* 8. Aufgrund des hohen Markierungsgrads sowie des enormen Proteinbindungsvermögens der *brushes* stellte sich dies als ausreichend

für konfokalmikroskopische Untersuchungen heraus. Bei letzteren erwies sich eine kombinierte Anregung bei einer Wellenlänge von 458 nm sowie 488 nm am geeignetsten, um sowohl eine gute Auflösung, als auch eine hohe Fluoreszenz zu erzielen. In einem ersten Experiment wurde eine Probe der Proteincharge im trockenen Zustand auf einen Glasobjektträger aufgebracht und unter dem Mikroskop untersucht (Abb. IV.49). Die hohe Fluoreszenzausbeute bestätigte zum einen die gewählte Methodik und wies zum anderen auf die Eignung der Proteincharge zu weitergehenden Experimenten hin.

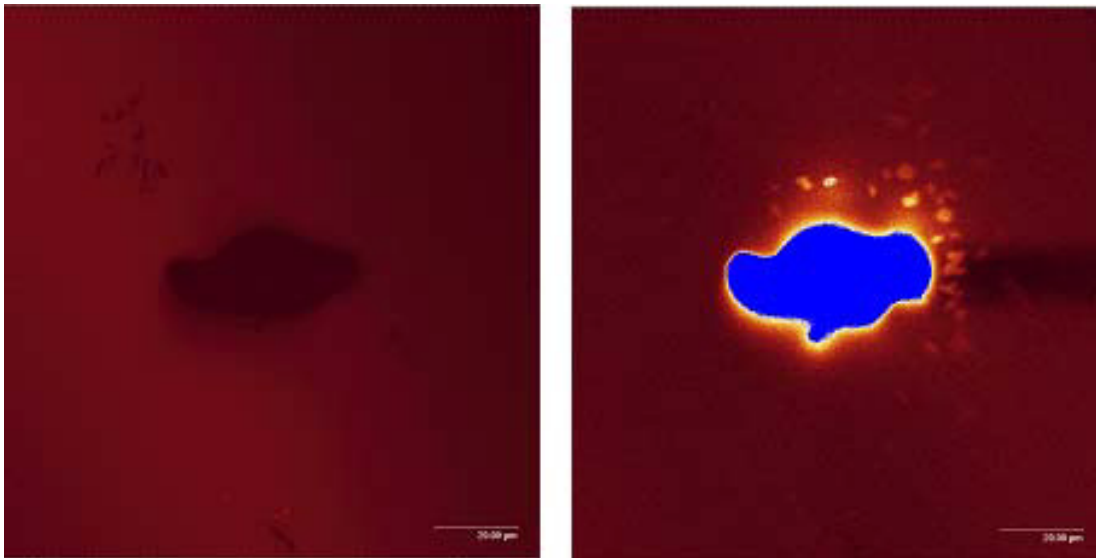


**Abb. IV.48:** *pH*-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von FITC-BSA bei einer Wellenlänge von 521 nm: Die Fluoreszenzintensitäten wurden auf die maximale Fluoreszenzintensität bei *pH* 8 normiert. Obwohl das Fluorophor in mehreren protonierten Formen mit unterscheidbaren  $pK_a$ -Werten vorliegen kann, zeigt sich nach Anbindung an das Protein nur eine Übergangsstufe im Bereich von *pH* 5 – 8. Oberhalb *pH* 11 verliert das Fluorophor die Fähigkeit zur Fluoreszenz.

Für die weiteren Untersuchungen wurde eine Suspension des *annealed brush* KpS14 verwendet, auf welchem zuvor nach der in Kapitel V.2.2 beschriebenen Methodik 756 mg FITC-BSA ( $\hat{=}$  714 mg BSA) pro Gramm Latexpartikel adsorptiv gebunden wurden. Dieser Adsorptionsgrad wurde durch Zugabe von 48,6 mg FITC-BSA zu 50,0 mg Latexpartikeln erzielt. Somit wurden 78 % des eingesetzten FITC-BSA adsorbiert.

In einem vergleichbaren Experiment mit unmarkiertem BSA wurden 90 % des Proteins auf den KpS14-Partikeln gebunden. Dieser Unterschied ist nicht weiter überraschend, da das markierte Protein durch die Konjugation mit dem Fluorophor im Schnitt 10 freie Aminogruppen weniger aufweist. Somit stehen weniger positiv geladene Bereiche auf der Proteinoberfläche zur Verfügung, welche mit dem *brush* wechselwirken könnten. Der

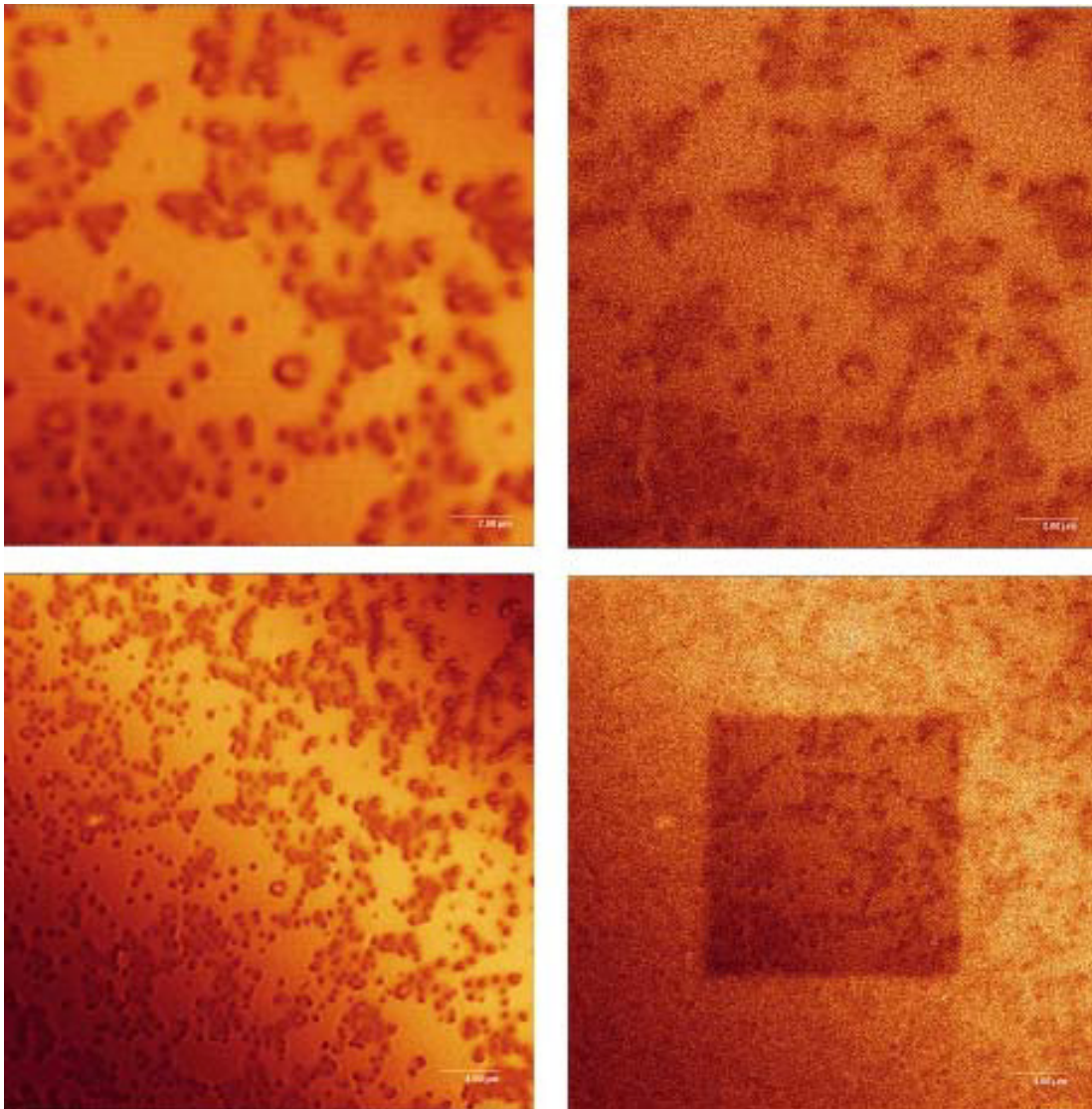
beobachtete Unterschied im Adsorptionsgrad korreliert zudem mit der Anzahl der positiv geladenen Aminosäuren beider Proteine bei  $pH$  6,1.



**Abb. IV.49:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen (links: Reflektion, rechts: Fluoreszenz; Objektiv 50 $\times$  / Luft) einer trockenen Probe von FITC-BSA auf einer Glasoberfläche (Ausschnitt 132  $\mu m$   $\times$  132  $\mu m$ ): Das Protein zeigt unter den Versuchsbedingungen eine derart starke Fluoreszenz, dass eine Sättigung des Photodetektors resultiert ( $\rightarrow$  blaue Fläche).

In einer früheren Zusammenarbeit mit dem INT (Mei *et al.* 2003) wurde bereits die Wechselwirkung verschieden geladener *brushes* mit unterschiedlichen Substratoberflächen studiert. Bei Aufbringen eines Tropfens der Suspension auf eine frisch gespaltene Glimmeroberfläche zeigte sich eine gute Benetzung der Oberfläche durch das Dispersionsmittel. Daher konnte nach Eintrocknung der Suspension eine relativ gleichmäßige Verteilung einzelner Partikel sowie zweidimensional angeordneter Partikelagglomerate mittels Rasterkraftmikroskopie beobachtet werden. Als weiterer Vorteil von Glimmer als Substrat erwies sich zudem, dass er bei der gewählten Anregungsmethodik keinerlei Eigenfluoreszenz zeigte.

Ein Tropfen von 20  $\mu l$  einer 0,01 Gew.-%igen Suspension der mit dem fluoreszenzmarkierten Protein beladenen *brush*-Partikel wurde auf ein frisch gespaltenes Glimmerplättchen aufgebracht. Die Partikelkonzentration wurde dabei so gewählt, dass eine Mehrschichtenbildung der Partikel auf der Glimmeroberfläche ausblieb. Nach Eintrocknung des Tropfens wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen mit einem 50-fach vergrößernden Objektiv in Luft aufgenommen (s. Abb. IV.50).



**Abb. IV.50:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen (links oben u. unten: Reflektion, rechts oben u. unten: Fluoreszenz; Objektiv 50 $\times$  / Luft) eines eingetrockneten Tropfens einer Suspension des FITC-BSA-beladenen *brush* KpS14 auf einer Glimmeroberfläche (Ausschnitt oben: 17  $\mu\text{m}$   $\times$  17  $\mu\text{m}$ , unten: identische Probenstelle nach digitalem *Zoom Out*: 37  $\mu\text{m}$   $\times$  37  $\mu\text{m}$ ): In den Bereichen zwischen den Latexpartikeln ist eine höhere Fluoreszenz als am Ort der Partikel festzustellen. Mit steigender Anzahl durchgeführter Scans bleicht die Fluoreszenz sowohl zwischen den Partikel, als auch am Ort der Latexpartikel aus. Das dunkle Quadrat im rechten unteren Bild nach zehnmalem Abscannen der Fläche erhalten.

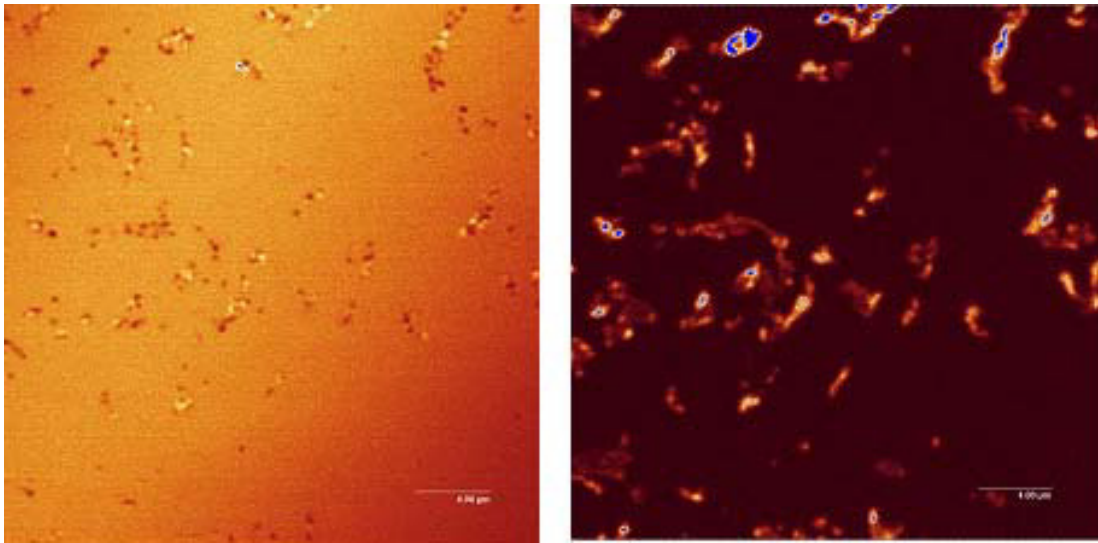
Die Protein-beladenen Latexpartikel setzen sich in der Reflektionsaufnahme (s. Abb. IV.50 links) optisch deutlich von der Glimmeroberfläche ab. Daher ist eine gute Positionsbestimmung der einzelnen Partikel möglich. Vergleichbar mit früheren Untersuchungen an unbeladenen *brushes* (Mei *et al.* 2003) lagern sich auch die Protein-beladenen Partikel weitgehend zu kleineren Partikelagglomeraten auf der Glimmeroberfläche zusammen. Die

sphärische Gestalt der einzelnen Partikel ist dennoch auch innerhalb der Aggregate ersichtlich. Das Eintrocknen des Suspensionströpfchens auf der Substratoberfläche ist mit einer Zunahme der Partikelkonzentration innerhalb des Tropfens verbunden. Gravitationskräfte können aufgrund der Partikelgröße ausgeschlossen werden (Kralchewsky *et al.* 2000). Solange noch Wasser vorhanden ist, verhindert die elektrosterische Stabilisierung durch die *brush*-Schicht die Aggregation der einzelnen Partikel. Wenn jedoch die Flüssigkeitsschicht über den Partikeln weiter abnimmt, sollte aufgrund von lateralen Kapillarkräften eine attraktive Wechselwirkung zwischen den Partikeln vorliegen. Da die Partikel zudem negativ geladen sind, sollte eine elektrostatische Abstoßung von der ebenfalls negativ geladenen Glimmeroberfläche erwartet werden. Dadurch wird eine Neuordnung der Partikel innerhalb des eintrocknenden Tröpfchens möglich (Mei *et al.* 2003).

Vergleicht man nun die zugehörige Fluoreszenzaufnahme mit der Reflektionsaufnahme (s. Abb. IV.50), ist überraschenderweise am Ort der Protein-beladenen Partikel eine geringere Fluoreszenz gegenüber den Bereichen zwischen den Partikelagglomeraten festzustellen. Wie bereits angesprochen, scheidet eine Eigenfluoreszenz der Glimmeroberfläche aus. Daher muss dieser Effekt auf die Suspensionsprobe zurückzuführen sein. Somit scheint beim Eintrocknen der Suspensionsprobe zumindest ein Teil der Proteinmoleküle freigesetzt und über die Glimmeroberfläche verteilt zu werden.

Bei zunehmender Anzahl durchgeführter Oberflächenscans macht sich ein Ausbleichen der Fluoreszenz sowohl im Bereich der über die Oberfläche verteilten Proteine, als auch am Ort der Latexpartikel bemerkbar (s. Abb. IV.50). Eine Eigenfluoreszenz der Glimmeroberfläche sowie der unbeladenen Latexpartikel ist bei der gewählten Anregungsmethodik auszuschließen. Dieses wurde durch Referenzexperimente an unbeladenen *brushes* bestätigt. Somit lässt sich die beobachtete Fluoreszenz allein auf das markierte Protein zurückführen. Letzteres ließ erstmalig aus den konfokalmikroskopischen Untersuchungen darauf schließen, dass auf den Latexpartikeln vor dem Eintrocknen tatsächlich fluoreszenzmarkiertes Protein vorlag.

Einen definitiven Aufschluss lieferte aber erst folgendes Experiment: Das Glimmerplättchen wurde mit entionisiertem Wasser überschichtet. Die anschließende Untersuchung wurde mit einem Flüssigkeitsobjektiv (63×) im wässrigem Medium vorgenommen. Der Reflektionsaufnahme in Abbildung IV.51 ist zu entnehmen, dass während der Benetzung ein Großteil der Partikel wieder desorbiert wurde. Nur einzelne Partikel bzw. Partikelansammlungen verblieben auf der Oberfläche. Dies kann über die geringe Affinität der negativ geladenen *brushes* zu der gleichnamig geladenen Glimmeroberfläche erklärt werden (Mei *et al.* 2003). Bei Betrachtung der zugehörigen Fluoreszenzaufnahme sticht die hohe Intensität im Bereich der Latexpartikel hervor, während die Fluoreszenz der Umgebung nicht mehr wahrnehmbar ist (Abb. IV.51 rechts). Generell ist in flüssiger Phase oft eine höhere Fluoreszenz als im trockenen Zustand zu beobachten. Im vorliegenden Fall scheint sich dies besonders auf die Protein-beladenen Partikel auszuwirken.



**Abb. IV.51:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen (links: Reflektion, rechts: Fluoreszenz; Objektiv 63× / Wasser) von mit FITC-BSA-beladenen KpS14-Partikeln auf einer mit Wasser überschichteten Glimmeroberfläche (Ausschnitt: 37  $\mu\text{m}$   $\times$  37  $\mu\text{m}$ ): Den Protein-beladenen Latexpartikeln ist eine hohe Fluoreszenzintensität zuzuordnen.

Die Bereiche hoher Fluoreszenz lassen sich unter Einbeziehung der Reflektionsaufnahme eindeutig den Latexpartikeln zuordnen. Somit ist kein kompletter Transfer des Proteins auf die Glimmeroberfläche beim Eintrocknen des Suspensionstropfens erfolgt. Wahrscheinlich wurden vielmehr nur schwächer gebundene Proteinanteile in den äußeren Schichten der *brushes* freigesetzt. Die Fluoreszenz der auf den *brushes* gebundenen Proteinmoleküle tritt erst bei den Experimenten in wässriger Umgebung gänzlich zutage. Eventuell sind hierfür die veränderten Solvateinflüsse auf das Fluorophor verantwortlich. Eine Überschichtung der auf der Glimmeroberfläche adsorbierten Latexpartikel hat ein Anquellen der *brush*-Schicht zur Folge und führt daher zu zahlreichen Kontakten der Lösungsmittelmoleküle zu den Fluorophoren. Die - im Vergleich zur Umgebung - höhere Fluoreszenzintensität, die von den Partikeln ausgeht, lässt sich zudem durch eine höhere Dichte an Fluorophoren innerhalb der *brushes* erklären.

#### IV.8 Lokalisierung der Proteine in der *brush*-Schicht mittels SAXS

Die bisherigen Adsorptionsexperimente zeigten, dass *brushes* größere Mengen an Protein aufnehmen können, wobei der Adsorptionsgrad gezielt über äußere Parameter eingestellt

werden kann. Jedoch konnte bisher keine Aussage darüber getroffen werden, wo die adsorbierten Proteine innerhalb der Polyelektrolytschale lokalisiert sind. Einen Aufschluss hierüber sollte die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) geben.

Diese Untersuchungen wurden insbesondere an RNase A-beladenen *quenched brushes* durchgeführt. Parallel dazu wurden weitere Experimente an BSA auf *annealed brushes* durchgeführt. Wie schon bei den Sekundärstrukturuntersuchungen (s. Kap. IV.6) sollte RNase A wiederum als Modellprotein für konformationsstabile globuläre Proteine fungieren, während BSA flexible Proteinmoleküle repräsentieren sollte (Baron *et al.* 1999, Servagent-Noinville *et al.* 2000). Somit sollte ebenfalls festzustellen sein, ob die Flexibilität der nativen Proteinkonformation den Ort der Adsorption innerhalb des *brush* beeinflusst. Zudem sollte geklärt werden, inwiefern die Protein-beladenen Partikel durch ein radial-symmetrisches Modell beschrieben werden können. Zur Überprüfung der Eignung der Methode sollte der Adsorptionsgrad bestimmt und mit den spektroskopisch ermittelten Ergebnissen verglichen werden.

### IV.8.1 RNase A in Lösung

Vor Beginn der eigentlichen Streuexperimente an Protein-beladenen *brushes* wurde zunächst das freie Protein in der Pufferlösung untersucht, um den Streubeitrag des Proteins an den Protein-beladenen Latexpartikeln abschätzen zu können. Hierzu wurde jeweils eine Konzentrationsreihe von RNase A in 10 mM CHES-Puffer (*pH* 9,3) in einem Konzentrationsbereich von 0,3 g/l – 1,2 g/l erstellt. UV/VIS-spektroskopische Untersuchungen ergaben, dass in diesem Konzentrationsbereich eine Assoziation bzw. Agglomeration von Proteinmolekülen ausgeschlossen werden kann.

Die Streuintensitäten der gelösten Proteinmoleküle (s. Abb. IV.52) ließen sich mit Hilfe des Guinier-Gesetzes nach Gleichung 3-25 (s. Kap. III.2.2) beschreiben. Proteinkonzentrationen bis zu 0,3 g/l konnten quantitativ mit der SAXS untersucht werden. Aus der Fit-Anpassung wurde ein Gyrationradius der RNase A von 1,27 nm erhalten. Unter Annahme harter Kugeln ergibt sich aus der experimentell bestimmten Dichte des Proteins von  $1,28 \text{ g/cm}^3 \pm 0,03 \text{ g/cm}^3$  (s. VI.3.13) ein Radius von 1,23 nm.

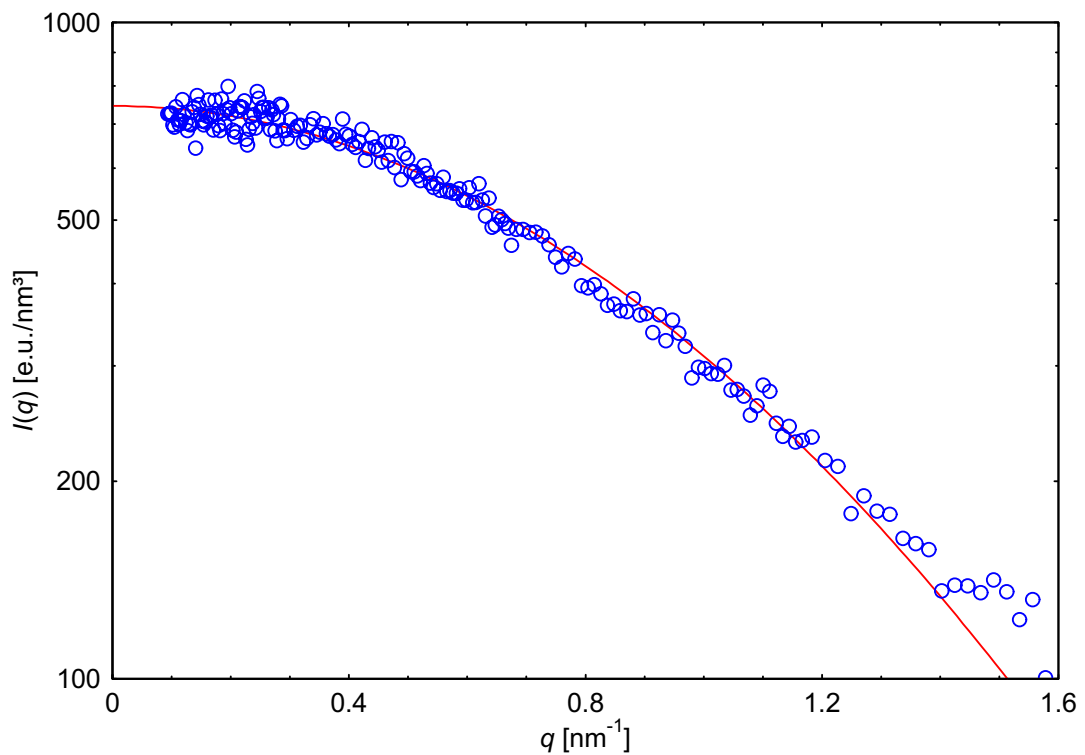
Über die Extrapolation der Streuintensitäten auf  $q = 0$  lässt sich zudem das Molekulargewicht der gelösten Proteinmoleküle erhalten. Hierzu muss Gleichung 3-27 (s. Kap. III.2.2) um den Formfaktor  $P(q)$  ergänzt werden:



$$I(0) = K c M_w P(q=0) \quad (4-2)$$

- $K$ : Kontrastfaktor  
 $c$ : Konzentration der Probe  
 $M_w$ : Molekulargewicht der untersuchten Spezies  
 $P(0)$ : Formfaktor bei Streuvektor Null

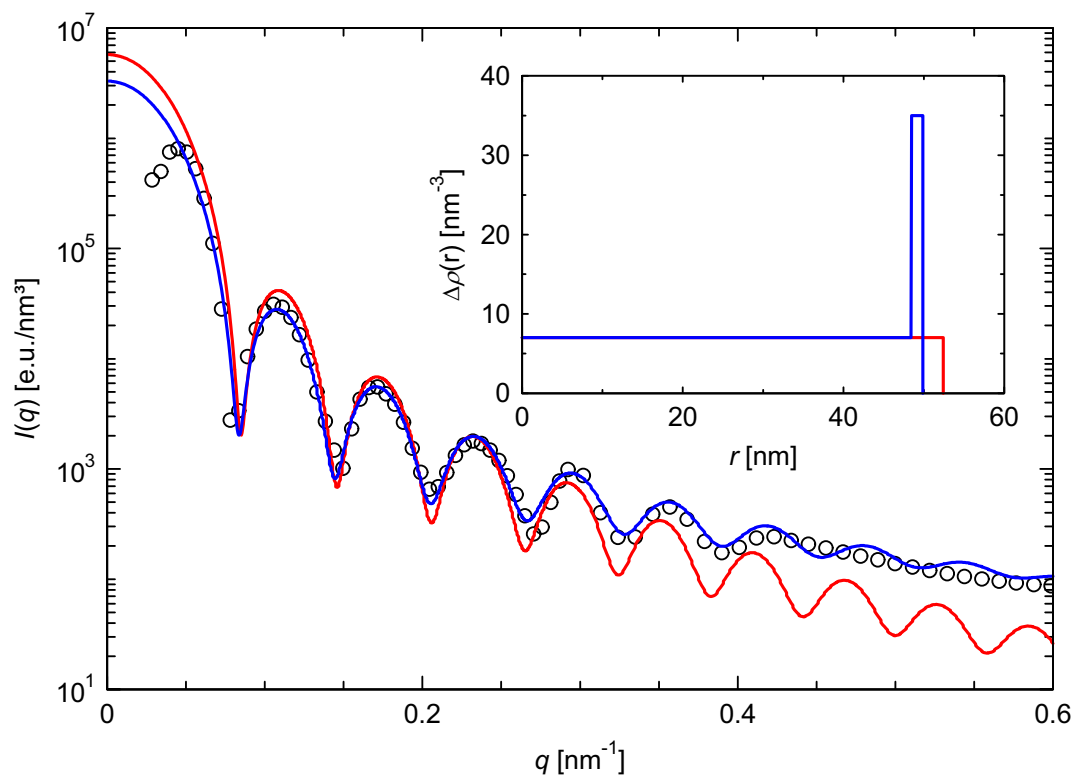
Wiederum zeigt sich eine ausgezeichnete Übereinstimmung des experimentellen Werts der Molmasse des Proteins von 13.700 g/mol mit dem aus der Aminosäuresequenz berechneten Wert von 13.683 g/mol (Chatani *et al.* 2001).



**Abb. IV.52:** Kleinwinkelstreucurve einer RNase A-Lösung (1,2 g/l): Die experimentellen Daten (blau) lassen sich mit einem Guinier-Fit (rote Linie) nach Gleichung 3-25 beschreiben.

IV.8.2 Analyse des Trägersystems

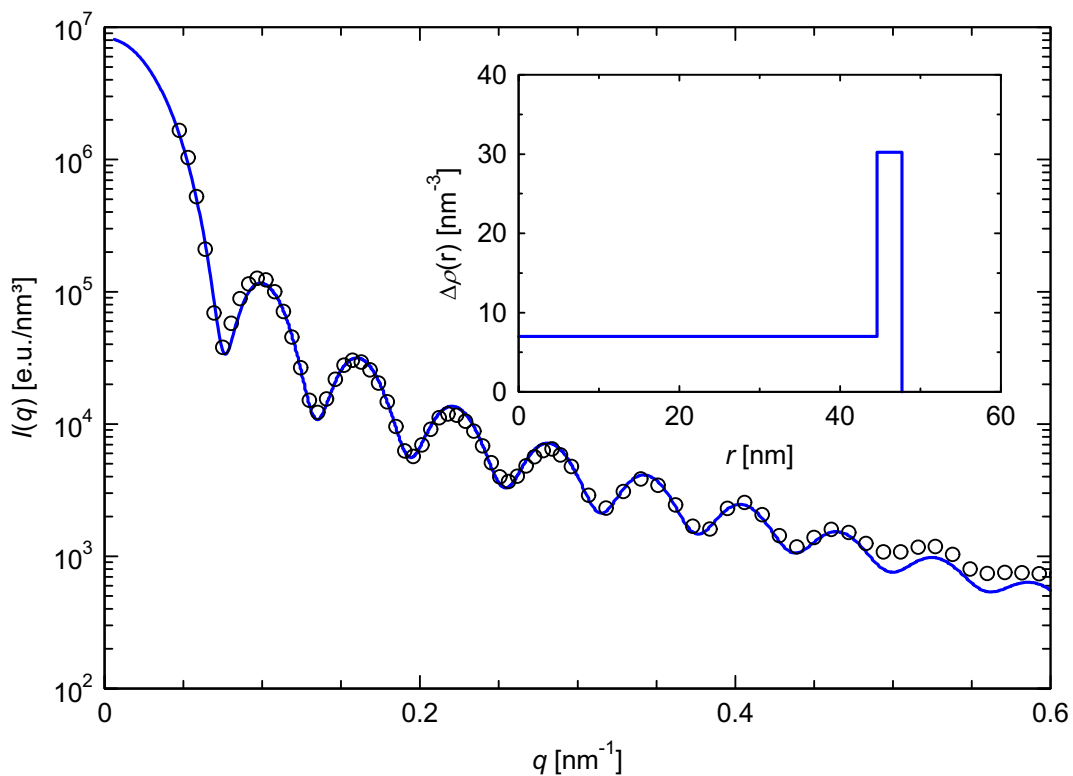
Zur vollständigen Charakterisierung der Morphologie des PS/PSS-Kern-Schale-Latex KpSS1 wurden Röntgenstreuungsmessungen an sämtlichen Synthesestufen (vgl. Abb. IV.1) vorgenommen. So wurde neben den Kern-Schale-Partikeln ebenfalls der PS-Kern K6 sowie der PS-co-HMEM-Kern Kp19 untersucht. Da die gereinigten Kernlatices nur über eine geringe elektrostatische Stabilisierung durch die Initiatorreste verfügen, war eine allmählich einsetzende Aggregation dieser Partikel zu beobachten. Daher wurden diese Suspensionen ungereinigt vermessen, d. h. in Anwesenheit der das System stabilisierenden Emulgatormoleküle.



**Abb. IV.53:** Kleinwinkelstreucurve des PS-Kernlatex K6: An die experimentellen Daten (Kreise) wurde ein Modell basierend auf einer homogenen Kugel (rote Linie) sowie einer Kugel mit einer dünnen elektronenreicheren Außenschale (blaue Linie) angepasst. Die zugehörigen radialen Verteilungen der Exzess-elektronendichte sind im Inset aufgeführt.

Abbildung IV.53 gibt die Röntgenstreucurve des PS-Kerns K6 wieder. Die Streukurve mit mehreren ausgeprägten Maxima und Minima ist typisch für sphärische Objekte enger

Teilchengrößenverteilung. Daher wurde versucht, das System in erster Näherung als homogene Kugeln zu beschreiben. Dieses Modell liefert nur bis zu Streuvektoren  $< 0,2 \text{ nm}^{-1}$  eine gute Beschreibung der experimentellen Daten. Da in diesem  $q$ -Bereich hauptsächlich die äußeren Dimensionen der Partikel erfasst werden, gibt dieses Modell recht gut die Größen der Latexpartikel wieder (s. Tab. IV.17). Jedoch wird die diffuse Oberfläche derartiger Latexpartikel, welche sich bei höheren  $q$ -Werten bemerkbar macht, nur unzureichend beschrieben (Dingenouts *et al.* 1994). Neben der Oberflächenrauigkeit befindet sich zudem, wie oben erwähnt, eine dünne Schicht von Stabilisatormolekülen um die PS-Partikel. Die SDS-Moleküle führen zu einer Erhöhung des SAXS-Kontrasts der Oberfläche im Vergleich zum elektronenarmen Polystyrol. Das Modell der homogenen Kugel wurde daher um eine dünne elektronenreichere Außenschale ergänzt. Wie Abbildung IV.54 zu entnehmen ist, erlaubt dieses modifizierte Modell eine Beschreibung des Systems über einen weiten  $q$ -Bereich.



**Abb. IV.54:** Kleinwinkelstreuurve des PS-co-HMEM-Kernlatex Kp19: Die Anpassung der experimentellen Daten (Kreise) erfolgte über ein Modell basierend auf einer homogenen Kugel mit einer elektronenreichen Außenschale (blaue Linie) angepasst. Das zugehörige radiale Profil der Exzesselektronendichte ist als Inset aufgeführt.

In Tabelle IV.17 sind die aus den Fit-Anpassungen erhaltenen Teilchenradien aufgelistet. Die aus der Modellierung der Elektronendichteprofile erhaltenen Radien liegen etwas unter dem Wert für den hydrodynamischen Teilchenradius der dynamischen Lichtstreuung von 56 nm. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die dynamische Lichtstreuung die diffuse Oberfläche der Latexpartikel stärker berücksichtigt.

**Tab. IV.17:** Aus der Modellierung der Elektronendichteprofile erhaltene Teilchengrößen des PS-Latex K6 sowie des PS-co-HMEM-Latex Kp19. Zum Vergleich sind zusätzlich die mittels DLS bestimmten hydrodynamischen Radien  $R_H$  der Partikel angegeben.

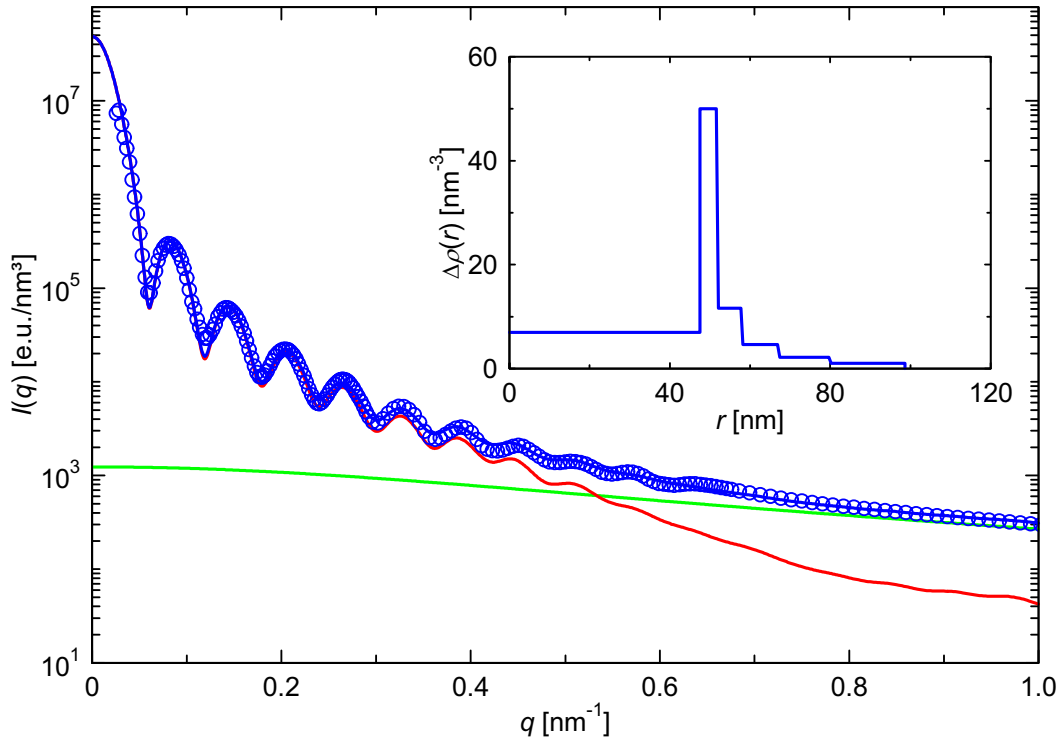
System (Modell)	Kugelradius [nm]	Schalendicke [nm]	$R_H$ (DLS) [nm]
K6 (Kugel)	53	-	56
K6 (Kugel + Schale)	49	1	56
Kp19 (Kugel + Schale)	45	3	56

Zur Beschreibung des Systems nach Aufpolymerisation der Photoinitiatorschicht (Latex Kp19) konnte ebenfalls auf ein Modell zurückgegriffen werden, welches auf einer homogenen Kugel mit einer Außenschale höherer Elektronendichte basiert (s. Abb. IV.54). Die äußere Schale ist erwartungsgemäß etwas breiter und elektronenreicher als im Falle des Systems K6 (vgl. Tab. IV.17). Die in Kapitel IV.1.2 beschriebene Aufpolymerisation des Photoinitiators unter *starved conditions* hat somit zur Ausbildung einer geschlossenen Copolymerschicht aus den Monomerbausteinen HMEM und Styrol auf der PS-Saat geführt. Der Photoinitiator ist zudem nicht ins Innere der Saat hineindiffundiert. Dies kann auf die oberflächenaktiven Eigenschaften des HMEM-Moleküls im Vergleich zum wesentlich hydrophoberen Styrol zurückgeführt werden. Somit wurde letztlich eine definierte Photoinitiatorschicht auf der Partikeloberfläche von rund 3 nm Dicke erhalten. Dies ist wiederum die Grundvoraussetzung zum gezielten Aufbau dicht gepackter Polyelektrolytbürsten auf den Latexpartikeln.

Die weiteren Röntgenstreuexperimente erfolgten am *quenched brush* KpSS1, welcher nach Aufpolymerisation linearer Polystyrolsulfonatketten aus dem PS-co-HMEM-Kern Kp19 hervorging. Zu diesen Experimenten wurden die *brush*-Partikel auf 10 mM CHES-Puffer ( $pH$  9,3) mittels Ultrafiltration (s. VI.1.6) eingestellt. Hierdurch sollte ein Vergleich zu den Protein-beladenen Systemen ermöglicht werden, welche im selben Puffermedium suspendiert vorlagen.

Innerhalb der *brush*-Schicht nimmt die Dichte der Polyelektrolytketten und damit auch die Exzesselektronendichte radial nach außen hin ab. Daher war die Streukurve des *quenched brush* KpSS1 (s. Abb. IV.55) nicht mit einem radialsymmetrischen Kern-Schale-Modell zu beschreiben, welches auf einer konstanten Elektronendichte innerhalb der äußeren Schale

beruht. Daher wurde versucht, die *brush*-Schicht in Form von fünf Einzelschalen jeweils konstanter Elektronendichte zu modellieren. Die Dicke der Einzelschalen konnte dabei um einen konstanten Streckfaktor nach außen hin zunehmen bzw. abnehmen. Der PS-Kern wurde wiederum als homogene Kugel angenommen.



**Abb. IV.55:** Streuintensitäten des PS/PSS-Kern-Schale-Latex KpSS1 (blaue Kreise) verglichen mit der Modellanpassung (blaue Linie). Letztere setzt sich aus den Beiträgen des radialsymmetrischen Modells (rote Linie) sowie des Ornstein-Zernicke-Terms (grüne Linie) zusammen. Das zugehörige radiale Profil der Exzesselektronendichte ist als Inset aufgeführt.

Aus Abbildung IV.55 geht hervor, dass dieses Modell eine gute Beschreibung des Systems für  $q < 0,3$  liefert. Im Bereich größerer Streuvektoren ist jedoch eine zunehmende Abweichung festzustellen. Dieser Effekt wurde bereits bei Latices mit einer Mikrogelschale beobachtet und konnte dort durch Netzwerkfluktuationen erklärt werden (Seelenmeyer *et al.* 2001). Im vorliegenden Fall kann die Polyelektrolytschale als konzentrierte Polymerlösung betrachtet werden, welche lokalen Fluktuationen in der Polymerdichte unterworfen ist. Die Abweichung vom oben skizzierten radialsymmetrischen Modell kann in Analogie zu früheren Untersuchungen durch einen Ornstein-Zernicke-Term beschrieben werden (Seelenmeyer *et al.* 2001). Abbildung IV.55 zeigt, dass die Kombination des radialsymmetrischen Mehrschalenmodells mit dem

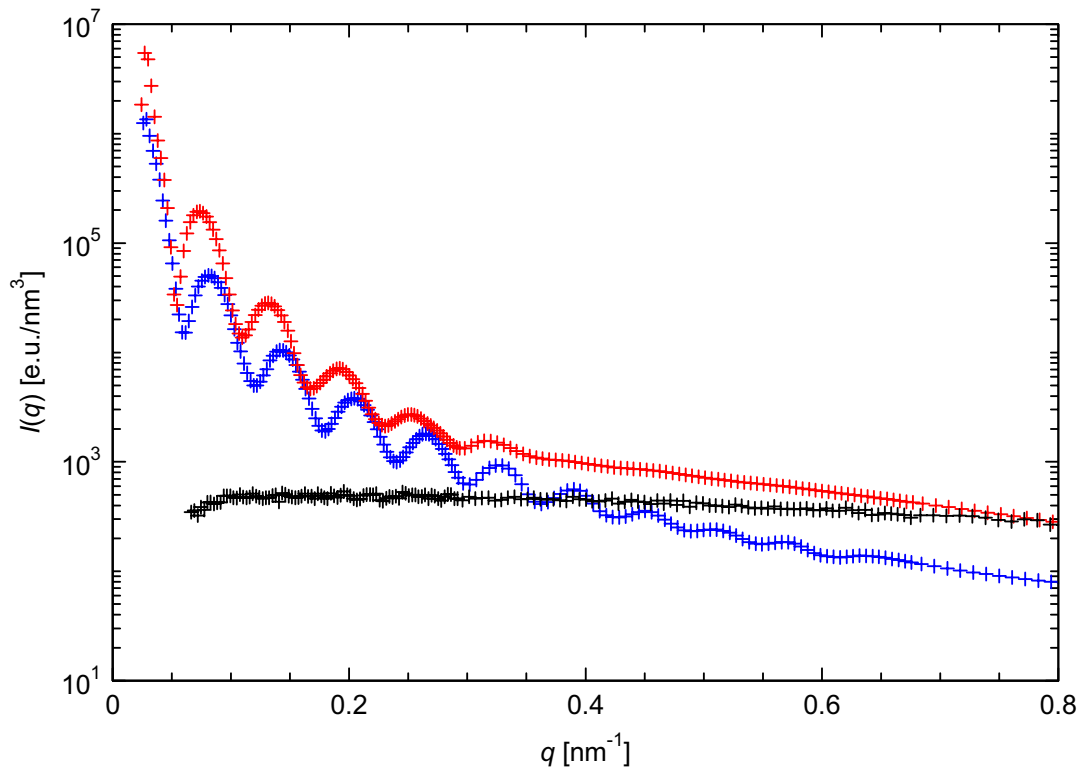
Ornstein-Zernicke-Term ausgezeichnet die Streukurve über einen weiten  $q$ -Bereich wiedergibt. Aus dem zugehörigen Profil der Exzesselektronendichte ergibt sich ein Kernradius von 48 nm. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Untersuchungen an den Kernlatices überein (s. Tab. IV.17). Das Elektronendichteprofil weist zudem daraufhin, dass wie erwartet die Elektronendichte innerhalb der elektronenreichen Polyelektrolytschicht radial nach außen hin abnimmt. Da die Dicke der Einzelschalen nach außen um einen Streckfaktor von 1,43 zunimmt, scheint die Exzesselektronendichte innerhalb der *brush*-Schicht exponentiell abzufallen. Dies deckt sich mit früheren Röntgenstreuuntersuchungen an *brushes* (de Robillard *et al.* 2000). Die *brush*-Dicke ergibt sich aus dem Elektronendichteprofil zu 51 nm. Dieser Wert liegt unter der mit der dynamischen Lichtstreuung bestimmten hydrodynamischen *brush*-Dicke von 63 nm. Hierbei gilt zu berücksichtigen, dass beide Methoden unterschiedlich sensitiv gegenüber Teilchenabmessungen sind. Der hydrodynamische Radius wird durch einzelne Ketten bestimmt, welche aus der Schale herausragen. In der SAXS werden diese Ketten aufgrund des geringen Anteils nicht detektiert (Seelenmeyer *et al.* 2001), weshalb eine kleinere *brush*-Dicke bei SAXS-Messungen resultiert.

### IV.8.3 *Quenched brush* mit adsorbierter RNase A

Der PS/PSS-Kern-Schale-Latex KpSS1 wurde mit verschiedenen Mengen an RNase A in 10 mM CHES-Puffer inkubiert. Nach Abtrennung des freien Proteins wurden Röntgenstreuexperimente an den Proben durchgeführt. Abbildung IV.56 zeigt beispielhaft eine Streukurve dieser Messreihe. Vergleicht man die Streukurven der beladenen *brushes* mit denen der unbeladenen *brushes*, stellt man eine deutliche Intensitätszunahme durch das Protein fest (s. Abb. IV.56). Dennoch weisen die erhaltenen Streukurven auch nach der Adsorption des Proteins weiterhin mehrere ausgeprägte Maxima und Minima auf. Dies deutet auf eine direkte Korrelation der Proteine mit den *brush*-Partikel hin und ist somit eine Bestätigung dafür, dass die Proteine auf den Latexpartikeln gebunden vorliegen. Ein weiteres Indiz hierfür ist, dass sich die Streukurve der Protein-beladenen *brushes* im Bereich von  $q$ -Werten unter 0,2 nicht additiv aus den entsprechenden Einzelbeiträgen von *brush* und Protein zusammensetzen lässt. Insbesondere der Verlauf der Streuintensitäten bei höheren  $q$ -Werten zeigt zudem, dass allenfalls minimale Anteile des Proteins frei in Lösung vorliegen können.

Die Maxima der Streukurven sind zudem nach der Adsorption des Proteins zu kleineren  $q$ -Werten verschoben. Dies könnte zum einen auf einen Anstieg der Teilchengröße zurückzuführen sein. Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung wiesen jedoch auf keinerlei

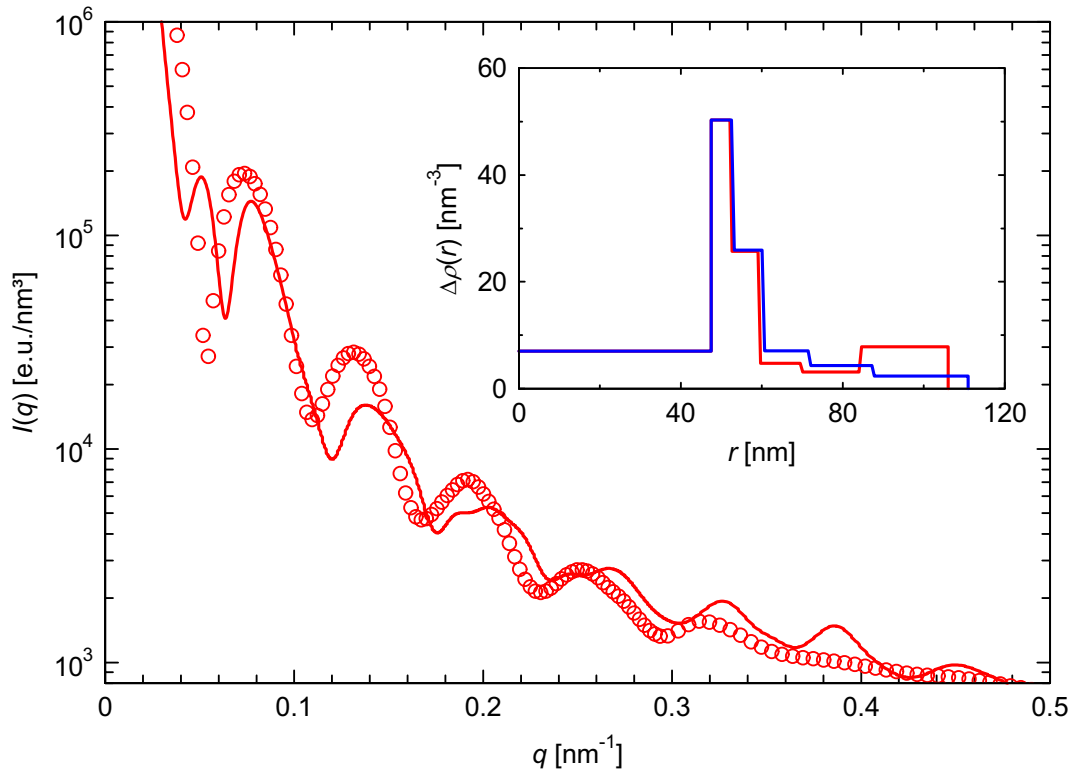
Zunahme des hydrodynamischen Teilchendurchmessers infolge der Proteinbeladung hin. Eine Erklärung dieses vermeintlichen Widerspruchs scheint darin zu liegen, dass wie oben besprochen die mit der SAXS detektierbare Schalendicke kleiner ist als die hydrodynamische Schalendicke. Werden nun Proteine in der Peripherie der *brushes* gebunden, resultiert lokal ein starker Anstieg der Elektronendichte in Bereichen, welche zuvor einen zu geringen SAXS-Kontrast aufwiesen. Dies würde somit als Zunahme des Teilchenradius wahrgenommen werden.



**Abb. IV.56:** Streuintensitäten des PS/PSS-Kern-Schale-Latex KpSS1 vor (blaue Kreuze) und nach Adsorption von 250 mg RNase A pro Gramm KpSS1-Partikel (rote Kreuze) bei gleichem Latexpartikelgehalt. Beide Streukurven weisen mehrere ausgeprägte Maxima und Minima auf. Die schwarzen Kreuze geben die Streuintensitäten einer entsprechenden Menge an freiem Protein wieder.

Als Ausgangspunkt der theoretischen Modellierung der Streukurve der Protein-beladenen *brushes* wurde vom Exzesselektronenprofil der reinen *brushes* ausgegangen (s. Inset in Abb. IV.57). Das adsorbierte Protein wurde durch Erhöhung der Elektronendichte in den einzelnen Schalen der Polyelektrolytschale berücksichtigt. Hierzu wurden zunächst zwei Grenzfälle in Betracht gezogen. Zum einen könnte das Protein vollständig in den äußeren Regionen des *brushes* gebunden sein. Daher wurde bei der Fit-Anpassung an die Streu-

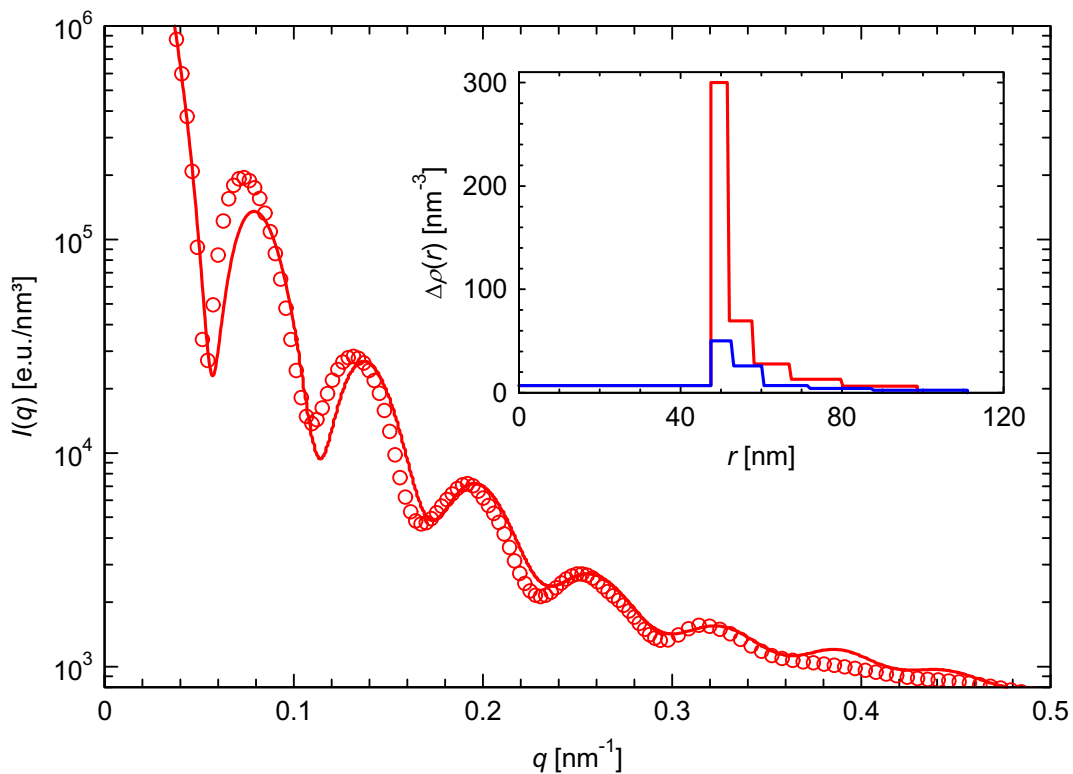
kurven im wesentlichen nur eine Erhöhung der Elektronendichte der äußeren Schale zugelassen. Wie Abbildung IV.57 zeigt, ist es mit einer derartigen Annahme unmöglich, die Positionen der Maxima der Streukurven korrekt wiederzugeben. Damit ist eine überwiegende Anbindung des Proteins an die äußeren Bereiche der *brushes* auszuschließen.



**Abb. IV.57:** Streukurve des PS/PSS-Kern-Schale-Latex KpSS1 nach Adsorption von 250 mg RNase A pro Gramm KpSS1-Partikel (rote Kreise): Die Modellanpassung (rote Linie) an die Streukurve erfolgte unter der Annahme, dass das adsorbierte Protein bevorzugt in den äußeren Regionen der *brushes* gebunden vorliegt. Die zugehörige radiale Exzesselektronendichteverteilung (rot) sowie die des reinen *brush* (blau) sind im Inset aufgeführt.

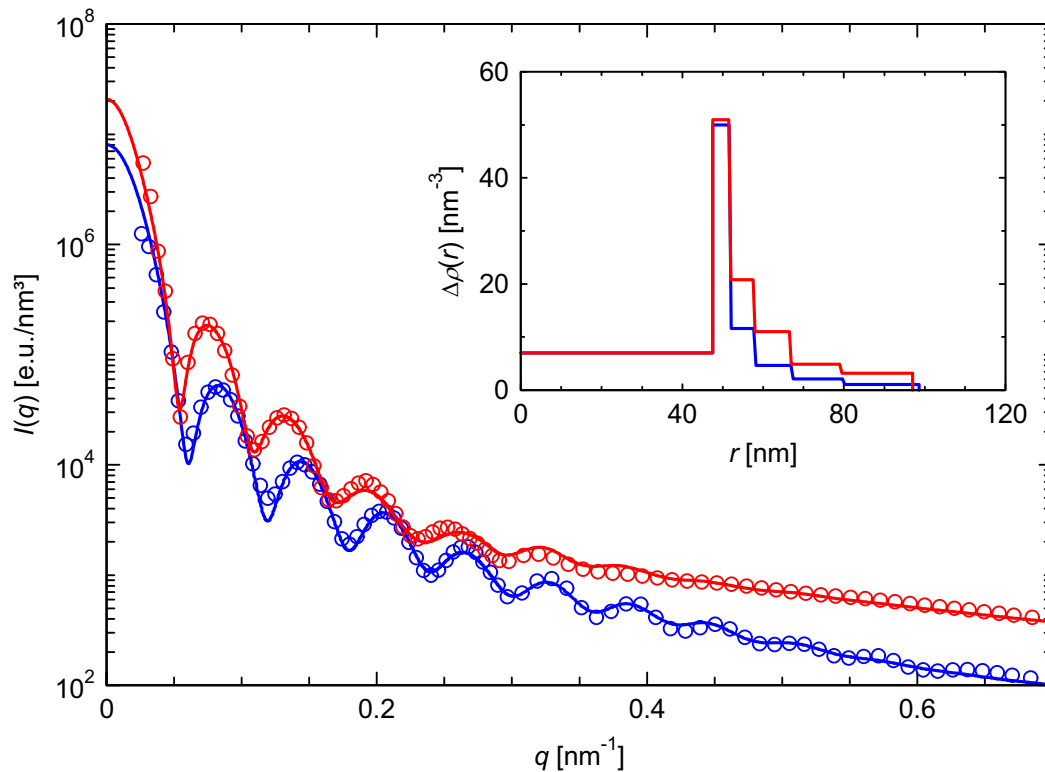
Der zweite Grenzfall sieht den konträren Fall vor, dass das Protein nahezu komplett in den inneren Schichten des *brush* gebunden vorliegt. Die ausschließliche Erhöhung der Elektronendichte der innersten Schale lieferte keinerlei verwertbare Ergebnisse. Selbst als eine gleichzeitige Zunahme der Elektronendichte der mittleren Schalen zugelassen wurde, konnte nicht einmal die Grobstruktur des Systems beschrieben werden (s. Abb. IV.58).





**Abb. IV.58:** Streukurve des PS/PSS-Kern-Schale-Latex KpSS1 nach Adsorption von 250 mg RNase A pro Gramm KpSS1-Partikel (rote Kreise): Die Modellanpassung (rote Linie) an die Streukurve erfolgte unter der Annahme, dass das adsorbierte Protein bevorzugt in den inneren Regionen der *brushes* gebunden wird. Im Inset ist die zugehörige radiale Exzesselektronendichteverteilung (rot) sowie die des reinen *brush* (blau) aufgeführt.

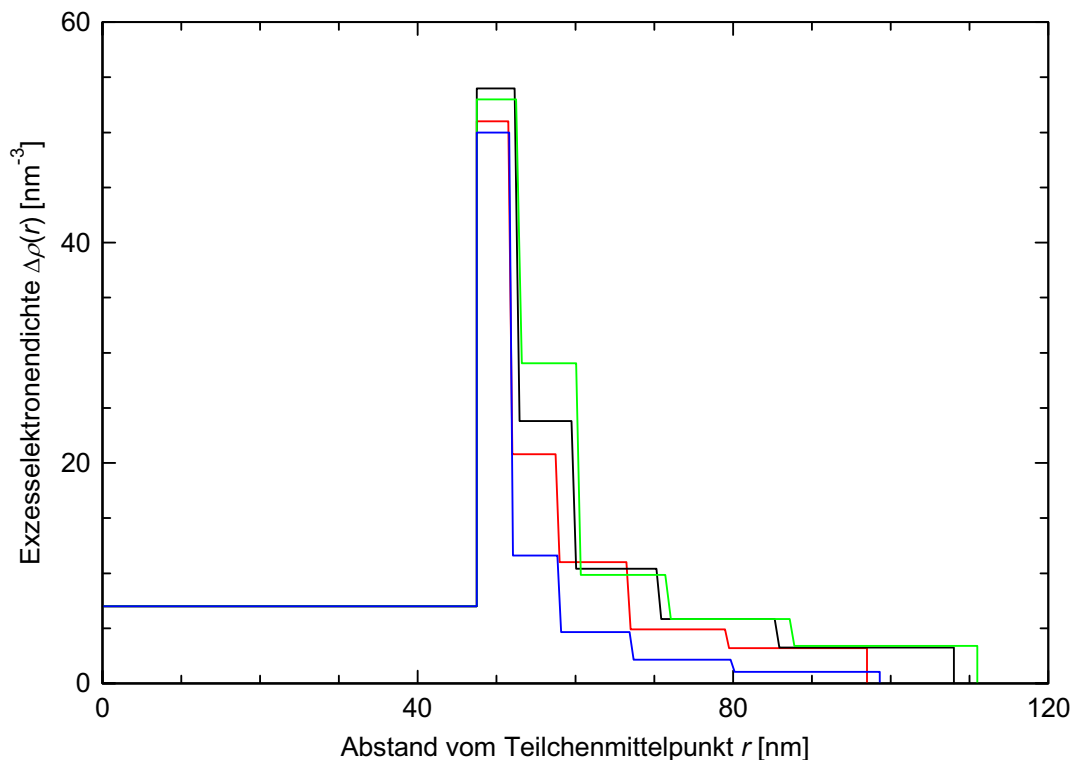
Letztlich erweisen sich beide Grenzfälle als unzutreffend. Somit drängt sich die Vermutung auf, dass die adsorbierten Proteine über den kompletten *brush* hinweg verteilt sind. Daher wurde im folgenden eine Erhöhung der Elektronendichte in allen Schalen des Modells vorgesehen. Hiernach ergab sich eine ausgezeichnete Beschreibung der Streukurven (s. Abb. IV.59). Die auf das adsorbierte Protein zurückzuführende Zunahme der Elektronendichte entspricht zudem der Elektronendichte der vergleichbaren Menge an freiem Protein. Damit konnte das Modell zudem quantitativ bestätigt werden. Wie dem radialen Profil der Exzesselektronendichte in Abbildung IV.59 zu entnehmen ist, wird das Protein überwiegend in den mittleren und äußeren Bereichen der *brushes* gebunden. In der innersten Schale befinden sich hingegen nur wenige Proteinmoleküle. Ein Vordringen der Proteinmoleküle bis an die Oberfläche des Polystyrol-Kerns scheint infolge der hohen Packungsdichte der Polyelektrolytketten an den Kern einer sterischen Hinderung zu unterliegen



**Abb. IV.59:** Streukurve des PS/PSS-Kern-Schale-Latex KpSS1 vor (blaue Kreise) und nach Adsorption von 250 mg RNase A pro Gramm KpSS1-Partikel (rote Kreise): Die theoretische Beschreibung der Streukurven (durchgezogene Linien) erfolgte über eine freie Anpassung der Elektronendichten in allen fünf fiktiven Schalen des *brush*. Im Inset sind die zugehörigen radialen Exzesselektronendichteverteilungen aufgeführt.

Abbildung IV.60 gibt die Profile der radialen Exzesselektronendichte des Systems KpSS1 / RNase A in Abhängigkeit der adsorbierten Proteinmenge wieder. Die auf das adsorbierte Protein zurückzuführende Zunahme der Exzesselektronendichte skaliert im Rahmen des experimentellen Fehlers mit dem spektroskopisch bestimmten Adsorptionsgrad. Bei Erhöhung des Adsorptionsgrads werden die Proteine analog zu den zuvor adsorbierten Proteine auf sämtliche Bereiche des *brush* verteilt. Hiermit geht eine zunehmende Verbreiterung des Elektronendichteprofiles der Protein-besetzten Schale einher. Somit scheinen vermeintlich Bereiche des *brush* besetzt zu werden, in denen mittels SAXS keine Polyelektrolytketten detektiert werden. Dies erklärt wiederum die oben diskutierte Verschiebung der Maxima der Streukurven zu kleineren  $q$ -Werten mit steigendem Adsorptionsgrad. Der aus der dynamischen Lichtstreuung erhaltene hydrodynamische Teilchenradius des Systems beträgt 119 nm und ist wie bereits erwähnt unabhängig vom Adsorptionsgrad. Mit steigendem Adsorptionsgrad reicht das Elektronendichteprofil an diesen Wert heran (s. Abb. IV.60). Somit scheinen bei hoher äußerer Proteinkonzentration ebenfalls Bereiche in der Peripherie des *brush* besetzt zu werden, in welchen die Proteine

nur mit einzelnen Polyelektrolytketten in Wechselwirkung treten können. Diese Proteine sollten daher schwächer gebunden sein als Proteine in den inneren Schalen des *brush*. Letzteres erklärt den Verlauf der zugehörigen Adsorptionsisothermen (s. Abb. IV.26), welche bei hoher freier Proteinkonzentration einen erneuten Anstieg des Adsorptionsgrades zeigen. Zum anderen kommt darin auch zum Ausdruck, weshalb das in Kapitel III.1.6 aufgestellte Adsorptionsmodell den Verlauf der Adsorptionsisothermen beschreibt. Dieses sieht die Population des *brush* durch zwei unterschiedlich stark gebundene Proteinfractionen vor.

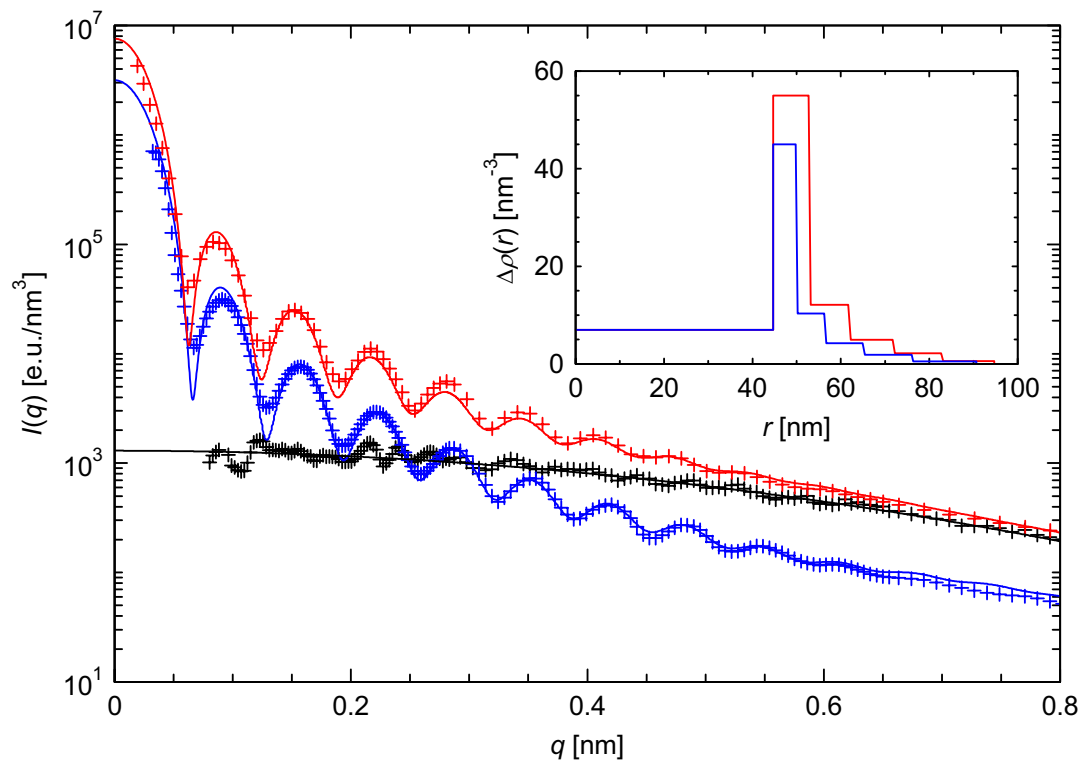


**Abb. IV.60:** Radiale Verteilungen der Exzesselektronendichte des Systems KpSS1/RNase A (blau: 0 mg, rot: 250 mg, schwarz: 408 mg, grün: 500 mg Protein pro Gramm Latexpartikel). Der Zugewinn an Elektronendichte durch das adsorbierte Protein skaliert näherungsweise mit dem spektroskopisch bestimmten Adsorptionsgrad.

#### IV.8.4 *Annealed brush* mit adsorbiertem BSA

Die obigen Röntgenstreuuntersuchungen basierten auf der Wechselwirkung eines *quenched brush*-Systems mit einem konformationsstabilen globulären Protein. Um festzu-

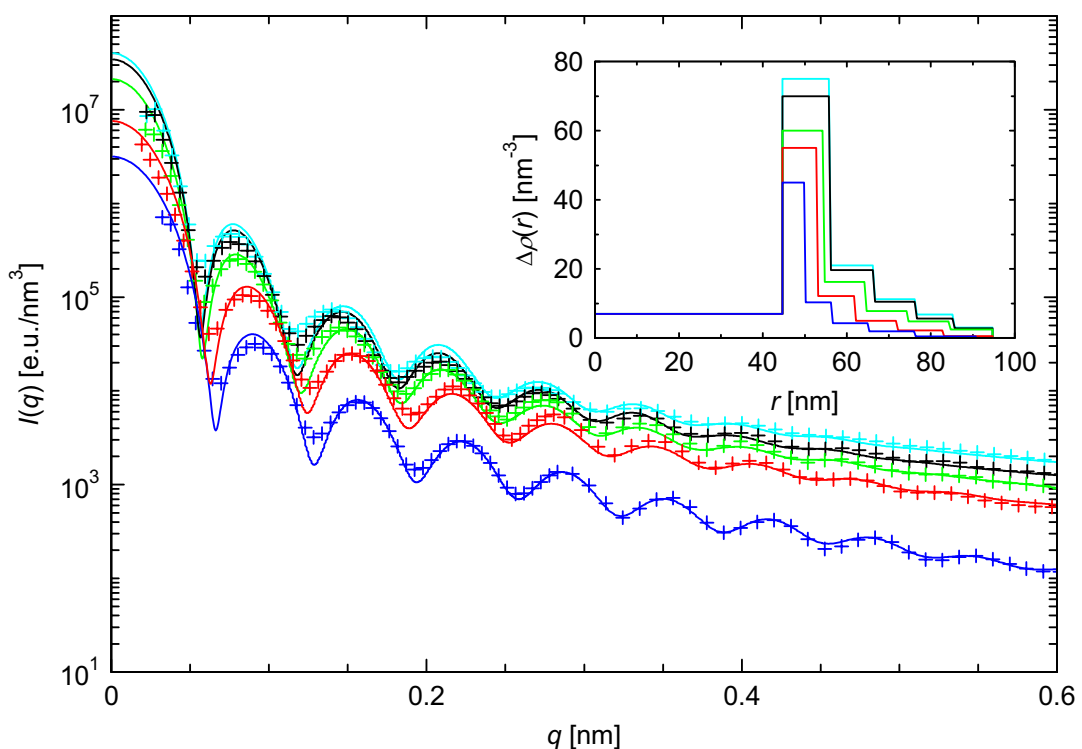
stellen, inwiefern die dabei gewonnenen Ergebnisse auf *brushes* anderer Morphologie sowie andere Proteinmoleküle übertragen werden können, waren zusätzliche Experimente erforderlich. An dieser Stelle bot sich wiederum die Kombination *annealed brush* / BSA aufgrund der flexiblen Tertiärstruktur des Proteins (s. IV.6.4). Da diese Experimente, welche wiederum in 10 mM MES-Puffer ( $pH$  6,1) durchgeführt wurden, weitestgehend analog zu den oben vorgestellten Studien verlief, soll die folgende Betrachtung auf die zentralen Ergebnisse beschränkt werden.



**Abb. IV.61:** Streuintensitäten des PS/PAA-Kern-Schale-Latex KpS14 vor (blaue Kreuze) und nach Adsorption von 296 mg BSA pro Gramm KpS14-Partikel (rote Kreuze) bei einem Latexpartikelgehalt von einem Vol.-%. Im Inset sind die zu den Modellanpassungen (durchgezogene Linien) zugehörigen radialen Exzesselektronendichteverteilungen aufgeführt. Der Verlauf der Streuintensitäten einer entsprechenden Menge an freiem BSA (schwarze Kreuze) folgt der Guinier-Gleichung (s. Glg. 3-25, schwarze Linie).

Abbildung IV.61 zeigt die Streukurven des *annealed brush* KpS14 vor und nach der Adsorption von 314 mg BSA pro Gramm Latexpartikel. Die Streukurven des *annealed brush* ließen sich analog zu den *quenched brushes* durch die Kombination eines radial-symmetrischen Stufenmodells mit einem Ornstein-Zernicke-Term beschreiben. Des weiteren konnten die Streuintensitäten von BSA in Pufferlösung wie im Falle von RNase A nach der Guinier-Näherung (s. Kap. III.2.2, Glg. 3-25) bis zu Streuvektoren von

0,8 über eine Gaußkurve angefitzt werden. Vergleicht man die Streukurve der Proteinbeladenen *brush*-Partikel in Abbildung IV.61 mit der des freien Proteins, so ist eine Überlappung der beiden Kurven oberhalb eines Streuvektors von 0,6 festzustellen. Somit zeigen das freie und das adsorbierte Protein bei gleicher Konzentration dieselben Absolutintensitäten. Dies legt die Vermutung nahe, dass das adsorbierte Protein keine wesentlichen strukturellen Änderungen bei der Adsorption erfährt. Die Sekundärstrukturanalysen in Abschnitt IV.6.1.2 bestätigten, dass das adsorbierte Protein seine native Sekundärstruktur behält. Hingegen wurden strukturelle Veränderungen in der Tertiärstruktur des Proteins festgestellt (s. Kap. IV.6.4).



**Abb. IV.63:** Streukurven des *annealed brush* KpS14 in Abhängigkeit der adsorbierten Proteinmenge samt der zugehörigen radialen Profile der Exzesselektronendichte (blau: vor Adsorption, rot: 296, grün: 577, schwarz: 829, hellblau: 1116 jeweils mg BSA pro Gramm KpS14-Partikel).

Die Modellierung des radialen Profils der Exzesselektronendichte des *annealed brush* mit adsorbiertem BSA erfolgte analog zur Vorgehensweise beim System RNase A / *quenched brush*. Wiederum wurde zunächst untersucht, ob eine Beschreibung der Röntgenstreuung über ein Elektronenprofil möglich ist, welches entweder die inneren oder die äußeren Bereiche des *brush* als überwiegenden Aufenthaltsort der adsorbierten Proteine vorsieht. Beide Annahmen führten zu keiner geeigneten Beschreibung des Systems. Abhilfe schaffte

erst die gleichzeitige Erhöhung der Elektronendichte in allen fünf Schalen des Modells (s. Inset in Abb. IV.62) in Kombination mit einer radialen Verbreiterung der einzelnen Schalen. Die zusätzliche radiale Verbreiterung um einen frei skalierbaren Streckfaktor ist wiederum notwendig, um die Positionen der Maxima der Streukurven korrekt wiederzugeben. Letztere werden mit zunehmender Proteinbeladung zu kleineren Streuvektoren verschoben (s. Abb. IV.62). Die Gesamtverbreiterung des Elektronendichteprofiles liegt wie im Falle des Systems RNase A / *quenched brush* innerhalb des hydrodynamischen Radius von 104 nm.

Abbildung IV.62 enthält die Streukurven vier zur Adsorptionsisothermen des Systems KpS14 (s. Abb. IV.17) gehörenden Proben. Wie den zugehörigen Elektronendichteprofilen zu entnehmen ist, werden Proteinmoleküle in allen Bereichen der Polyelektrolytschale adsorbiert. Die Hauptmenge des adsorbierten BSA liegt nach Bezug auf das Volumen der einzelnen Kugelschalen des Fünfstufenmodells in den Schalen 2 – 4 vor. Über den Zugewinn an Exzesselektronen im Vergleich zu den reinen *brush*-Partikeln lässt sich die Menge an adsorbiertem Protein berechnen. Im Vergleich zu den spektroskopisch ermittelten Werten des Adsorptionsgrads sind die mittels SAXS erhaltenen Werte systematisch größer (s. Tab. IV.18). Die Unterschiede liegen allerdings im Rahmen der experimentellen Unsicherheiten. Damit liefert die SAXS neben dem Ort der adsorbierten Proteinmoleküle innerhalb der *brush*-Schicht ebenfalls eine quantitative Beschreibung der adsorbierten Proteinmenge.

**Tab. IV.18:** Adsorptionsgrad von BSA auf dem *annealed brush* KpS14: Vergleich der über die Exzesselektronendichteprofile in Abbildung IV.62 erhaltenen Resultate zu den spektroskopisch ermittelten Werten (s. VI.2.2).

Adsorptionsgrad [mg BSA / g KpS14-Partikel]	
UV/VIS-Spektroskopie	SAXS
296	314
577	666
829	990
1116	1150

Vergleicht man die Elektronendichteprofile der Systeme RNase A / *quenched brush* bzw. BSA / *annealed brush* (Abb. IV.60 u. IV.62) miteinander, scheinen die BSA-Moleküle weiter in die *brushes* vorzudringen. Dies könnte auf die strukturell anpassungsfähige Konformation des BSA-Moleküls (Carter *et al.* 1994) zurückgeführt werden. Eine sterische Hinderung durch die dicht gepackten Polyelektrolytketten könnte daher besser umgangen werden als im Falle der globulären RNase A. Allerdings ist eine sichere Aussage hierzu

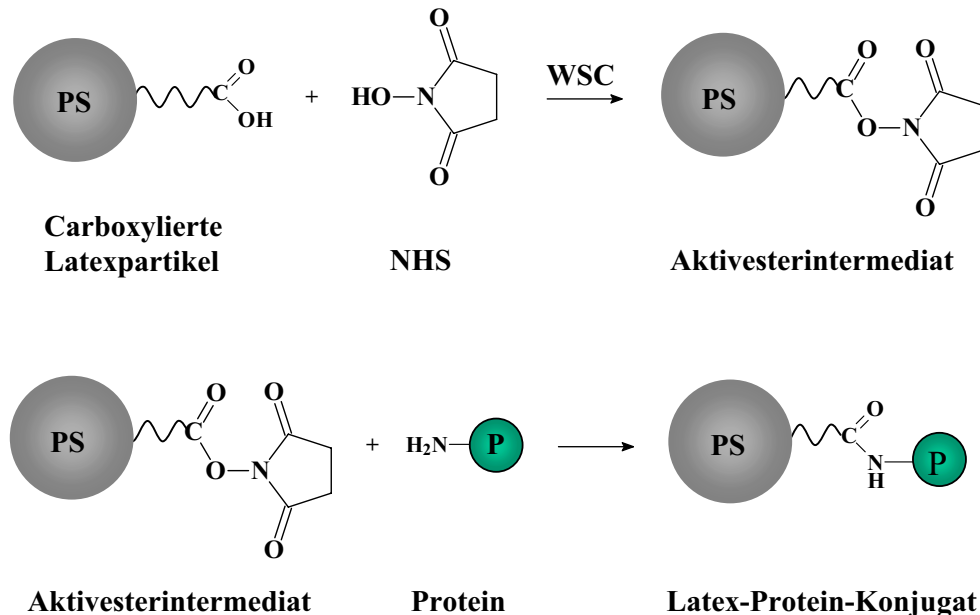
nicht möglich, da den Experimenten *brushes* unterschiedlicher Morphologie zugrunde liegen.

#### IV.9 Kovalente Anbindung von BSA an *annealed brushes*

Neben der adsorptiven Immobilisierung hat in den letzten Jahrzehnten auch die kovalente Anbindung von Proteinen auf oberflächenfunktionalisierten Latexpartikeln eine zentrale Bedeutung erfahren. Im Blickpunkt des Interesses standen neben Fragen der aktuellen Forschung insbesondere Anwendungen in der medizinischen Diagnostik (Kawaguchi *et al.* 2000). In der Regel ist die kovalente Immobilisierung mit dem Einsatz relativ „harter“ Kupplungsreagenzien verbunden, wodurch zum Teil ein drastischer Eingriff in die native Konformation des Biomoleküls erfolgt (Hartmeier *et al.* 1986, Kennedy *et al.* 1990). Damit geht ein mehr oder weniger großer Verlust der biologischen Funktion einher. Daher ist die kovalente Anbindung der adsorptiven Immobilisierung nur vorzuziehen, wenn dafür eine anwendungsspezifische Notwendigkeit besteht.

Im Falle der PS/PAA-Kern-Schale-Latices wäre eine kovalente Anbindung der Proteinmoleküle über die Carboxylgruppen der *brushes* denkbar. Daher sollte der Frage nachgegangen werden, ob die *brushes* neben der adsorptiven Immobilisierung ebenfalls als Trägersysteme kovalent angebundener Proteine genutzt werden können. Die Kupplungschemie der Carboxylgruppen mit Aminogruppen der Proteinmoleküle ist vonseiten der Peptidsynthese bestens untersucht und wurde bereits erfolgreich an kommerziellen carboxylierten Polystyrol-Latices eingesetzt (Bangs Laboratories 1999). Die einfachste Möglichkeit hierbei ist die direkte Umsetzung in Gegenwart eines wasserlöslichen Carbodiimids (WSC) bei *pH* 6 – 8 (Hager 1974). Als Einstufenreaktion weist die sogenannte Hager-Reaktion aber einen wesentlichen Nachteil auf: So kann das Carbodiimid neben der gewünschten Anbindung an die Latexpartikel ebenfalls zu einer intermolekularen Vernetzung der Proteinmoleküle führen. Als weitere Nebenreaktion kann zudem eine Verbrückung der Latexpartikel über die Proteinmoleküle auftreten (Dorman 1977). Um diese Probleme zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine zweistufige Synthesestrategie nach Dorman (Dorman 1977) gewählt (s. Abb. IV.63 bzw. Kap. VI.2.4): Die Carboxylgruppen wurden zunächst durch Reaktion mit 1-N-Hydroxysuccinimid (NHS, Fluka) in Gegenwart des wasserlöslichen Carbodiimids (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid EDC, Fluka) in eine Aktivesterstufe überführt. Vor der Zugabe des Proteins im zweiten Reaktionsschritt wurde nicht-umgesetztes Carbodiimid durch Ultrafiltration gegen frische Pufferlösung entfernt. Dieser Reinigungsschritt erfolgte unter dreimaligem Austausch des Dispersionsmediums. Beide Reaktionsschritte dauerten jeweils

24 h und wurden bei 4°C durchgeführt, um die Hydrolyserate des Carbodiimids und der Aktivesterspezies möglichst gering zu halten.



**Abb. IV.63:** Schematischer Ablauf der Dorman-Reaktion (Dorman 1977): Zunächst werden die Carboxylgruppen der Latexpartikel mit einer 1-N-Hydroxyverbindung (hier: N-Hydroxysuccinimid NHS) über ein wasserlösliches Carbodiimid (WSC) zu einem Aktivester umgesetzt (oben). Nach Entfernung von überschüssigem Carbodiimid wird im zweiten Reaktionsschritt (unten) das Protein zu den voraktivierten Latexpartikeln hinzugegeben.

Für den Aktivierungsschritt, die eigentliche Kupplungsreaktion und die abschließende Ultrafiltration zur Entfernung von nicht-gebundenem Protein waren geeignete Puffersysteme erforderlich. Wie bereits in Kapitel III.1.3 angesprochen, muss das Puffersystem, sowohl dem Protein, als auch den *brushes* Rechnung tragen. Dies gilt bei der adsorptiven wie auch bei der kovalenten Immobilisierung. Bei letzterer müssen jedoch zusätzlich die Anforderungen der Kupplungsreaktion beachtet werden. So können die Carboxylgruppen bei der Dorman-Reaktion nur in protonierter Form reagieren, die Aminogruppen hingegen nur in unprotonierter Form. Daher sollte ein  $pH < 7$  im Aktivierungsschritt bzw. ein  $pH > 7$  bei der Kupplungsreaktion zu einer hohen Reaktivität führen (Bangs Laboratories 1999). Azetat- und Phosphatpuffer reduzieren die Reaktivität des Carbodiimids (Bangs Laboratories 1999), sollten daher nicht bei der Aktivierung eingesetzt werden. Als Kompromiss wurde daher in beiden Reaktionsschritten 50 mM MES-Puffer ( $pH$  6,1) eingesetzt, welchem allenfalls noch entsprechende Mengen an NaCl zur Erhöhung der Ionenstärke zugesetzt wurden.



Nach den in Kapitel IV.4 beschriebenen Adsorptionsexperimenten adsorbiert BSA in großen Mengen auf den *brushes*. Daher ist neben kovalent angebundenem Protein ebenfalls ein hoher Anteil an adsorptiv gebundenen Proteinmolekülen zu erwarten. Um adsorptiv gebundenes Protein quantitativ zu entfernen, musste daher ein spezielles Waschdetergenz entwickelt werden. Im Falle industrieller carboxylierter Polystyrol-Latices wird für diese Zwecke eine 1 Gew.-%ige SDS-Lösung in 0,2 M TRIS-Puffer (*pH* 9) empfohlen (Seradyn company 1999). Anstelle von SDS wurde Triton X-100 (Fluka) als nichtionisches Detergenz eingesetzt, um eine elektrostatische Abstoßung zwischen Detergenz und *brush* zu vermeiden. Zur Überprüfung der Eignung der Waschdetergenz-Lösung wurden Kontrollexperimente an *annealed brushes* mit ausschließlich adsorptiv gebundenem BSA durchgeführt. Letztlich ließen sich auf diese Weise nur 40 - 70 % des adsorbierten Proteins nach intensiver Ultrafiltration gegen die Detergenzlösung (*pH* 9) freisetzen. Gemäß den Adsorptionsexperimenten in Kapitel IV.4 lässt sich der Adsorptionsgrad von BSA auf *annealed brushes* über eine Erhöhung der Ionenstärke gezielt herabsetzen. Zur Nutzung dieses Effekts wurde der Detergenzlösung 1 M NaCl zugesetzt. Die Kombination von Detergenz und hoher Ionenstärke bei gleichzeitiger *pH*-Erhöhung erlaubte nun eine quantitative Freisetzung des adsorbierten Proteins. Dies konnte in mehreren Kontrollexperimenten bestätigt werden. Nach Abschluss des Detergenzwaschgangs wurde die Detergenzlösung über eine weitere Ultrafiltration wiederum gegen 50 mM MES-Puffer (*pH* 6,1) ausgetauscht.

Zur Beurteilung der Ergebnisse der Dorman-Reaktion musste ein Zugang zur kovalent angebundenen Proteinmenge gefunden werden. Eine Bestimmung über die Eigenabsorption des gesamten bei der Reinigung abgetrennten Proteins schied hierbei aus, da eventuell vorhandene Reste der Kupplungsreagenzien den Nachweis verfälschen würden. Damit kam eine analoge Vorgehensweise wie bei den Adsorptionsexperimenten in Kapitel IV.4 nicht in Frage.

Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte zum einen spektroskopisch über einen kommerziell erhältlichen BCA-Assay (s. VI.2.5). Bei der direkten Bestimmung in Suspension wurden die Proben zuvor entsprechend verdünnt, um die Eigenabsorption der Latexpartikel möglichst gering zu halten. Letztere wurde über die Messung einer Probe der reinen Latexpartikel bei der Auswertung berücksichtigt.

Zudem wurde die Menge an kovalent gebundenem Protein aus dem Stickstoffgehalt der gefriergetrockneten Latexprouben ermittelt. Hierzu wurde die Stickstoff-haltige Pufferlösung zuvor in einer intensiven Ultrafiltration gegen entionisiertes Wasser ausgetauscht. Diese Methode zeichnete sich über eine hohe Genauigkeit aus, wie Kontrollexperimente zeigten (s. VI.2.5).

Bei ersten Anbindungsversuchen an Systemen höherer *brush*-Dicke konnte allenfalls eine geringe Anbindung von maximal 45 mg BSA pro Gramm *brush*-Partikel nachgewiesen werden. Teilweise erfolgte jedoch keine kovalente Proteinanbindung. Auch eine Erhöhung

der Ionenstärke oder der Wechsel des Puffersystems bei der Kupplungsreaktion (2. Stufe der Dorman-Reaktion) brachte keine Verbesserung.

Lediglich an kurzkettigen *brushes* konnte eine nennenswerte Menge an Protein kovalent angeknüpft werden. Die Analyse des Stickstoffgehalts ergab einen Belegungsgrad von 94 mg ( $\pm$  9 mg) BSA pro Gramm des *annealed brush* KpS18. Der BCA-Assay lieferte hierfür einen Wert von 140 mg ( $\pm$  40 mg). Der *brush* weist in der Pufferlösung eine hydrodynamische Dicke von lediglich 6 nm auf. Daher ist davon auszugehen, dass maximal eine Monoschichtbelegung durch das Protein mit Durchmesser 7 nm (Kulkarni *et al.* 1970) erfolgen kann. Eine Monoschichtbelegung entspräche einem Adsorptionsgrad von 150 mg BSA pro Gramm *brush*-Partikel. Die über den Stickstoffgehalt ermittelte Belegung entspräche einer Oberflächenbelegung von 62 %. Somit konnte eine relativ effektive kovalente Anbindung an BSA erzielt werden.

Die Dorman-Reaktion wurde für konventionelle carboxylierte Polystyrol-Latices entwickelt. Mit abnehmender Dicke der Polyelektrolytschale nähern sich die hier untersuchten PS/PAA-Kern-Schale-Latices diesen Systemen an. Daher scheint es nicht zu verwundern, wieso bei kurzkettigen Systemen eine erfolgreiche Anbindung möglich ist. Umgekehrt stellt sich vielmehr die Frage, warum keine Anbindung im Falle langkettiger Systeme erzielt werden konnte. Hierzu ist zunächst anzumerken, dass sowohl bei kurzkettigen, wie auch bei langkettigen Systemen die Versuche keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Ultrafiltration zur Entfernung des überschüssigen Carbodiimids sich als langwieriger Prozess von bis zu 10 Stunden erwies. Daher kommt es sicherlich zur Hydrolyse eines Großteils der Aktivesterspezies. Es musste somit ein anderer Weg beschritten werden, um das Carbodiimid abzutrennen. Ein Abzentrifugieren der Latexpartikel, schied aufgrund der Sedimentationsstabilität des Systems aus. Als Lösung bot sich hier eine Kombination von Ultrafiltration und Zentrifugation an. Die Zentrifugalfiltration in 20 ml Gefäßen (Vivascience Vivaspin 20: Ausschlussgrenze 100000 Dalton) gestattete zudem die Verkleinerung der Reaktionsansätze von 200 ml auf 10 ml.

Um vergleichbare Bedingungen zu realisieren, wurden die weiteren Experimente parallel an dem kurzkettigen *brush* KpS18 und dem langkettigen *brush* KpS13 durchgeführt. An beiden Systemen wurde sowohl eine Dorman-Reaktion, als auch die einstufige Hager-Reaktion durchgeführt. Bei letzterer kam es zur Bildung von gelartigen Klümpchen in der Suspension. Diese Beobachtung ist auf die oben beschriebenen Nebenreaktionen der Hager-Reaktion zurückzuführen. Eine Untersuchung der angebundenen Proteinmenge wurde erst nach Abfiltration der Koagulatanteile vorgenommen (s. Tab. IV.19). Nimmt man die Nebenreaktionen in Kauf lässt sich ein höherer Anbindungsgrad im Falle der Hager-Reaktion erzielen. Dies könnte auf die teilweise Hydrolyse der Aktivesterspezies bei der Entfernung des Carbodiimids bei der Dorman-Reaktion zurückgeführt werden. Wahrscheinlicher wäre aber eine Anbindung miteinander vernetzter Proteinmolekülen bei

der Hager-Reaktion. Die Hager-Reaktion am System KpS13 zeigt jedoch, dass auch bei Verzicht auf den Reinigungsschritt keine wesentlich höheren Belegungsgrade an kovalent gebundenem Protein möglich sind. Im Vergleich dazu konnten über 600 mg BSA pro Gramm KpS13-Partikel adsorptiv gebunden werden (s. Abb. IV.20).

**Tab. IV.19:** Vergleich der Ergebnisse der Hager-Reaktion (HR) und der Dorman-Reaktion (DR) an den *annealed brushes* KpS18 und KpS13. Die Menge des kovalent angebondenen Proteins wurde über den Stickstoffgehalt der Latexpartikel ermittelt.

Versuch	<i>brush</i>	eingesetzte BSA-Menge [mg/g <i>brush</i> ]	kovalent gebundene BSA-Menge [mg/g <i>brush</i> ]
V10 (HR)	KpS18	257	88 ± 9
V11 (HR)	KpS13	286	66 ± 7
V12 (DR)	KpS18	215	21 ± 2
V13 (DR)	KpS13	215	35 ± 4

Eine Erklärung für diesen Unterschied liefert die Betrachtung des Donnan-Gleichgewichts zwischen *brush*-Schicht und äußerer Pufferlösung. Der *pH*-Wert außerhalb des *brush* ist über das Puffersystem auf 6,1 eingestellt. Die Protonen innerhalb des *brush* können als Gegenionen der Polyelektrolytketten die *brush*-Schicht nicht verlassen. Dadurch liegt ein niedriger *pH*-Wert im *brush* vor, welcher über das Donnan-Gleichgewicht bestimmt ist. Infolge des niedrigeren *pH* innerhalb des *brush*, nimmt die Hydrolyserate der Aktivester-spezies wahrscheinlich stark zu. Dies erklärt wiederum, warum nahezu keine kovalente Immobilisierung an langkettigen *brushes* über eine Carbodiimid-Reaktion möglich ist.

## V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Wechselwirkung von Proteinen mit dicht gepackten sphärischen Polyelektrolytbürsten systematisch untersucht. Obwohl neutrale Polyelektrolytbürsten dazu eingesetzt werden, um Proteinadsorption zu unterdrücken und damit die Biokompatibilität von Materialien zu erhöhen, konnte nach Übergang zu geladenen Systemen ein hohes Proteinbindungsvermögen beobachtet werden. So gelang es über 1000 mg BSA pro Gramm der *brushes* zu immobilisieren. Ein derart hoher Adsorptionsgrad ließ sich experimentell im Bereich von Fremdsalzkonzentrationen unter 60 mM erzielen. Bei Ionenstärken über 100 mM konnte die Proteinadsorption bei den hydrophilen Polyacrylsäure-Systemen hingegen nahezu vollzuständig unterdrückt werden. Der Adsorptionsgrad lässt sich dabei über die Ionenstärke und den *pH*-Wert kontrollieren. Es zeigte sich eine stärkere Wechselwirkung der Proteine mit Polystyrolsulfonat-Bürsten gegenüber Polyacrylsäure-Systemen. Dies wurde hauptsächlich der hydrophoberen Natur von Polystyrolsulfonat zugeschrieben.

Zur theoretischen Beschreibung der Adsorptionsisothermen wurde ein modifiziertes BET-Modell verwendet, welches auf der Adsorption voneinander unabhängiger Teilchenstapel in den *brushes* basiert. Dieses Modell lieferte eine ausgezeichnete Beschreibung der Adsorptionsisothermen sowohl für flexible, als auch für globuläre Proteinmoleküle. Die allgemeine Anwendbarkeit dieses Konzepts wurde von der Tatsache unterstrichen, dass der Verlauf des Adsorptionsgrads sowohl bei aus Polyacrylsäure oder Polystyrolsulfonat aufgebauten *brushes*, als auch bei oberflächenmodifizierten Polystyrol-Latices wiedergegeben wurde.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die Untersuchung der Konformation der adsorbierten Proteine. Hierzu wurde ein kommerzielles speziell zur Proteinanalyse entwickeltes FT-IR-Setup eingesetzt, welches die Untersuchung der Sekundärstruktur der Proteine im adsorbierten Zustand sowie nach Wiederfreisetzung von den Latexpartikeln erlaubte. Die starke Trübung der Suspension stellte kein Hindernis für eine derartige Analyse dar. Je nach untersuchtem Protein und der Morphologie der *brushes* zeigten sich entweder keine oder allenfalls geringe adsorptionsbedingte Änderungen der Sekundärstruktur im Vergleich zum Ausgangsprotein. Nach Wiederfreisetzung wies das Protein zudem seine native Sekundärstruktur auf. Die Sekundärstrukturanalyse mittels Infrarotspektroskopie konnte durch CD-spektroskopische Untersuchungen am desorbierten Protein bestätigt werden. Somit ist eine wesentliche Grundvoraussetzung für die biologische Relevanz derartiger Systeme erfüllt.

Die thermisch induzierte Entfaltung von auf den Polyelektrolytbürsten adsorbierter RNase A ließ sich analog zum freien Protein durch ein einfaches Zweizustandsmodell beschreiben. Im Gegensatz zur freien RNase A entfaltet das adsorbierte Protein bedingt durch die Wechselwirkung mit den Polyelektrolytketten jedoch irreversibel bei einer um 13°C niedrigeren Übergangstemperatur.

Die Röntgenkleinwinkelstreuung ermöglichte die Lokalisierung der Proteine innerhalb der *brush*-Schicht. Den Elektronendichteprofilen war eine gleichmäßige Verteilung der Proteinmoleküle über die Polyelektrolytschale zu entnehmen mit einer leichten Präferenz der mittleren Schichten der Polyelektrolytbürsten.

Die Adsorption der Proteine auf den Polyelektrolytbürsten, welche nur bei Ionenstärken unter 0,1 M auftritt, ist durch die üblicherweise bei der Proteinadsorption angeführten Triebkräfte wie den hydrophoben Effekt oder elektrostatische Wechselwirkungen nicht erklärbar. Letztere können insofern nicht in Betracht gezogen werden, da im Falle der Polyacrylsäurebürsten ein ausgesprochen hydrophiles anionisches Substrat mit Proteinmolekülen negativer Nettoladung wechselwirkt. Die dominierende Triebkraft wurde vielmehr der „*counterion release force*“ zugeschrieben, welche die Freisetzung zahlreicher Gegenionen des *brush* und des Proteins vorsieht. Hierdurch wird ein enormer Entropiegewinn bewirkt, da pro Mol adsorbiertem Protein mehrere Mol Gegenionen freigesetzt werden. Dieser Effekt ist an das „osmotische Limit“ der *brushes* bei geringer äußerer Fremdsalzkonzentration gebunden. Nach Übergang in den *salted brush* bei Ionenstärken über 0,1 M ist aufgrund der hohen äußeren Ionenstärke und der damit einhergehenden Angleichung der Ionenstärke innerhalb und außerhalb des *brush* kein Entropiegewinn mehr zu erzielen. Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit gezielt eingesetzt, um adsorbiertes Protein wieder freizusetzen. Somit ermöglichen die *brushes* ein gezieltes Be- und Entladen der Partikel an Protein. Hierbei handelt es sich um eine in der Schaltbarkeit der „*counterion release force*“ über die äußere Ionenstärke begründete Eigenschaft der geladenen *brushes*, welche bei rein Oberflächen-carboxylierten Polystyrol-Latices nicht beobachtet werden konnte.

## VI Experimenteller Teil

### VI.1 Synthese und Reinigung der Trägerpartikel

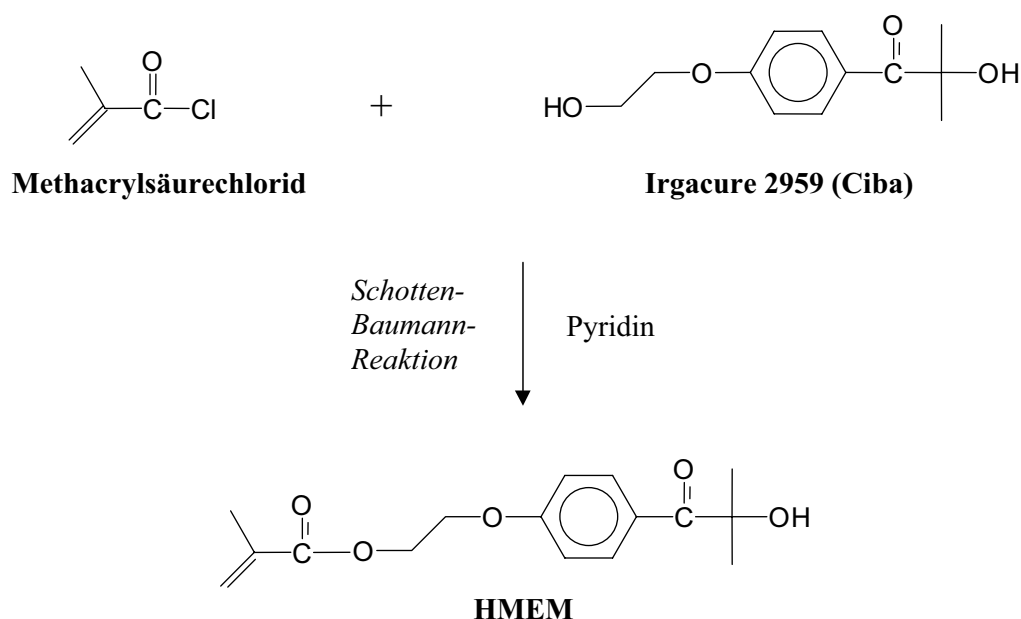
#### VI.1.1 Chemikalien

Das eingesetzte Styrol (BASF) wurde vom Stabilisator befreit, indem zunächst 2 l Styrol dreimal mit jeweils 1,2 l 10 Gew.-%iger Natronlauge extrahiert wurde. Anschließend wurde mit entionisiertem Wasser neutral gewaschen und über Calciumsulfat getrocknet. Das auf diese Weise destabilisierte Styrol wurde bei reduziertem Druck (16 mbar, 33°C) destilliert. Die Reinigung der Acrylsäure (AA, Aldrich) erfolgte ebenfalls über eine Destillation (20 mbar, 42°C). Das Monomer Natrium-4-vinyl-benzolsulfonat (NaSS, Fluka) wurde ebenso wie der Emulgator Natriumdodecylsulfat (SDS, Fluka) und der Initiator Kaliumperoxodisulfat (KPS, Fluka) ohne zusätzliche Reinigung verwendet. Irigacure 2959 (2-Hydroxy-4'-hydroxyethoxy-2-methylpropiophenon) wurde freundlicherweise von Ciba Spezialitätenchemie GmbH zur Verfügung gestellt und wurde ebenso wie Methacrylsäurechlorid (Fluka) ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das bei den Synthesen bzw. Versuchen eingesetzte Wasser wurde durch Reversosmose (Millipore MilliRO) und anschließenden Ionenaustausch (Millipore MilliQ) vor jedem Experiment gereinigt. Sämtliche weitere Chemikalien wurden von VWR, Fluka oder Aldrich bezogen und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die verwendeten organischen Lösungsmittel stammten von der Firma Schopp (Karlsruhe).

#### VI.1.2 Synthese des Photoinitiators HMEM

Die Darstellung des Photoinitiators HMEM (Methacrylsäure-2-[4-(2-hydroxy-2-methylpropionyl)-phenoxy]-ethylester) erfolgte nach der von Guo *et al.* (1999) entwickelten Vorgehensweise (s. Abb. VI.1). Hierbei wird von einem käuflich erwerbbaaren Photoinitiator Irigacure 2959 (Ciba) ausgegangen. Dieser muss in eine polymerisierfähige Form überführt werden. Dazu wird er in einer Schotten-Baumann-Reaktion mit Pyridin als Base in acetonischer Lösung umgesetzt. Über die hierbei eingeführte Vinylgruppe lässt sich der

Photoinitiator HMEM durch Copolymerisation mit Styrol chemisch an die Kernoberfläche binden.



**Abb. VI.1:** Synthese des Photoinitiators HMEM (Guo *et al.* 1999): Über eine Schotten-Baumann-Reaktion wird eine Vinylgruppe in die Photoinitiatormoleküle eingebracht, welche zur kovalenten Anbindung der Photoinitiatoreinheiten an den Polystyrol-Kern dient.

In einem 2 l-Rundkolben mit Septum wurden 189,6 g (0,845 mol) Irgacure 2959 in 1200 ml Aceton unter Rühren bei 30°C (Wasserbad) gelöst. Nach Zugabe von 90 ml (1,118 mol) Pyridin wurde die Lösung über ein Eisbad auf 0°C heruntergekühlt. Über eine Dosierapparatur (Razel) wurden 86,2 g (0,825 mol) Methacrylsäurechlorid bei einer Tropfgeschwindigkeit von 0,5 ml/min unter ständigem Rühren hinzugegeben. Zur Weiterreaktion wurde das Reaktionsgemisch im Anschluss 12 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Einengen des Gemisches auf eine Masse von 430 g wurde der Rückstand zur Entfernung des bei der Reaktion gebildeten Pyridiniumsalzes achtmal mit jeweils 500 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Die bräunliche dickflüssige organische Phase wurde in 150 ml Aceton aufgenommen und an Kieselgel (Fluka Kieselgel 60) chromatographiert (Laufmittel: Aceton). Der Fortschritt der Reinigung sowie die Reinheit des Filtrats wurde in regelmäßigen Abständen mittels Dünnschichtchromatographie (Merck Aluminiumoxid 60 F<sub>254</sub> neutral (Typ E)) verfolgt. Die hellgelbe Produktlösung wurde auf eine Konzentration von 40 – 65 Gew.-% eingengt.

Ausbeute: 75 – 100 g HMEM (30 – 40 %) in Form einer hochviskosen gelblichen acetonischen Lösung

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):

$\delta = 1,53$  (s, 6H,  $-\text{C}(\underline{\text{H}}_3)_2\text{-OH}$ );  $1,93$  (s, 3H,  $\text{CH}_2=\text{C}(\underline{\text{H}}_3)\text{-}$ );  $4,45, 4,54$  (t, 4H,  $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-O-}$ );  $5,69, 6,10$  (d, 2H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{C}(\underline{\text{H}}_3)\text{-}$ );  $7,10, 8,28$  (m, 4H,  $-\text{O}-\text{C}_6\underline{\text{H}}_4\text{-CO-}$ )

### VI.1.3 Zweistufenemulsionspolymerisation zur Darstellung der PS-co-HMEM-Kernlatices

Die Synthese der PS-Saat erfolgte in einem 3 l-Doppelmantel-Reaktor (Büchi). Dieser wurde mit einem stählernen Ankerrührer (Büchi), einer Magnetkupplung (IKA), einem Rührmotor (IKA) sowie einem Rückflußkühler und Innenthermometer ausgestattet. Die Temperierung des Reaktors erfolgte über einen Thermostaten (Lauda R400).

**Tab. VI.1:** Einwaagemengen bei der Synthese der PS-Latices (1. Reaktionsschritt)

Latex	K3	K4	K6
Styrol	468,68 g (4,500 mol)	521,17 g (5,004 mol)	519,58 g (4,989 mol)
SDS (99%)	6,5547 g (22,5 mmol)	7,2828 g (25,0 mmol)	7,2605 g (24,9 mmol)
KPS (99,5%) in 50 ml H <sub>2</sub> O	1,8344 g (6,8 mmol)	2,0379 g (7,5 mmol)	2,0324 g (7,5 mmol)
H <sub>2</sub> O	1932,6 g	2120,3 g	2113,4 g
Reaktionstemperatur	80°C	80°C	80°C
Reaktionsdauer	1 h	1 h	1 h
Rührgeschwindigkeit	320 U/min	320 U/min	320 U/min
FG vor Reinigung	19,4 Gew.-%	19,8 Gew.-%	19,3 Gew.-%
$d_{\text{PCS}}$ (H <sub>2</sub> O)	100,6 nm	97,2 nm	111,2 nm

SDS wurde im Reaktor unter Rühren in Wasser gelöst. Nach fünfmaligem Entgasen und Belüften mit Stickstoff wurde langsam unter ständigem Rühren (320 U/min) Styrol zugegeben. Anschließend wurde nochmals zweimal entgast und mit Stickstoff belüftet. Nach



Erhitzen der Reaktionsmischung auf 80°C unter Stickstoffatmosphäre wurde über eine Serumkappe eine Lösung von KPS in Wasser eingespritzt. Eine Latexpolprobe von 100 g wurde dem Reaktor nach einer Reaktionszeit von einer Stunde entnommen. Diese wurde nach Abkühlen auf 40°C durch Glaswolle abfiltriert und zur Reinigung etwa eine Woche gegen entionisiertes Wasser dialysiert (Medicell-Dialyseschlauch: Ausschlussgrenze 12000 bis 14000 Dalton). Zur Feststoffgehaltsbestimmung wurden 2 - 3 Latexpolproben in Präparatgläsern eingewogen, bis zur Gewichtskonstanz bei 80°C in einem Trockenschrank getrocknet und danach wiederum gewogen. Die Genauigkeit dieser Feststoffgehaltsbestimmung liegt bei 0,4 - 1 % (s. VI.4).

Tabelle VI.1 zeigt eine Übersicht über die im ersten Syntheseschritt eingesetzten Stoffmengen, den Feststoffgehalt (FG) der ungereinigten Latices sowie den hydrodynamischen Durchmesser  $d_{PCS}$  der erhaltenen Latexpartikel.

**Tab. VI.2:** Einwaagemengen bei der Synthese der PS-co-HMEM-Latices (2. Reaktionsschritt)

Latex (HMEM in mol%)	Kp11 (0,5)	Kp12 (1,0)	Kp13 (2,0)	Kp14 (4,0)	Kp16 (2,0)	Kp19 (4,0)
PS-Latex (FG in Gew.-%)	K3 (19,40)	K3 (19,40)	K3 (19,40)	K3 (19,40)	K4 (19,80)	K6 (19,32)
Menge (mol Styrol)	498,62 g (0,931)	499,48 g (0,933)	821,53 g (1,534)	490,58 g (0,916)	2544,44 g (4,803)	2590,57 g (4,891)
HMEM-Lsg. (Konz. in Gew.-%)	(62,23)	(62,23)	(62,23)	(62,23)	(62,23)	(46,10)
Menge (mmol HMEM)	2,18 g (4,7)	4,36 g (9,3)	14,33 g (30,5)	17,38 g (37,0)	45,11 g (96,1)	124,29 g (196,2)
Reaktionstemperatur	70°C	70°C	70°C	70°C	70°C	70°C
Reaktionsdauer	5 h	5h	5h	5 h	5 h	5 h
Rührgeschwindigkeit	320 U/min	320 U/min	320 U/min	320 U/min	320 U/min	320 U/min
FG vor Reinigung	20,1 Gew.-%	20,2 Gew.-%	20,4 Gew.-%	21,3 Gew.-%	20,6 Gew.-%	20,7 Gew.-%
$d_{PCS}$ (H <sub>2</sub> O)	100,8 nm	100,6 nm	100,8 nm	102,6 nm	99,8 nm	111,4 nm

Zur Aufpolymerisation der Photoinitiatorschicht wurde die Temperatur des Reaktionsgemischs von 80°C auf 70°C abgesenkt. Anschließend wurde eine konzentrierte acetoneische Lösung von HMEM per Dosierapparatur (Razel) mit einer Zutropfgeschwindigkeit von 0,2 ml/min durch das Septum injiziert. Nach Zugabe entsprechender HMEM-Mengen wurden jeweils 500 g Latex dem Reaktor entnommen und in 1000 ml-Dreihalskolben mit KPG-

Rührer (Glaswelle und PTFE-Rührblatt) und Rückflußkühler zur Weiterreaktion überführt. Die Hauptmenge des Reaktionsgemischs blieb dabei stets im Reaktor. Im Falle der PS-co-HMEM-Latices Kp16 und Kp19 erfolgte die Darstellung ausschließlich im Reaktor.

Die Gesamtreaktionsdauer der zweiten Stufe betrug für sämtliche Ansätze 5 Stunden. Nach Abkühlen auf 40°C wurden die erhaltenen Latices durch Glaswolle filtriert. Die Reinigung der Latices erfolgte mittels Ultrafiltration (s. VI.1.6). Als Reinigungsserum wurden hier 4 l entionisiertes Wasser (Millipore,  $\kappa \leq 0,05 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) benutzt.

Die Einwaagen der Eduktmengen zur Synthese der PS-co-HMEM-Latices sind in Tabelle VI.2 aufgeführt.

### VI.1.4 Photoemulsionspolymerisation zur Darstellung der Kern-Schale-Latices

Die Aufpolymerisation der Polyelektrolytbürsten auf den PS-co-HMEM-Kern erfolgte in einem UV-Reaktor (a.c.k. Enviolet Laborreaktor) bestehend aus einem horizontalem UV-Modul (500 W Hg-Mitteldruckstrahler, Wellenlängenbereich 200 – 600 nm), einer Umwälzpumpe und einem 3000 ml-Vorratsgefäß mit Durchflusskühler (s. Abb. IV.5).

Die mit Hilfe der Zweistufenemulsionspolymerisation hergestellten und durch Ultrafiltration gereinigten PS-co-HMEM-Kernlatices wurden mit Wasser auf einen Feststoffgehalt von 2,5 Gew.-% verdünnt sowie mit dem wasserlöslichen Monomer (Acrylsäure bzw. Natrium-4-vinyl-benzolsulfonat) versetzt. Nach Überführung in das Vorratsgefäß wurde das Gemisch viermal entgast und mit Stickstoff belüftet. Die Reaktionsmischung wurde nun kontinuierlich vom Vorratsgefäß in das UV-Modul gepumpt und ringförmig unter UV/VIS-Bestrahlung um die UV-Lampe geleitet. Nach einem Wärmeaustausch gelangt das Reaktionsgemisch zurück in das Vorratsgefäß. Zur Abführung der durch den UV-Strahler erzeugten Wärmemenge wurde ein leistungsstarker Umwälzkühler (Haake UWK 140/TP1) mit einer Kühlwassertemperatur von 6°C eingesetzt. Die Temperatur des Reaktionsgemischs konnte dabei während der Reaktionsdauer von 30 Minuten auf maximal 32°C gehalten werden. Der Reaktionsmischung wurden mehrfach Proben von 3 g entnommen, um den Reaktionsumsatz und die Ausbildung der Schale während der Reaktion untersuchen zu können.

Nach Reaktionsabbruch wurden die erhaltenen Latices ausgiebig mittels Ultrafiltration gereinigt (s. VI.1.6). Als Reinigungsserum wurden jeweils 12 l entionisiertes Wasser (Millipore,  $\kappa \leq 0,05 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) eingesetzt. Die zur Synthese der Latices mit Polyacrylsäure-Schale eingesetzten Eduktmengen sowie die erhaltenen hydrodynamischen Durchmesser

$d_{PCS}$  der Latexpartikel sind in Tabelle VI.3 aufgeführt respektive in Tabelle VI.4 für die Systeme mit einer Schale aus Polystyrolsulfonatketten.

**Tab. VI.3:** Einwaagemengen bei der Synthese der PS/PAA-Kern-Schale-Latices

Latex	KpS12	KpS13	KpS14	KpS15	KpS18	KpS21
Kern (HMEM in mol%)	Kp11 (0,5)	Kp14 (4,0)	Kp13 (2,0)	Kp12 (1,0)	Kp16 (2,0)	Kp19 (4,0)
Kernlatex (FG in Gew.-%)	843,17 g (5,93)	880,28 g (5,68)	709,22 g (7,05)	611,62 g (8,18)	614,25 g (10,66)	703,56 g (9,45)
Acrylsäure (mmol)	13,67 g (189,7)	12,51 g (173,6)	13,09 g (181,7)	13,46 g (186,8)	6,55 g (90,9)	11,66 g (161,8)
H <sub>2</sub> O	1143,3 g	1107,2 g	1277,7 g	1374,9 g	1379,0 g	2113,8 g
Reaktionsbed.	32°C, UV	32°C, UV	32°C, UV	32°C, UV	32°C, UV	32°C, UV
Reaktionszeit	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min
$d_{PCS}$ (10mM MES)	243 nm	226 nm	207 nm	286 nm	123 nm	187 nm

**Tab. VI.4:** Einwaagemengen bei der Synthese der PS/PSS-Kern-Schale-Latices

Latex	KpSS1	KpSS2
Kern (HMEM in mol%)	Kp19 (4,0)	Kp19 (4,0)
Kernlatex (FG in Gew.-%)	529,10 g (9,45)	643,52 g (9,45)
NaSS (mmol)	35,45 g (171,9)	64,68 g (313,6)
H <sub>2</sub> O	1435,0 g	1724,3 g
Reaktionsbed.	32°C, UV	32°C, UV
Reaktionszeit	30 min	30 min
$d_{PCS}$ (10mM MES)	225 nm	301 nm

Um reproduzierbare Bestrahlungsbedingungen zu gewährleisten, wurde die UV-Leistung des Strahlers alle 10 Betriebsstunden überprüft. Hierbei diente der UV-induzierte Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Maß für die UV-Leistung der Lampe. 3000 ml einer 0,2 M wässrigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurden im Reaktorsystem unter Kühlung (8°C) 15 Minuten lang der UV-Strahlung ausgesetzt. In regelmäßigen Zeitabständen wurden dem System Proben entnommen, deren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration cerimetrisch durch Titration mit 0,02 M Ce(IV)-Lösung und Ferroin als Redoxindikator bestimmt wurde. Die erhaltenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen wurden gegen

die Bestrahlungsdauer aufgetragen. Aus der Steigung der Regressionsgeraden lässt sich nach Normierung auf die Ausgangsleistung der Lampe von 500 W der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Abbau in mol/kWh erhalten. Bei den hier beschriebenen Versuchen lag dieser Wert zwischen 1,9 und 2,4 mol/kWh je nach eingesetzter Lampe.

### VI.1.5 Emulsionspolymerisation zur Darstellung des PS-co-AA-Latex PSAA

Die Synthese des carboxylierten PS-Latex PSAA erfolgte ebenfalls in dem in Abschnitt VI.1.3 beschriebenen 3 l-Doppelmantel-Reaktor (Büchi).

Der Emulgator SDS wurde unter Rühren (320 U/min) in Wasser gelöst. Styrol und Acrylsäure wurden nach fünfmaligem Entgasen und Belüften mit Stickstoff langsam unter ständigem Rühren zudosiert. Im Anschluss wurde noch zweimal entgast und mit Stickstoff belüftet. Nach Erreichen der Reaktionstemperatur von 80°C wurde unter Stickstoffatmosphäre über eine Serumkappe eine wässrige KPS-Lösung injiziert. Nach einer Reaktionsdauer von 6 Stunden wurde die entstandene Dispersion auf 40°C abgekühlt und über Glaswolle abfiltriert.

**Tab. VI.5:** Einwaagemengen bei der Synthese des PS-co-AA-Latex PSAA

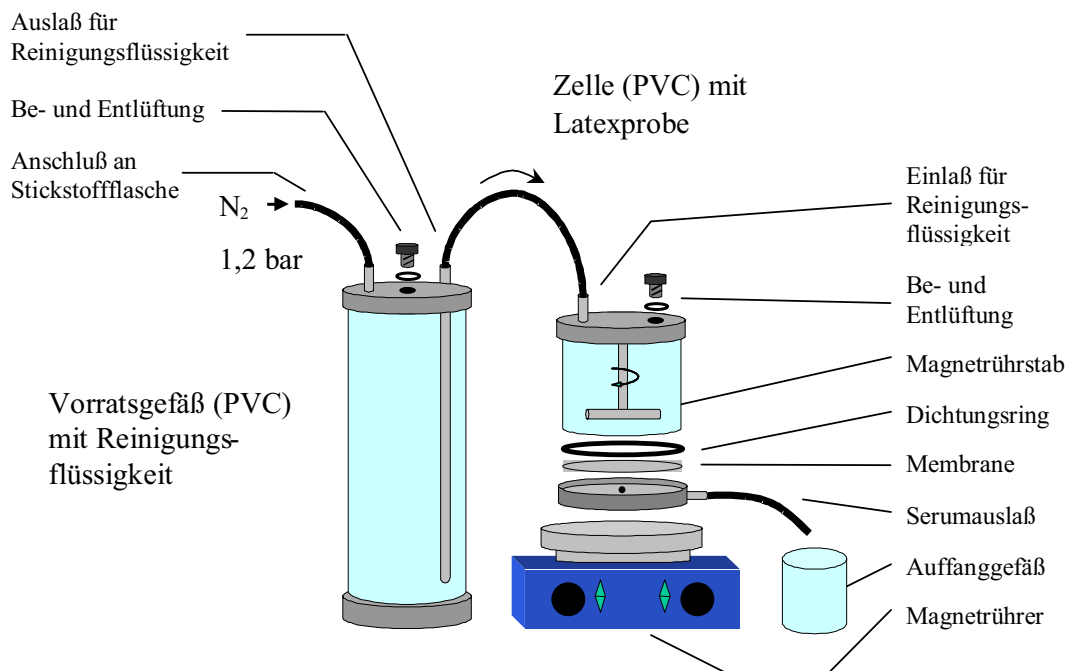
Latex	PSAA
Styrol	364,53 g (3,500 mol)
Acrylsäure	13,27 g (0,184 mol)
SDS (99%)	3,2196 g (11,1 mmol)
KPS (99,5%) in 50 ml $\text{H}_2\text{O}$	0,7007 g (2,5 mmol)
$\text{H}_2\text{O}$	1526,7 g
Reaktionstemperatur	80°C
Reaktionsdauer	6 h
Rührgeschwindigkeit	320 U/min
FG vor Reinigung	19,7 Gew.-%
$d_{PCS}(\text{H}_2\text{O})$	109,3 nm

Die Reinigung des Latex erfolgte durch intensive Ultrafiltration (s. VI.1.6) gegen 12 l entionisiertes Wasser (Millipore,  $\kappa \leq 0,05 \mu\text{S}/\text{cm}$ ).

Tabelle VI.5 zeigt eine Übersicht über die eingesetzten Stoffmengen, den Feststoffgehalt (FG) des ungereinigten Latex sowie den hydrodynamischen Durchmesser  $d_{PCS}$  der erhaltenen Latexpartikel.

## VI.1.6 Reinigung der Latices

### Ultrafiltration / Serumreplacement



**Abb. VI.2:** Schematischer Aufbau einer Ultrafiltrationseinheit bestehend aus Serumreplacementzelle und Vorratsgefäß

Die Ultrafiltration wurde in Serumreplacementzellen (Eigenbau) durchgeführt (s. Abb. VI.2). Diese besitzen ein Fassungsvermögen von 750 ml und ermöglichen es, durch Einsatz von Zellulosenitrat-Membranen mit Porenweite 50 bzw. 100 nm (Schleicher & Schuell) gelöste Polymere und nichtionische Tenside aus dem Dispersionsmedium zu ent-

fernen. Weiterhin ist mit dieser Apparatur eine Aufkonzentrierung der Latices aber auch eine Einstellung bestimmter Ionenstärken und *pH*-Werte möglich.

Die Serumreplacementzelle wurde mit jeweils 450 ml des zu reinigenden Latex gefüllt. Bei einem Stickstoffüberdruck von 1,2 bar konnte das Dispersionsmedium der synthetisierten Kern-Schale-Latices bei einem Feststoffgehalt von 3,5 Gew.-% ausgetauscht werden. Die Geschwindigkeit dieses Austauschs betrug 80 ml/h. Die Reinigung wurde abgebrochen, wenn das Serum annähernd die gleiche Leitfähigkeit wie das Reinigungsserum aufwies. Als Reinigungsserum waren hierzu 12 - 14 l entionisiertes Wasser (Millipore,  $\kappa \leq 0,05 \mu\text{S/cm}$ ) erforderlich.

Vor Beginn der unter VI.2.2 beschriebenen Proteinadsorptionsversuche wurde das Dispersionsmediums in einer weiteren Ultrafiltration gegen Pufferlösung ausgetauscht. Dieser Schritt wurde nach achtmaligem Austausch des Dispersionsmediums beendet.

### *Dialyse*

Zunächst wurde ein aus Zellulose bestehender Dialyseschlauch (Medicell: Ausschlussgrenze 12000 – 14000 Dalton) zur Sterilisation 4 Stunden in entionisiertem Wasser ausgekocht. Dieser wurde anschließend mit Latex gefüllt, an beiden Enden verschlossen und in ein Dialysebad aus entionisiertem Wasser gehängt. Die Dialysedauer betrug je nach Latex ein bis zwei Wochen. Täglich erfolgte ein Austausch des Dialysebads. Die Leitfähigkeit im Dialysebad wurde konduktometrisch zur Kontrolle des Fortschritts der Reinigung verfolgt.

## VI.1.7 Abspaltungsreaktion

Die Abspaltung der Polyacrylsäure- bzw. Polystyrolsulfonatketten vom Polystyrol-Kern wurde an 3 - 4 Gew.-%igen, mittels Ultrafiltration gereinigten Latexproben durchgeführt. Die Latexmengen wurden dabei so bemessen, dass der Feststoffanteil der Proben bei 8 - 10 g lag. Wässrige Natriumhydroxid-Lösung wurde unter Rühren langsam zugegeben, bis eine Natriumhydroxid-Konzentration von 2 mol/l in der Reaktionsmischung erreicht wurde. Anschließend wurde 15 Tage bei 120°C gerührt. Nach Neutralisation des Reaktionsgemisches mit 2 M Salzsäure wurde der teilweise ausgeflockte Latex abfiltriert (Schleicher & Schuell, Zellulosenitrat-Membrane: Porenweite 100 nm). Zur Abtrennung des hohen Salzanteils wurde die Polymerlösung mittels Ultrafiltration gereinigt. Hierzu wurde eine Regeneratzellulose-Membrane (Millipore, molekulare Ausschlussgrenze: 5000

Dalton) eingesetzt. Als Reinigungsserum wurde entionisiertes Wasser (Millipore,  $\kappa \leq 0,05 \mu\text{S/cm}$ ) verwendet.

Nach Gefriertrocknung wurden 300 - 350 mg Polyacrylat Natriumsalz bzw. 1,2 – 1,6 g Polystyrolsulfonat Natriumsalz erhalten. Dies entspricht einer Abspaltung von 20 - 40 % der Polyacrylsäureketten bzw. 40 – 60 % der Polystyrolsulfonatketten.

## VI.2 Adsorptive und kovalente Immobilisierung der Proteine

### VI.2.1 Proteine und Puffersysteme

#### Proteine

**Tab. VI.6:** Übersicht über die eingesetzten Proteine: Produktbezeichnung, Chargennummer und Proteingehalt

Protein	Spezies	Produktbez., Charge	Gehalt	Bemerkung
Albumin	Rind (Serum)	Sigma A-6003, 20K7607, 91K7435	97 %, 99 %	fettsäurefrei
Albumin	Rind (Serum)	Fluka 05480, 411662/1	97 %	-
Albumin (FITC-markiert)	Rind (Serum)	Sigma A-9771, 041K7535	96 %	10 mol FITC pro mol BSA
Amylase	Bac. subt.	Fluka 10069, 52907/1	100 %	-
Glucoamylase	Asp. niger	Fluka 10115, 48872/1	47 %	enthält Puffer- substanzen <sup>1</sup>
Hämoglobin	Rind (Blut)	Fluka 51290, S13114-452	> 94 %	fremdsalzfrei
Lactoglobulin	Rind	Sigma L-3908, 119H7008	100 %	-
Lysozym	Huhn (Eiweiß)	Fluka 62970, 48808/1	98 %	-
Myoglobin	Pferd (Herz)	Sigma M-1882, 090K7041	94 %	6 % H <sub>2</sub> O
Ribonuklease A	Rind (Pancreas)	Sigma R-4875, 092K0634	97 %	-

1) Zur Entfernung des Fremdsalzanteils wurde die Proteincharge einer Ultrafiltration (Millipore, Regenerat-zellulose-Membrane, molekulare Ausschlussgrenze: 30.000 Dalton) gegen entionisiertes Wasser unterzogen.

Die Proteine wurden soweit verfügbar in lyophilisierter (gefriergetrockneter) Form bezogen. Bei der Auswahl der Proteinchargen wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Proteinproben höchstens geringfügige Fremdsalzzusätze enthielten sowie nahezu frei von Fremdproteinen waren. In Tabelle VI.6 sind die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Proteine zusammengestellt.

### *Puffersysteme*

Als Lösungsmittel der oben aufgeführten Proteine bzw. als Dispersionsmedium der Latexpartikel wurden 10 mM und 50 mM 2-Morpholinoethansulfonsäure-Puffer (MES) bzw. 10 mM 2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure-Puffer (CHES) verwendet.

Hierzu wurden jeweils 50 mmol bzw. 250 mmol der Puffersubstanz in einem 5 l-Maßkolben aufgelöst und mit 1 M NaOH auf  $pH$  6,1 (MES) bzw.  $pH$  9,3 (CHES) eingestellt. Zusätzlich wurden dem Puffer 10 mmol Natriumazid zugesetzt, um einem möglichen Befall durch Mikroorganismen entgegenzuwirken. Je nach Experiment wurden weiterhin definierte Mengen an Natriumchlorid zugesetzt, um höhere Ionenstärken einzustellen.

Zur Untersuchung der  $pH$ -Abhängigkeit der Proteinadsorption (s. Kap. IV.4.4) wurden 10 mM MES-Pufferlösungen mit  $pH$  5,1,  $pH$  6,1 sowie  $pH$  7,2 hergestellt, wobei die Ionenstärke durch Zusatz entsprechender Mengen an Natriumchlorid auf 12 mM eingestellt wurde. Sämtliche Pufferlösungen wurden bis unmittelbar vor ihrer Verwendung bei 4°C gelagert.

## VI.2.2 Proteinadsorption auf den Latexpartikeln

Zur Erstellung der in Kapitel IV.2 gezeigten Adsorptionskurven wurden standardmäßig jeweils zehn Proben unterschiedlicher Proteinkonzentration angesetzt, welche einen möglichst großen Adsorptionsbereich abdecken sollten. Die Präparation, die Wechselwirkung der Latexpartikel mit der Proteinlösung und die abschließende Ultrafiltration zur Entfernung von nicht-adsorbierten Proteinen wurden für alle Proben einer Serie parallel durchgeführt, um äußere Störeinflüsse, insbesondere Temperaturschwankungen, möglichst gering halten zu können. Dies war besonders bei der Ultrafiltration von größter Wichtigkeit, da die Ultrafiltrationseinheit (s. Abb. VI.3) nicht temperierbar ist. Eine Temperaturkontrolle war hier nur über die Raumklimatisierung möglich. Die Anzahl der Proben, welche gleichzeitig bearbeitet werden konnten, war durch die speziell für diese Versuche entwickelte Ultrafiltrationseinheit (Eigenbau) auf zehn Stück limitiert. Waren zusätzliche Proben erforderlich bzw. wurden Wiederholungs-



experimente durchgeführt, erfolgte dies mit möglichst geringem Zeitversatz aus besagten Gründen.

Vor Beginn der eigentlichen Probenpräparation wurde in einer ausgiebigen Ultrafiltration (s. VI.1.6) das Dispersionsmedium der als Trägersystem eingesetzten Suspension gegen die Pufferlösung ausgetauscht. Der Feststoffgehalt der derart behandelten Suspension lag zwischen 3 und 9 Gew.-%.



**Abb. VI.3:** Abbildung der linken Hälfte der Ultrafiltrationseinheit zur Entfernung von ungebundenem Protein bestehend aus zehn Ultrafiltrationszellen (vorne, vgl. Abb. VI.2) und zehn Vorratsgefäßen (dahinter). Das freie, nicht-adsorbierte Protein wird in Sammelgefäßen (unten) aufgefangen.

Die Ansatzmenge der Proben wurde auf jeweils 10 g bei einem Latexpartikelgehalt von 1 Gew.-% bemessen. Je nach Experiment wurden zunächst 5 – 200 mg Protein in dem gewählten Puffermedium unter leichtem Schwenken gelöst. Die Proteinlösung wurde mit einem entsprechenden Äquivalent an Suspension von 100 mg Latexpartikel versetzt. Die mit Protein versetzte Latexp suspension wurde 24 h bei 4°C gerührt. Der freie, nicht-adsorbierte Proteinanteil wurde über eine Ultrafiltration (Schleicher & Schuell, Zellulosenitrat-Membrane: Porenweite 100 nm) unter achtmaligem Austausch des Dispersionsmediums gegen frische Pufferlösung abgetrennt (s. Abb. VI.3). Die Menge an freiem Protein im Filtrat wurde spektroskopisch aus der Extinktion bei einer Wellenlänge von 278 nm bestimmt (s. Kap. VI.3.7). Aus der Differenz von eingesetztem zu freiem, nicht-gebundenem Protein ergibt sich der auf den Latexpartikeln adsorbierte Proteinanteil.

Für zahlreiche weiterführende Studien insbesondere der in Kapitel IV.5 beschriebenen Desorptionsexperimente waren größere Probemengen erforderlich. In diesen Fällen wurde analog dem oben skizzierten Schema verfahren, wobei die Ansatzmenge allerdings um einen Faktor 2 – 25 vergrößert wurde. Zur Abtrennung des nicht-adsorbierten Proteins wurden hier größtenteils Ultrafiltrationszellen mit erhöhtem Fassungsvermögen herangezogen.

### VI.2.3 Freisetzung und Abtrennung adsorbierter Proteine

Als besondere Charakteristik der Proteinadsorption auf Polyelektrolytbürsten hat sich die Möglichkeit herausgestellt, adsorbierte Proteine durch Erhöhung der Ionenstärke wieder freizusetzen (s. Kap. IV.5)

Um diesen Effekt, insbesondere die Frage, wie viel Protein wieder desorbiert werden kann, zu untersuchen, wurde eine möglichst große Probemenge herangezogen. Schließlich sollte das desorbierte Protein isoliert werden und dessen Konformation analysiert werden (s. Kap. IV.5). Ausgegangen wurde jeweils von Proben, welche nach der in Abschnitt VI.2.2 beschriebenen Methodik präpariert wurden. Der Anteil an nicht-adsorbiertem Protein wurde zuvor in einer intensiven Ultrafiltration gegen frische Pufferlösung entfernt. Im Anschluss daran wurde die Suspension einer weiteren Ultrafiltration (Schleicher & Schuell, Zellulosenitrat-Membrane: Porenweite 100 nm) gegen Pufferlösung unterzogen, welcher allerdings zusätzlich 500 mM Natriumchlorid zugesetzt worden waren. Diese Ultrafiltration erfolgte unter achtmaligem Austausch des Dispersionsmediums der Latexpartikel. Die Menge an desorbiertem Protein wurde mittels Absorptionsspektroskopie ermittelt (s. Kap. VI.3.7). Diese Quantifizierung wurde bereits an dieser Stelle durchgeführt, um mögliche Verluste bei der weiteren Vorgehensweise ausschließen zu können.

Im Anschluss erfolgte eine weitere Ultrafiltration gegen entionisiertes Wasser (Millipore,  $\kappa \leq 0,05 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) zur Abtrennung der hohen Salzfracht von der Proteinlösung. Hierbei wurde eine möglichst große Porengröße der Membran (Millipore, Regeneratzellulose-Membrane molekulare Ausschlussgrenze: 10000 bzw. 30.000 Dalton) gewählt, um die Gesamtdauer des Vorgangs nicht zusätzlich zu erhöhen. Ansonsten hätten Veränderungen des Proteins infolge der langwierigen Ultrafiltrationsschritte von insgesamt mehr als drei Tagen Dauer auftreten können.

Die Proteinlösung wurde durch einen 5  $\mu\text{m}$ -Polyester-Membran-Spritzenfilter (membraPure MEMBEX 25 PET) filtriert, um Staubpartikel und Abriebreste von der Regeneratzellulose-Membrane zu entfernen. Abschließend wurde das Protein gefrierge-

trocknet und bis zur Sekundärstrukturanalyse mittels FT-IR-Spektroskopie (s. Kap. IV.6.1) bei 4°C gelagert.

## VI.2.4 Kovalente Proteinimmobilisierung

Die in Kapitel IV.9 beschriebene Dorman-Reaktion zur kovalenten Fixierung von Proteinen auf carboxylierten Latices verläuft in zwei Reaktionsschritten: Zunächst werden die Carboxylgruppen in ein Aktivesterintermediat überführt. Nach Entfernen des überschüssigen Aktivierungsreagenz erfolgt die Zugabe des Proteins.

### *Dorman-Reaktion*

Vor Beginn des Experiments wurde das Dispersionsmedium des PS/PAA-Kern-Schale-Latex durch Ultrafiltration (s. VI.1.6) gegen 50 mM MES-Puffer (*pH* 6,1) ausgetauscht. Pro Gramm der in MES-Puffer suspendierten Latexpartikel wurden 191,7 mg N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid (EDC, Fluka) sowie 1151,0 mg N-Hydroxysuccinimid (NHS, Fluka) gelöst in 20 ml MES-Puffer zugegeben. Die zugesetzte Puffermenge wurde dabei derart bemessen, dass der Gehalt der Latexpartikel am Gesamtansatz 1 Gew.-% betrug. Nach einer Reaktionszeit von 24 h unter ständigem Rühren bei 4°C wurde nicht-umgesetztes EDC/NHS in einer Ultrafiltration gegen 600 ml Pufferlösung entfernt. Dieser Reinigungsschritt erfolgte unter Eiskühlung, um die Hydrolyserate der Aktivesterspezies möglichst gering zu halten.

Die gewählte Menge an BSA (Fluka) wurde in 20 ml 50 mM MES-Puffer gelöst und zu den voraktivierten Latexpartikeln hinzugesetzt. Die Mischung wurde weitere 24 h bei 4°C gerührt.

### *Hager-Reaktion*

Die Hager-Reaktion verlief analog zur Dorman-Reaktion, wobei der Reinigungsschritt entfiel und das Protein direkt nach Zugabe von EDC/NHS zugesetzt wurde.

### *Reinigung*

Zunächst wurde die Suspension einer intensiven Ultrafiltration gegen 50 mM MES-Puffer unterzogen, um nicht-gebundenes Protein sowie Reagenzreste bzw. deren Hydrolyseprodukte abzutrennen. Eine weitere Ultrafiltration gegen eine Detergenzlösung (1 Vol.-% Triton X-100, 1 M NaCl, eingestellt auf *pH* 9,0 mit Natronlauge) diente zur Entfernung des adsorptiv gebundenen Proteinanteils. Nach Abschluss der Reinigung wurde die Detergenzlösung wieder gegen 50 mM MES-Puffer ausgetauscht.

Teilweise wurde auf die erste Ultrafiltration gegen MES-Puffer verzichtet, welche lediglich zur Bestimmung des adsorptiv gebundenen Proteinanteils diente.

### VI.2.5 Quantifizierung der kovalent immobilisierten Proteinmenge

Die Bestimmung der Menge an Albumin, welche pro Gramm Trägerpartikel kovalent über die Dorman- bzw. Hagerreaktion an die PS/PAA-Kern-Schale-Latices angebunden werden konnte, erfolgte zum einen über den Stickstoffgehalt der Partikel. Alternativ bzw. zur Ergänzung wurden hierzu ebenfalls spektroskopische Methoden in Form eines Protein-Assays eingesetzt.

#### *Stickstoffgehaltsbestimmung*

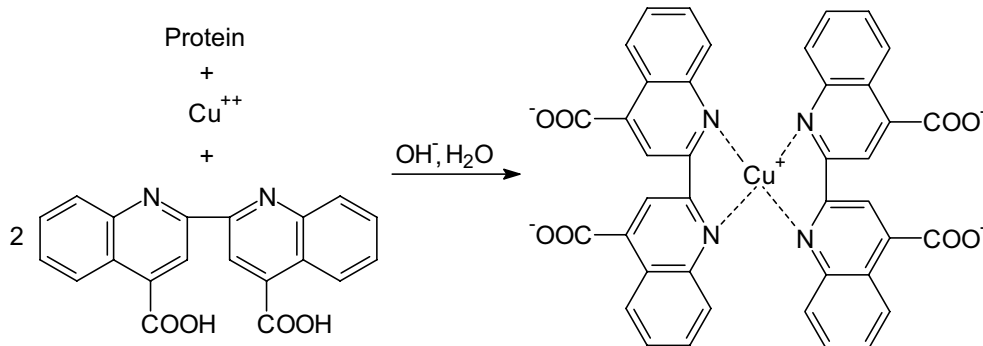
Die Analyse des Stickstoffgehaltes wurde durch ein externes Analysenlabor (Malissa & Reuter GmbH) an gefriergetrockneten Latexprouben mit einem Elementaranalysator (Elementar) durchgeführt, welcher auf der Basis eines modifizierten Pregel-Dumas-Verfahrens funktioniert. Der Stickstoffgehalt der eingesetzten Proteincharge (BSA, Fluka) wurde auf die gleiche Weise zu 15,4 Gew.-% ( $\pm 0,3$  Gew.-%) bestimmt und diente zur Berechnung der gebundenen Proteinmenge aus dem Stickstoffgehalt der Latexprouben.

Zur Überprüfung der Eignung der Methodik wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt: In einer Blindprobe bestehend aus reinen PS/PAA-Latexpartikel ließen sich erwartungsgemäß nur minimale Spuren von Stickstoff ( $60 \text{ mg N/kg} \pm 18 \text{ mg N/kg}$ ) feststellen. In einem weiteren Experiment wurden PS/PAA-Latexpartikel zunächst in 50 mM MES-Puffer ( $\text{pH } 6,1$ ) suspendiert und anschließend einer Ultrafiltration gegen entionisiertes Wasser unterzogen. Die MES-Moleküle ließen sich vollständig durch die Ultrafiltration entfernen, wie die Stickstoffanalyse ( $90 \text{ mg N/kg} \pm 27 \text{ mg N/kg}$ ) ergab. Neben Protein und MES-Puffer kommen weiterhin die Reagenzien EDC und NHS bei der Dorman-Reaktion (s. Kap. IV.9) als mögliche Stickstoffquellen in Frage. Zur Überprüfung wurde hier eine Latexproube gemäß der ersten Stufe der Dorman-Reaktion mit EDC/NHS aktiviert und im Anschluss gegen entionisiertes Wasser ultrafiltriert. Es zeigte sich hierbei, dass die Reagenzien bzw. deren Hydrolyseprodukte durch den Reinigungsschritt vollständig entfernt werden.

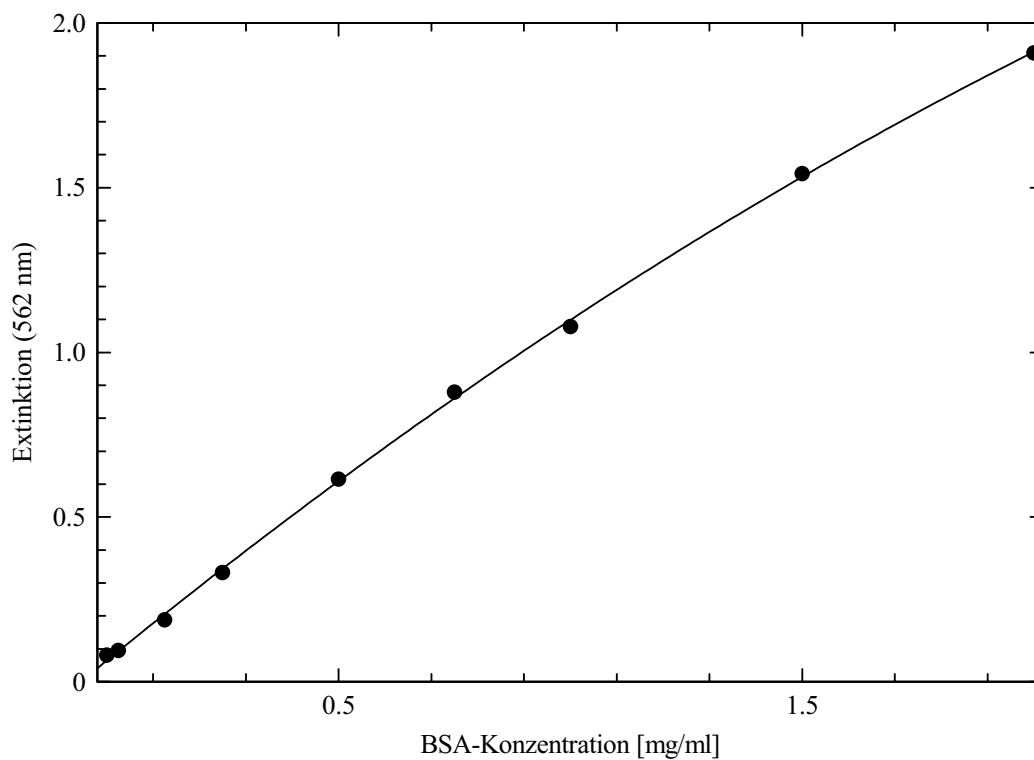
#### *BCA-Assay*

Dieser Protein-Assay beruht darauf, dass im alkalischen Milieu zweiwertige Kupferionen durch die Amidgruppen der Proteine zu einwertigen Ionen reduziert werden (Smith *et al.*

1995). Die einwertigen Kupferionen werden durch Bicinchoninsäure (BCA) in Form eines tiefvioletten Komplexes gebunden (s. Abb. VI.4).



**Abb. VI.4:** Reaktionsprinzip des BCA-Assays:  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen werden in Gegenwart von Protein im alkalischen Medium zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert und von BCA-Molekülen in Form eines violetten Komplexes aufgefangen, dessen Konzentration über die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm zugänglich ist.



**Abb.VI.5:** Eichkurve des BCA-Assays: Proben einer Konzentrationsreihe des Proteins wurden mit der BCA-Reagenzlösung versetzt und deren Extinktion bestimmt. Die erhaltenen Messwerte wurden einer quadratischen Regression unterzogen.

Es wurde ein Protein-Kit (Pierce BCA-Protein-Assay-Kit) eingesetzt, der sich aus zwei wässrigen Reagenzlösungen zusammensetzte: Reagenz A enthielt Natriumbicinchoninsäure, Natriumcarbonat, Natriumtartrat, Natriumhydroxid sowie Natriumbicarbonat. Bei Reagenz B handelte es sich um Kupfersulfatlösung. Zur Herstellung des eigentlichen Nachweisreagenzes wurden 50 ml Reagenz A mit 1 ml Reagenzlösung B vermischt, woraufhin sich zunächst ein grüner Niederschlag ausbildete, welcher sich rasch wieder auflöste. Die fertige Reagenzlösung wurde maximal einen Tag lang verwendet.

0,1 ml Probelösung wurden mit 2 ml des BCA-Reagenzes bei 38°C (Wasserbad) 30 Minuten lang inkubiert. Nach Filtration der violetten Lösung durch einen 1 µm-Polyester-Membran-Spritzenfilter (membraPure MEMBREX 25 PET) wurde deren Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt (s. VI.3.7). Zur Berücksichtigung der Eigenextinktion der Latexpartikel wurden die Proben gegen eine Referenzsuspension gleicher Teilchenkonzentration gemessen.

Die Ermittlung des BSA-Gehalts der Proben aus den Extinktionswerten erfolgte über eine Eichkurve (s. Abb.VI.5), welche über die gleiche Weise mittels einer Konzentrationsreihe des Proteins in mg/ml erhalten wurde.

## VI.3 Geräte und Untersuchungsmethoden

### VI.3.1 Bestimmung des Feststoffgehalts der Dispersionen

Zur Feststoffgehaltsbestimmung wurden 2 - 3 Latexprouben von je 1 – 2 ml in Präparategläsern eingewogen, bis zur Gewichtskonstanz bei 80°C in einem Trockenschrank getrocknet und wiederum gewogen. Der Gesamtfeststoffanteil ergibt sich aus dem Massenverhältnis des getrockneten Latex zur eingewogenen Dispersion. Der Feststoffgehalt der Pufferlösung wurde entweder berechnet oder ebenfalls gravimetrisch ermittelt. Unter Berücksichtigung des Feststoffanteils des Dispersionsmediums ergibt sich der Massenanteil an Latexpartikeln aus dem Feststoffgehalt der Dispersion zu:

$$\text{FG (Partikel)} = \frac{\text{FG (Dispersion)} - \text{FG (Pufferlösung)}}{1 - 0,01 \text{ FG (Pufferlösung)}} \quad (6-1)$$

FG (Partikel):	Massenanteil an Latexpartikeln in Gew.-%
FG (Dispersion):	Feststoffgehalt der Dispersion in Gew.-%
FG (Pufferlösung):	Feststoffgehalt der Pufferlösung bzw. des Dispersionsmediums in Gew.-%

### VI.3.2 Konduktometrische Titration

Die Massenzusammensetzung der PS/PAA-Kern-Schale-Latices wurde über konduktometrische Titration der Carboxyl-Gruppen mittels eines Leitfähigkeitsmessgerätes der Firma WTW (LF 537) bestimmt. Es wurden jeweils 1 g Latexpartikel mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 200 ml verdünnt und mit 0,1 M Natronlauge titriert. In die Probe wurde ein leichter Stickstoffstrom eingeleitet, um einer Aufnahme von Kohlendioxid aus der Luft entgegenzuwirken.

Die gemessene Leitfähigkeit  $\kappa$  der Elektrolytlösung hängt von der Anzahl der geladenen Partikel bzw. der Ionen sowie deren Beweglichkeit ab:

$$\kappa = F c^*(eq) u \quad (6-2)$$

$\kappa$ :	Leitfähigkeit
F:	Faraday-Konstante
$c^*(eq)$ :	Äquivalentkonzentration
$u$ :	Ionenbeweglichkeit

Im Falle von Polyacrylsäure als schwachen Polyelektrolyten lässt sich die Neutralisationstiteration in folgende Reaktionsgleichungen unterteilen:

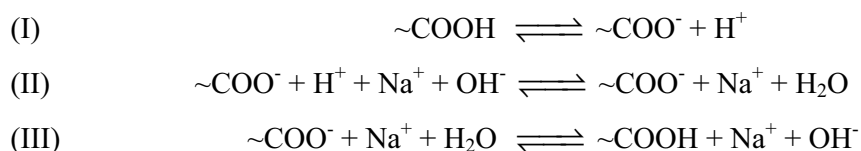


Abbildung VI.6 zeigt ein zugehöriges schematisches Titrationsdiagramm. Zu Beginn der Titration (Punkt A) ist die Leitfähigkeit klein aufgrund des geringen Dissoziationsgrades der Polyacrylsäure (Reaktionsglg. I). Sie nimmt weiterhin ab (AB), da nach Gleichung II die leitfähigeren  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen („Extraleitfähigkeit“ der Ionen des Wassers, Kunze *et al.* 1996) durch  $\text{Na}^+$ -Ionen verdrängt werden. Allmählich bildet sich soviel Natriumpolyacrylat, dass die Leitfähigkeit wieder zunimmt (BC). Nach Überschreiten des Äquivalenzpunkts (C) kommt es zu einem steileren Ansteigen der Leitfähigkeit, da die besonders leitfähigen  $\text{OH}^-$ -Ionen („Extraleitfähigkeit“) nun nicht mehr verbraucht werden.

Zur genauen Bestimmung des Äquivalenzpunktes C werden die Werte in den Bereichen BC und CD einer linearen Regression unterworfen. Der Äquivalenzpunkt ergibt sich aus dem Schnittpunkt beider Regressionsgeraden.

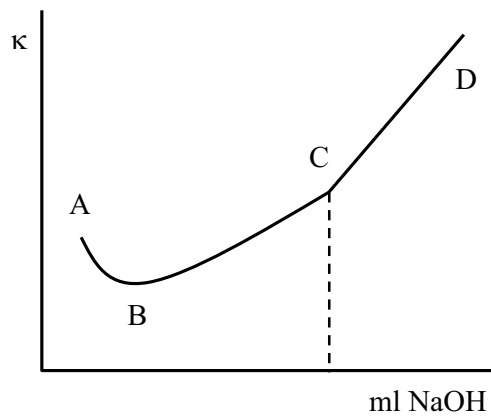


Abb. VI.6: Leitfähigkeitstiteration eines schwachen Polyelektrolyten

### VI.3.3 Scheibenzentrifuge (DCP)

Mit Hilfe einer Scheibenzentrifuge (Brookhaven Instruments Corporation BI-DCP) konnte die Teilchengrößenverteilung der Kernlatices (PS- und PS-co-HMEM-Latices) untersucht werden. Es erfolgt dabei eine Sedimentation der Latexteilchen in einer Trägerflüssigkeit (Spinflüssigkeit) innerhalb einer mit konstanter Geschwindigkeit rotierenden vertikal aufgehängten Plexiglashohlscheibe (s. Abb. VI.7). Die Detektion erfolgt über eine turbidimetrische Analyse.

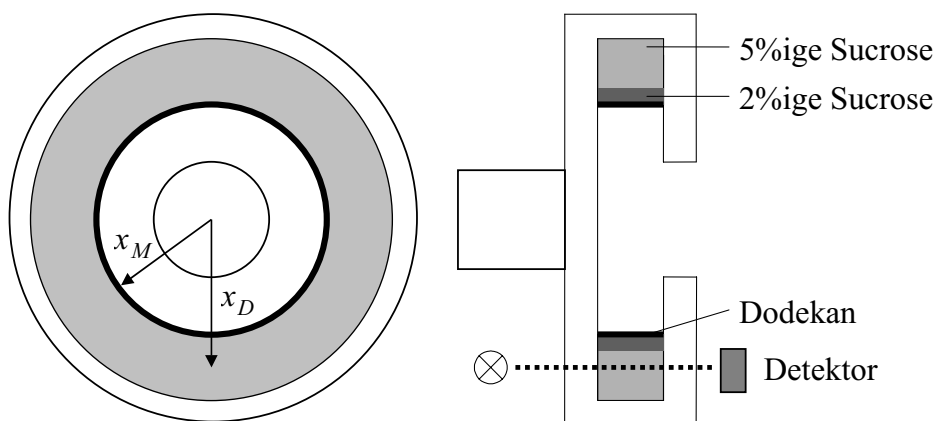


Abb. VI.7: Schematische Darstellung der Scheibenzentrifuge in Frontal- und Seitenansicht



Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden 10 ml 5 Gew.-%ige wässrige Sucrose-Lösung (Fluka) als Spinflüssigkeit verwendet, welche bei einer Umdrehungszahl von 15000 U/min mit 0,8 ml einer 2 Gew.-%igen wässrigen Sucrose-Lösung überschichtet wurde. Durch dreimaliges kurzes Unterbrechen (0,5 s) der Rotation wird eine partielle Durchmischung von Pufferschicht und Spinflüssigkeit bewirkt, wodurch ein Dichtegradient erzeugt wird (Devon *et al.* 1991). Diese Vorgehensweise dient dazu, stabile Sedimentationsbedingungen zu realisieren und das Auftreten von Verwirbelungen und Strähnenbildungen zu vermeiden. Um einem Verdampfen der Spinflüssigkeit entgegenzuwirken, wurde zusätzlich 0,4 ml Dodekan (Fluka) auf den Meniskus gegeben. Vor der Injektion der Latexpolymersprobe wurde eine Vorlaufzeit von 30 Minuten eingehalten, um annähernd isotherme Bedingungen zu erhalten. Es wurden 0,2 bis 0,3 ml eines 0,2 Gew.-%igen Latex aufgegeben. Aufgrund der größeren Dichte der Latexteilchen gegenüber der Spinflüssigkeit, wandern diese im Zentrifugalfeld. Geht man von einem Gleichgewicht der auf die Teilchen wirkenden Kräfte (Zentrifugalkraft, Reibungskraft und Auftriebskraft) und der Gültigkeit des Stokes'schen Reibungskoeffizienten  $f = 3\pi\eta\sigma$  (Wedler 1987) aus, ergibt sich die Stokes'sche Gleichung der Sedimentationsdauer  $t$  (Langer 1979) zu:

$$t = \frac{18 \eta \ln(x_D/x_M)}{\sigma^2 \Delta\rho \omega^2} \quad (6-3)$$

$t$ :	Sedimentationsdauer
$\eta$ :	Viskosität der Spinflüssigkeit
$x_M$ :	radiale Ortskoordinate des Meniskus
$x_D$ :	radiale Ortskoordinate des Detektors
$\sigma$ :	Teilchendurchmesser
$\Delta\rho$ :	Differenz zwischen Teilchen- und Spinflüssigkeitsdichte
$\omega$ :	Kreisfrequenz der Scheibe

Auf diese Weise wird jeder Teilchengröße eine bestimmte Sedimentationsdauer zugeordnet. Da die Sedimentationsdauer antiproportional zum Quadrat des Teilchendurchmessers ist, wird eine gute Auflösung erreicht. Die Detektion der Anzahl der nach der Sedimentationsdauer aufgetrennten Teilchen erfolgt turbidimetrisch an einer festgelegten Position  $x_D$  (vgl. Abb. VI.7). Es gilt hierbei (Devon *et al.* 1991):

$$\tau(\sigma) \sim \left( \frac{\partial\rho}{\partial\sigma} \right) \cdot \sigma^3 \cdot \bar{Q}_{sca}(\sigma, m) \quad (6-4)$$

$\tau(\sigma)$ : Trübung

$(\partial\rho/\partial\sigma)\cdot\sigma^3$ :	differentielle Volumenverteilung
$\bar{Q}_{sca}(\sigma, m)$ :	normierter, integrierter Effizienzfaktor (berücksichtigt das Spektrum der Lichtquelle)

Der normierte, integrierte Effizienzfaktor  $\bar{Q}_{sca}(\sigma, m)$  resultiert aus dem Integral des Effizienzfaktors, d. h. dem Verhältnis Streuquerschnitt zu geometrischem Querschnitt über den gesamten Wellenlängenbereich (Oppenheimer 1983). Die zur Auswertung benötigten Werte für  $\bar{Q}_{sca}(\sigma, m)$  sind in Form von Eichkurven in der Auswertesoftware für die Scheibenzentrifuge enthalten. Über diese Beziehungen sind somit die Teilchengrößenverteilungen und damit auch die verschiedenen Mittelwerte der Teilchengröße der Latexpartikel zugänglich.

#### VI.3.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Latices wurden an der Fakultät für Physik der Universität Karlsruhe an einem Transmissionselektronenmikroskop (Hitachi H7) durchgeführt.

Die Messungen erfolgten bei Beschleunigungsspannungen von 150 kV. Die Photographien wurden mit einem Vergrößerungsfaktor von 42000 erhalten. Die Ermittlung der Teilchengrößenverteilung des PS-co-HMEM-Latex Kp13 (s. Abb. IV.12) wurde mit Hilfe eines mechanischen Teilchengrößenzählers (Carl Zeiss, TGZ3) durchgeführt. Um eine vernünftige Auflösung zu erhalten, wurden insgesamt 1242 Teilchen ausgezählt.

Es erfolgte eine Negativkontrastierung der Latices (Kim 1993) mit einer 1 Gew.-%igen wässrigen Lösung von Natriumsalzen der Phosphorwolframsäure (PWS, Fluka). Die PWS-Lösung enthielt zusätzlich 0,1 Gew.-% Albumin (Fluka) und 2 Gew.-% Sucrose (Fluka). Um eine Denaturierung des Albumins zu verhindern, wurde die Lösung vor Zugabe des Albumins mit verdünnter Natronlauge auf  $pH$  6,5 – 7,3 eingestellt. Ein Tropfen des mit der PWS-Lösung auf 0,1 Gew.-% verdünnten Latex wurde auf einen TEM-Probenträger (Cu-Trägernetz mit aufgedampfter Kohleschicht, Plano) gegeben. Der Tropfen wurde mit einem Papiertuch solange aufgesogen, bis sich ein dünner Flüssigkeitsfilm auf dem Trägernetz ausbildete. Nach kurzer Lufttrocknung wurde die Probe einige Stunden im Exsikkator über  $P_4O_{10}$  getrocknet.

### VI.3.5 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Bei der dynamischen Lichtstreuung werden die Intensitätsfluktuationen einer stark verdünnten Probe analysiert und nicht wie bei einer statischen Methode (Röntgenkleinwinkelstreuung, statische Lichtstreuung) der zeitliche Mittelwert der Intensität. Die Intensitätsfluktuationen liegen in der thermischen Bewegung der Teilchen begründet, da die Streuwellen je nach der momentanen Anordnung der Teilchen unterschiedlich interferieren. Im thermischen Gleichgewicht bewegen sich kleine Teilchen schneller als große. Somit lässt sich aus der Relaxationsrate der auftretenden Intensitätsfluktuationen ein Diffusionskoeffizient der Teilchen berechnen (Thomas 1987, Chu 1991, Wiese 1992). Da die Registrierung der gestreuten Photonen in sehr kurzen Zeitabständen im Nano- bis Picosekundenbereich erfolgen muss, werden hochempfindliche Detektoren benötigt. Hierzu werden hauptsächlich Photomultiplier in Photonenzähltechnik verwendet. Weitere Unterschiede zur statischen Lichtstreuung bestehen darin, dass eine Lichtquelle hoher Leistung und Kohärenzlänge benötigt wird und ein möglichst kleines Streuvolumen über Lochblenden auf den Detektor abgebildet werden muss. Als Lichtquellen kommen daher Laser zum Einsatz.

Die dynamischen Lichtstremessungen zur Bestimmung der hydrodynamischen Latexpartikelgröße wurden mit einem Gerät der Firma Peters-ALV durchgeführt. Der Messaufbau setzt sich aus einem optischen System bestehend aus einem 50 mV He-Ne-Laser ( $\lambda = 632,8$  nm), Fokussierung, Messzelleneinheit sowie einer Detektoreinheit und einem Signalverarbeitungssystem aus Korrelator und Rechner zusammen. Durch den beweglichen Goniometerarm, welcher die Photomultipliereinheit trägt, sind Messungen mit Streuwinkeln zwischen  $14^\circ$  und  $152^\circ$  möglich. Laut Herstellerangaben können mit diesem Gerät Teilchen zwischen 1 nm und  $1 \mu\text{m}$  bzw. Diffusionskoeffizienten zwischen  $10^{-6}$  bis  $2,5 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$  gemessen werden.

Die Latexprouben wurden zunächst auf eine Konzentration von ca.  $10^{-2} \text{ g/l}$  mit dem wässrigen Dispersionsmedium (entionisiertes Wasser, Salzlösung oder Pufferlösung) verdünnt und danach zur Entstaubung durch einen  $0,45$  bzw.  $1 \mu\text{m}$ -Polyester-Membran-Spritzenfilter (membraPure MEMBEX 25 PET) direkt in geeignete Quarzglas-Küvetten filtriert. Die verwendeten Messküvetten wurden zuvor mit THF und entionisiertem Wasser staubfrei gespült. Die Probenpräparation erfolgte in einer Reinraumwerkbank (Köttermann, Flowbox 8580).

Vor jeder Messung wurden die Proben 30 Minuten in der Messzelle auf die Mess-temperatur von  $25^\circ\text{C}$  temperiert. Die Temperierung erfolgte mit einem Kryostaten (Haake C, Fisons F3). Als Indexmatchingsubstanz wurde Toluol benutzt. Die Messungen erfolgten bei einem festen Streuwinkel von  $90^\circ$ , da aufgrund der geringen Polydispersität der Latex-

proben keine Winkelabhängigkeit des mittleren Diffusionskoeffizienten vorliegt (Norhausen 1997).

Die aus den Intensitätsfluktuationen bestimmten Diffusionskoeffizienten wurden mittels der Kumulantenmethode ermittelt (Thomas 1987, Chu 1991, Wiese 1992). Aus den auf diese Weise erhaltenen Diffusionskoeffizienten  $D$  lässt sich mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung der hydrodynamische Durchmesser der Latexpartikel berechnen (Wedler 1987):

$$D = k_B T / 3\pi\eta d_{eff} \quad (6-5)$$

$D$ :	Diffusionskoeffizient
$k_B$ :	Boltzmann-Konstante
$T$ :	absolute Temperatur
$\eta$ :	dynamische Viskosität
$d_{eff}$ :	effektiver (hydrodynamischer) Durchmesser

Da der hydrodynamische Teilchendurchmesser der Kern-Schale-Latices stark durch die Wechselwirkung mit dem Dispersionsmedium bestimmt wird, ist ein Vergleich mit über statische Methoden bestimmten Teilchengrößen nur bedingt möglich.

### VI.3.6 Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE und die Nativ-Elektrophorese wurden teilweise am Institut für Organische Chemie der Universität Karlsruhe (TH) im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. A. S. Ulrich durchgeführt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte ausschließlich am Polymerinstitut.

#### VI.3.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde mit vertikalen Elektrophoresekammern der Firmen Biorad (Mini Protean 3 Cell) und Serva (Blue Vertical 101) durchgeführt. Die Spannungsversorgung erfolgte über ein Gerät der Marke Consort (Microcomputer Electrophoresis Power Supply E 455 oder E 143).

*Eingesetzte Lösungen*

- Probenpuffer für SDS-PAGE, reduzierend  
3,21 g TRIS, 2,0 g SDS, 0,8 g Dithiothreitol, eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau sowie 10 ml Glycerin wurden auf ein Volumen von 100 ml mit entionisiertem Wasser gelöst.
- Puffer A für SDS-PAGE (Trenngelpuffer)  
18,3 g TRIS wurden in 40 ml entionisiertem Wasser gelöst. Nach Einstellen des *pH*-Wertes auf 8,8 mit halbkonzentrierter Salzsäure wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 ml verdünnt.
- Puffer B für SDS-PAGE (Sammelgelpuffer)  
9,6 ml 1 M wässrige TRIS-Lösung wurden mit 40 ml entionisiertem Wasser versetzt. Nach Einstellen des *pH*-Wertes auf 6,8 mit halbkonzentrierter Salzsäure wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 ml verdünnt.
- Lösung C (Roth rotiphorese Gel 30, Acrylamid/BIS-Stammlösung)  
29,2 g Acrylamid und 0,8 g BIS in 100 ml Lösung
- 20 Gew.-%ige wässrige SDS-Lösung
- 20 Gew.-%ige wässrige Ammoniumperoxodisulfat-Lösung
- Elektrolysepuffer für SDS-PAGE (Laufpuffer), *pH* 8,8  
12,0 g TRIS, 57,5 g Glycin sowie 4,0 g SDS wurden auf ein Volumen von 1 l mit entionisiertem Wasser gelöst. Vor Gebrauch wurde der Puffer 1 : 4 verdünnt.
- Fixierlösung  
100 ml Eisessig und 450 ml Ethanol wurden mit 450 ml entionisiertem Wasser vermischt.
- Färbelösung für Polyacrylamidgele  
0,1 g Coomassie R 250 in Tablettenform wurden in 450 ml Ethanol sowie 50 ml Eisessig aufgelöst und anschließend auf ein Volumen von 1 l mit entionisiertem Wasser verdünnt.
- Entfärbelösung für Polyacrylamidgele  
300 ml Ethanol sowie 50 ml Eisessig wurden mit 650 ml entionisiertem Wasser versetzt.

*Probenvorbereitung*

Die Proteine wurden in 20 Gew.-%iger wässriger Glycerinlösung auf eine Konzentration von 3 mg/ml gelöst. Die Proteinlösung wurde in einem Volumenverhältnis von 1 : 2 mit dem reduzierenden Probenpuffer verdünnt und 3 Minuten lang in einem siedenden Wasserbad gekocht.

### Herstellung von SDS-Minigelen

Die Gele wurden zwischen zwei abgedichteten Kunststoffplatten gegossen, welche über 0,75 mm dicke „Spacer“ voneinander getrennt waren. Um eine schärfere Bandentrennung zu bewirken, wurde über das eigentliche Trenngel ein Sammelgel gegossen. Die Matrix des Sammelgels soll dabei größere Porenweiten und einem anderem *pH*-Wert als das Trenngel aufweisen. Innerhalb des Sammelgels wird dadurch ein rasches Wandern der Proteine im elektrischen Feld ohne Auftrennung als scharfe Bande ermöglicht. Mit Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel wird die Wanderungsgeschwindigkeit drastisch herabgesetzt und wird nun abhängig von der Molekülgröße.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und sofort vorsichtig mit entionisiertem Wasser überschichtet. Die Überschichtung sollte dazu dienen, dass die obersten Schichten der Gelmischung nicht in Kontakt mit Luftsauerstoff gelangen und so später eine scharfe Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht werden kann.

Nach einer Polymerisationszeit von 15 Minuten war eine deutliche Phasengrenze zwischen Geloberfläche und überstehenden Wasser feststellbar. Das Wasser wurde abdekantiert. Unmittelbar nach dem Gießen des Sammelgels wurde ein 10-zähliger Kamm eingeführt. Dies führte dazu, dass sich Taschen innerhalb des Sammelgels ausbildeten, worin die Proteinlösungen aufgegeben werden konnten. Nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten wurde der Kamm entfernt und die Geltaschen gründlich mit dem Elektrolyse-puffer ausgewaschen.

Die zum Gießen des Trenn- und des Sammelgels angesetzten Reaktionsmischungen sind in Tabelle VI.7 zusammengestellt:

**Tab. VI.7:** Ansatzmengen zur Herstellung von Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE

Gel	%T	H <sub>2</sub> O [ml]	Puffer A [ml]	Puffer B [ml]	Lsg. C [ml]	SDS- Lsg. [μl]	TEMED [μl]	APS- Lsg. [μl]
Sammelgel	5	1,2	-	0,5	0,33	-	4	14
Trenngel	12	2,3	0,65	-	2,0	25	10	25

%T Totalacrylamidkonzentration des Gels in Gew.-%

### Gellauf

Nach dem Einspannen des Gels in die Elektrophoreseapparatur wurde der Elektrolyse-puffer in Anoden- und Kathodenkammer eingefüllt. Je nach Experiment wurden jeweils 2-5 μl Probelösung sowie 10 μl Molekulargewichtsmarker (Roth Roti<sup>®</sup>-Mark Standard) in die einzelnen Geltaschen pipettiert.

Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke von 25 mA gefahren, wobei die Anfangsspannung 10 V betrug und danach kontinuierlich auf maximal 200 V anstieg. Ab-

gebrochen wurde die Elektrophorese nach 45 Minuten, als die Front des im Probenmarker enthaltenen Bromphenolblaus die Gelunterkante erreicht hatte.

#### *Fixierung, Anfärbung der Proteinbanden*

Das Gel wurde vorsichtig aus der Apparatur entnommen und in ein Bad mit Fixierlösung überführt. Nach 15-minütigem Schütteln wurde das Gel zweimal für je 5 Minuten in entionisiertem Wasser gewaschen. Zur Anfärbung der Proteinbanden wurde das Gel mindestens 20 Minuten lang unter Schütteln in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Nach Abgiessen der Färbelösung wurden überschüssige Reste der Coomassie-Lösung mit Wasser ausgewaschen. Das Gel wurde mehrfach in Entfärbelösung inkubiert, bis der Hintergrund nahezu vollständig entfärbt war. Im Anschluss wurde das Gel mehrfach für einige Stunden in entionisiertem Wasser geschüttelt.

Abschließend wurde das in Wasser getränkte Gel in Transparentfolie eingeschweißt und bei 4°C gelagert. Zur Dokumentation des Gels bzw. zur Auswertung der Proteinbanden (s. Kap. IV.3) wurde das Gel eingescannt sowie direkt auf einer Leuchtplatte vermessen.

### VI.3.6.2 Nativ-Elektrophorese

Die Nativ-Elektrophorese wurde in den schon für die SDS-PAGE eingesetzten Apparaturen durchgeführt. Die Durchführung insbesondere der Gellauf sowie die Fixierung und Anfärbung der Proteinbanden erfolgten nach der im Abschnitt VI.3.6.1 skizzierten Methode. Die erforderliche Elektrophoresedauer betrug hier 55 Minuten.

#### *Eingesetzte Lösungen*

- Probenpuffer für Nativ-Elektrophorese, *pH* 6,8  
1,0 ml 0,5 M wässrige TRIS-HCl-Lösung (*pH* 6,8), 0,8 ml Glycerin und eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau wurden in 5,8 ml entionisiertem Wasser gelöst.
- Puffer A für Nativ-Elektrophorese (Trenngelpuffer)  
9,1 g TRIS wurden in 40 ml entionisiertem Wasser gelöst. Nach Einstellen des *pH*-Wertes auf 8,8 mit halbkonzentrierter Salzsäure wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 ml verdünnt.
- Puffer B für Nativ-Elektrophorese (Sammelgelpuffer)  
3,0 g TRIS wurden mit 40 ml entionisiertem Wasser gelöst. Nach Einstellen des *pH*-Wertes auf 6,8 mit halbkonzentrierter Salzsäure wurde ebenfalls auf ein Volumen von 50 ml verdünnt.
- Elektrolysepuffer für Nativ-Elektrophorese (Laufpuffer), *pH* 8,3

## Experimenteller Teil

---

30,3 g TRIS sowie 144,0 g Glycin wurden auf ein Volumen von 1 l mit entionisiertem Wasser gelöst. Vor Gebrauch wurde der Puffer 1 : 10 verdünnt.

- Die weiteren eingesetzten Lösungen (Acrylamid-/BIS-Stammlösung, Ammoniumperoxodisulfat-Lösung, Fixierlösung, Färbelösung, Entfärbelösung) wurden wie in Abschnitt VI.3.6.1 beschrieben hergestellt bzw. verwendet.

### Probenvorbereitung

Die Proteine wurden in 20 Gew.-%iger wässriger Glycerinlösung gelöst. Die Proteinlösung mit einer Konzentration von 3 mg/ml wurde in einem Volumenverhältnis von 1 : 1 und 1 : 4 mit Probenpuffer verdünnt. Von den Probelösungen wurden jeweils 2 µl in die Gel-taschen pipettiert.

### Herstellung von Minigelen zur Nativ-Elektrophorese

Die Art der Herstellung der Gele erfolgte in Analogie zu den SDS-Gelele (s. VI.3.6.1). Die Ansatzmengen zur Herstellung des Trenn- und Sammelgels für die Nativ-Elektrophorese sind in Tabelle VI.8 aufgelistet:

**Tab. VI.8:** Ansatzmengen zur Herstellung von Sammel- und Trenngel für die Nativ-Elektrophorese

Gel	%T	H <sub>2</sub> O [ml]	Puffer A [ml]	Puffer B [ml]	Lsg. C [ml]	TEMED [µl]	APS- Lsg. [µl]
Sammelgel	5	1,45	-	0,6	0,42	4	14
Trenngel	12	1,75	1,25	-	2,0	10	25

%T Totalacrylamidkonzentration des Gels in Gew.-%

### VI.3.6.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zur IEF-Gelelektrophorese wurde eine horizontale Apparatur bestehend aus einem temperierbaren Keramik-Grundkörper und Graphitelektroden (Serva BlueHorizon Flatbed System) sowie einer externen Spannungsversorgung (Serva BluePower 3000) eingesetzt.

Als Gele kamen 12,5 cm mal 12,5 cm große, 0,15 mm dicke Ampholyt/Polyacrylamid-Fertiggele (Serva Servalyt® Precotes® Wide Range) zum Einsatz. Es wurden Fertiggele mit einem *pH*-Bereich von 3 – 10 verwendet.



*Probenvorbereitung*

Die Proteine wurden in 20 Gew.-%iger wässriger Glycerinlösung auf eine Konzentration von 3 mg/ml gelöst. Die Proteinlösungen wurden entweder direkt oder mit entionisiertem Wasser verdünnt auf das Gel aufgetragen.

*Durchführung*

Das IEF-Gel wurde auf einem dünnen Kerosinfilmenplan auf die über einen Thermostaten (Haake C10-K15) auf 10°C gekühlte Keramikplatte aufgebracht. Zwischen Gel und Elektroden wurden in Anodenlösung (Serva Anode Fluid 3) bzw. in Kathodenflüssigkeit (Serva Cathode Fluid 10) getränkte Elektrodendochte fixiert. Zur Vorfokussierung, d. h. zur Erzeugung des *pH*-Gradienten durch die Ampholyte, wurde eine konstante Stromstärke von 10 mA angelegt. Die Spannung stieg innerhalb einer Stunde kontinuierlich von 150 auf 2500 V. Danach wurden jeweils 8 µl der Probelösungen sowie 8 µl IEF-Marker (Serva Liquid Mix, IEF Markers 3-10) mit Hilfe eines Applikationsstreifens direkt auf das Gel aufgetragen. Der Probenlauf wurde bei einer konstanten Stromstärke von 3 mA betrieben, wobei die Maximalspannung in sieben Stufen von je 20 Minuten Dauer auf 2500 V erhöht wurde. Das Ende der Fokussierung ließ sich an einem Abfall der Stromstärke feststellen.

*Fixierung, Anfärbung der Proteinbanden*

Das Gel wurde aus der Elektrophoreseapparatur entnommen und in ein Fixierbad gelegt. Zur Fixierung der Proteine im Gel wurde eine Lösung aus 10 Gew.-% Trichloressigsäure, 5 Gew.-% Sulfosalicylsäure sowie 85 Gew.-% entionisiertem Wasser verwendet. Die weitere Behandlung der IEF-Gele verlief analog zu der in Abschnitt VI.3.6.1 beschriebenen Methodik.

### VI.3.7 UV/VIS-Absorptionsspektroskopie

Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit einem UV/VIS-Zweistrahlenspektrometer (Perkin-Elmer Lambda 2S bzw. Lambda 19). Als Strahlungsquelle diente eine Wolfram-Halogen-Lampe für den sichtbaren Bereich bzw. eine Deuterium-Lampe für den UV-Bereich. Die Temperierung des Küvettenhalters auf 25°C erfolgte über einen Kryostaten (Haake C Fisons F3). Die in Puffer gelösten Proteine wurden gegen die reine Pufferlösung als Referenz gemessen. Probe- und Referenzlösung wurden über einen 0,45 bzw. 1 µm-Polyester-Membran-Spritzenfilter (membraPure MEMBREX 25 PET) direkt in die zuvor staubfrei gespülten 1 cm-Quarzglasküvetten (Hellma) filtriert.

Vor der eigentlichen Messung wurde jeweils eine Untergrundkorrektur durchgeführt. Dazu wurden Probe- und Referenzküvette mit dem Dispersionsmedium gefüllt. Auf diese Weise werden Unterschiede in den Küvetten sowie Wasserabsorptionsbanden abgeglichen. Die Qualität der Untergrundkorrektur wurde durch eine Messung überprüft. Hier wurden Extinktionsfehler von  $\pm 0,001$  toleriert. Die Spektren wurden in einem Wellenbereich von 200 – 500 nm bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von  $120 \text{ nm min}^{-1}$  aufgenommen. Um die Qualität der Messergebnisse überprüfen zu können, wurden mindestens zwei Spektren aufgenommen. Falls sich keine Abweichungen innerhalb eines Toleranzbereichs von  $\pm 0,001$  in der Extinktion zeigten, wurden die erhaltenen Extinktionswerte gemittelt.

Die vorliegende Proteinkonzentration ergibt sich aus der Extinktion über das Lambert-Beer-Gesetz (Hesse *et al.* 1995, Winter *et al.* 1998) bei Kenntnis des zugehörigen molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten:

$$E(\lambda) = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\lambda) c d \quad (6-6)$$

$E(\lambda)$ :	Extinktion
$I_0$ :	Intensität des in die Probe eintretenden Lichtstrahls
$I$ :	Intensität des aus der Probe austretenden Lichtstrahls
$\varepsilon(\lambda)$ :	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
$c$ :	Proteinkonzentration in $\text{mol l}^{-1}$
$d$ :	Weglänge des Lichtstrahls durch die Probe

Es wurde dabei die Extinktion bei einer Wellenlänge von 278 nm zur Auswertung herangezogen, da hier ein Maximum in den Proteinspektren vorliegt bedingt durch das Absorptionsverhalten der aromatischen Aminosäuren der Proteine. Da beide Größen, Extinktion und molarer dekadischer Extinktionskoeffizient, wellenlängenabhängig sind, muss der Extinktionskoeffizient des betreffenden Proteins ebenfalls bei einer Wellenlänge von 278 nm bestimmt werden. Hierzu wurden Konzentrationsreihen der in Puffermedium gelösten Proteine in mol/l erstellt und die zugehörige Extinktion bei einer Wellenlänge von 278 nm nach obigem Verfahren ermittelt. Aus der Auftragung der Extinktion  $E(278 \text{ nm})$  gegen die Konzentration ergibt sich der molare dekadische Extinktionskoeffizient  $\varepsilon(\lambda)$  aus der Steigung der Regressionsgeraden  $\varepsilon(\lambda) d$ .

Im Falle hoher Proteinkonzentrationen kommt es aufgrund von Aggregat- und Komplexbildung sowie durch Wechselwirkung der Dipolmomente oder Dissoziationsvorgänge zu Abweichungen vom Lambert-Beer-Gesetz. Hier ist die dem Gesetz zugrunde liegende Annahme, dass sich die Extinktion additiv aus den einzelnen Extinktionen der Chromophoren zusammensetzt, nicht mehr erfüllt (Winter *et al.* 1998). Ausgewertet

wurden deshalb nur Extinktionen  $\leq 1,5$ . Bei höheren Extinktionen wurde die Probe entweder entsprechend verdünnt oder die Schichtdicke erniedrigt.

Auch bei Extinktionen  $< 0,2$  zeigten sich teilweise Abweichungen von einer linearen Beziehung zwischen Extinktion und Proteinkonzentration. Letzteres Verhalten war insbesondere bei BSA ausgeprägt und hängt vermutlich mit einer Adsorption von Proteinkomplexen an der Küvettenwand zusammen. Zur Korrektur wurde deshalb in diesen Fällen dieser Beitrag experimentell abgeschätzt und von der gemessenen Extinktion abgezogen. Fallweise wurden zusätzlich Messungen bei höherer Schichtdicke durchgeführt (5 cm Quarzglas-Küvetten), um diesen Effekt im Vergleich zur eigentlichen Messgröße gering halten zu können. Hier wurden dann keine Korrekturabzüge vorgenommen.

Obwohl die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen ausschließlich aus der Extinktion bei einer Wellenlänge von 278 nm erfolgt, wurden die Proteinspektren stets über einen Bereich von 200 – 500 nm aufgenommen. Auf diese Weise lassen sich eventuelle Verunreinigungen der Proben feststellen, welche bei einer Einpunktmessung nicht feststellbar wären.

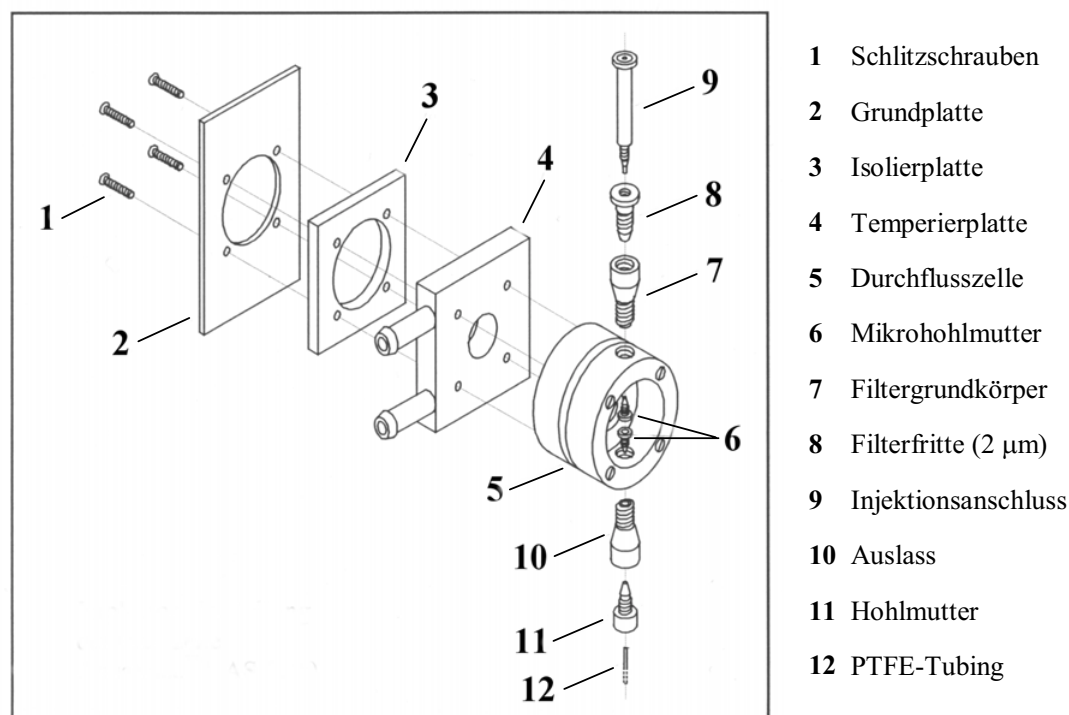
### VI.3.8 Infrarotspektroskopie

Die Analyse der Sekundärstruktur der Proteine erfolgte mittels eines FT-IR-Systems für Proteinanalytik (Bruker Confocheck). Dieses bestehend aus einem Spektrometer (Bruker Optik Tensor 27), einer Calciumfluorid-Flüssigkeitszelle mit 6,5  $\mu\text{m}$  Schichtdicke (Aquaspec<sup>TM</sup> AS 1100 M) und einem hochempfindlichen photovoltaischen MCT-Detektor mit Flüssigstickstoffkühlung. Die Messzelle ist direkt auf einer Temperierplatte befestigt (s. Abb. VI.8), um eine genaue Thermostatierung der Probe zu ermöglichen. Die Temperierung erfolgt über einen Kryostaten (ThermoHaake DC30-K20), welcher über die Messsoftware angesteuert wird. Zur Wärmeisolierung ist die Zelle von einer Teflonummantelung umgeben.

Zur Konformationsanalyse wurden die gefriergetrockneten Proteine in Puffermedium auf eine Konzentration von 10 – 20 mg/ml gelöst. Die Latexpartikel mit darauf adsorbierten Proteinen wurden mit Pufferlösung auf einen Gehalt von 0,5 – 2 Gew.-% an Trägerpartikeln verdünnt. Dies entsprach einer Proteinkonzentration von 5 – 10 mg/ml. Die Aufnahme der FT-IR-Spektren der reinen Trägerpartikel wurde an 1 – 2 Gew.-%igen Suspensionen durchgeführt.

Die Durchflussflüssigkeitszelle wird mit einer 50  $\mu\text{l}$ -HPLC-Spritze befüllt. Probe- und Referenzlösung wurden zuvor über einen 1  $\mu\text{m}$ -Polyester-Membran-Spritzenfilter

(membraPure MEMBREX 25 PET) vorfiltriert. Bevor die Lösung in die eigentliche Messzelle gelangt, durchläuft sie eine 2  $\mu\text{m}$ -Filterfritte. Über diese Vorgehensweise wird sichergestellt, dass keine Staubpartikel oder eventuelle Agglomerate von Latexpartikeln oder Proteinen in die Zelle gelangen, welche aufgrund der geringen Schichtdicke zu einem Verstopfen der Zelle führen könnten.



**Abb. VI.8:** Explosionszeichnung der FT-IR-Messzelle (Aguaspec™ AS 1100 M): Die Durchflusszelle (5) mit 6,5  $\mu\text{m}$  Schichtdicke ist zur Thermostatisierung direkt auf der Temperierplatte (4) fixiert. Der Zelle ist eine Filterfritte mit 2  $\mu\text{m}$  Porenweite vorgeschaltet, um ein Eindringen von Verunreinigungen in die Küvette zu verhindern.

Während der Aufnahme der Spektren wird das Spektrometer mit Stickstoff gespült, um störende Wasserdampf- und Kohlendioxidssignale gering zu halten. Zusätzlich dienen zwei Trocknungskartuschen im Inneren des Spektrometers zur Trocknung der Luft im Strahlengang. Die erhaltenen Spektren wurden zudem einer automatischen Wasserdampfkorrektur (Dousseau *et al.* 1990) unterzogen.

Es wurden jeweils mindestens zwei Messungen von je 64 Scans durchgeführt. Die Fourier-transformierten Daten wurden im Bereich von 400 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  bei einer spektralen Auflösung von 4  $\text{cm}^{-1}$  gespeichert und gemittelt.

Die Ableitung der Sekundärstrukturinformation aus den Spektren erfolgte über die „Quant-2-Analyse“ in der Spektrometersoftware. Diese Methode basiert auf einer Proteindaten-

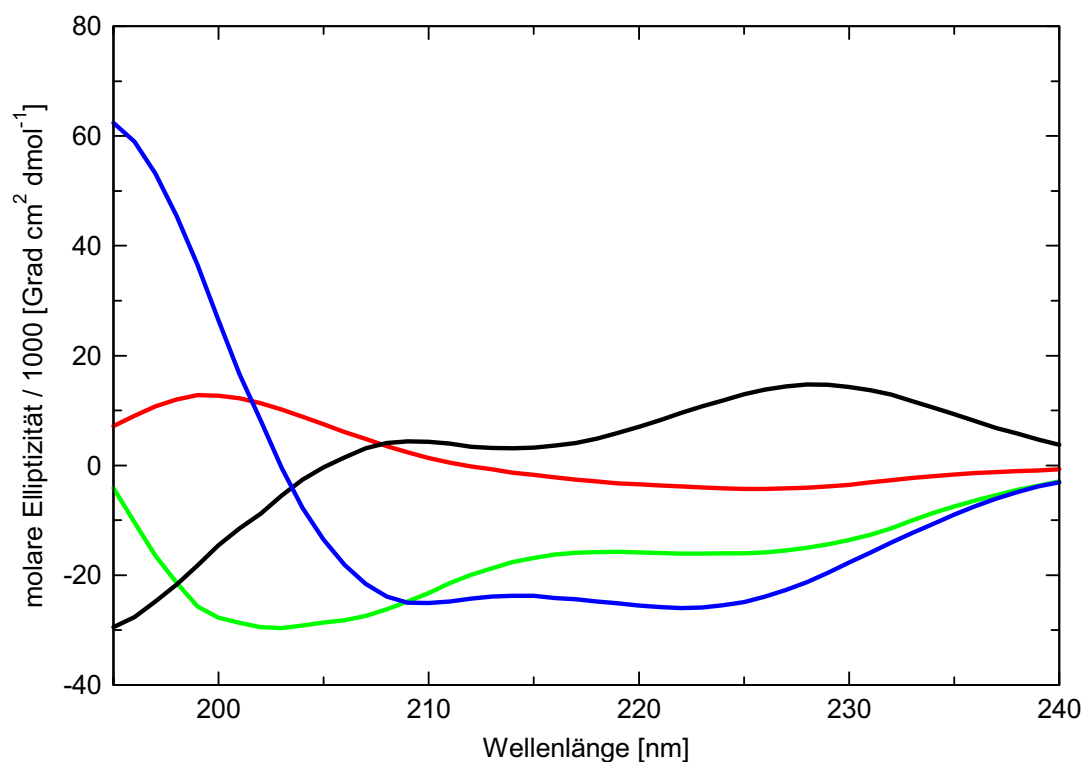
bank (Bruker Optik „Bruker Protein Library“), welche sich aus den Infrarotspektren von 30 Referenzspektren mit bekannter Röntgenstrukturanalyse zusammensetzt (Quelle: „The Protein Databank“ PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>). Die „Quant-2-Analyse“ wurde speziell zur Analyse des  $\alpha$ -Helix- und des  $\beta$ -Faltblattgehaltes optimiert. Die Ableitung dieser beiden Sekundärstrukturelemente erfolgt unter Zuhilfenahme sämtlicher Referenzspektren der Proteinbibliothek über einen PLS (*Partial Least Squares*)-Algorithmus (Haaland *et al.* 1988, Geladi *et al.* 1986). Kreuzvalidierung der Referenzspektren mit Röntgenstrukturdaten der zugehörigen Proteine ergab einen Absolutfehler von 4 % für den Gehalt an  $\alpha$ -Helix sowie 3 % für den  $\beta$ -Faltblattanteil (s. VI.4).

### VI.3.9 Circluardichroismus (CD)

Die CD-Spektroskopie erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Universität Dortmund und wurde dort in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. C. Czeslik durchgeführt.

Die Spektren wurden mit einem Instrument der Firma Jasco (J-715) über einen Wellenlängenbereich von 193 – 250 nm aufgenommen. Es wurden jeweils 25 – 50 Einzelscans bei einer Auflösung von 0,5 nm und einer Aufnahmegeschwindigkeit von 100 nm min<sup>-1</sup> gemittelt. Die Probe wurde in eine 1 mm-Quarzküvette eingebracht, welche über einen Thermostaten temperiert wurde. Das Hintergrundspektrum des reinen Lösungsmittels (10 M MES-Puffer, *pH* 6,1) zeigte eine Nulllinie der Elliptizität im Wellenlängenbereich von 193 – 250 nm.

Die Ableitung der Sekundärstrukturinformation erfolgte unter der Annahme, dass sich das Protein als eine Aneinanderreihung von Regionen mit  $\alpha$ -helikaler,  $\beta$ -Faltblatt-, Schleifen und Zufallsknäuelstruktur beschreiben lässt (s. Abb. VI.9) und sich das CD-Spektrum additiv aus den Einzelbeiträgen dieser Strukturmerkmale zusammensetzt. Die Auswertung basiert auf einem Spektrensatz von 26 globulären Proteinen, welcher in die Beiträge der vier Strukturelemente zerlegt wurde. Über eine „convex constraint“-Analyse (CCA, Programmversion 1.0) wurden die Sekundärstrukturanteile aus den Probespektren abgeleitet (Perczel *et al.* 1991, 1992). Diese Methode beruht nicht auf Röntgenstrukturdaten wie die in Abschnitt VI.3.8 beschriebene Sekundärstrukturanalyse mittels FT-IR, wodurch eine ideale Ergänzung als voneinander unabhängige Methoden ermöglicht wurde (s. Kap. IV.6). Die CD-Experimente wurden mindestens zweifach durchgeführt. Mehrfachmessungen ergaben einen Größtfehler von  $\pm 2$  % ( $\alpha$ -Helix),  $\pm 2$  % ( $\beta$ -Faltblatt),  $\pm 4$  % (Schleifen) sowie  $\pm 4$  % (Zufallsknäuel).



**Abb. VI.9:** Typische Reinkomponentenspektren  $\alpha$ -helikaler (blau),  $\beta$ -Faltblatt- (rot), Schleifen (grün) und Zufallsknäuelstrukturen (schwarz), welche über „convex constraint“-Analyse aus den CD-Spektren erhalten wurden (Perczel *et al.* 1991).

### VI.3.10 Fluoreszenzspektroskopie

Ebenso wie die CD-Spektroskopie erfolgte die statische Fluoreszenzspektroskopie an der Universität Dortmund in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. C. Czeslik am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I. Die kovalente Anbindung der Dansylfluorophore an die Proteinkomplexe erfolgte nach einer Methode von Wang *et al.* (1993) und wurde am Polymerinstitut durchgeführt.

#### *Präparation von Dansyl-gelabeltem BSA*

Dansylchlorid (5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonylchlorid) wurde in 3 ml DMF gelöst und unter Rühren zu einer Lösung von BSA (Fluka) in 0,1 M Phosphatpuffer (*pH* 7,8) langsam zugetropft. Nach vierstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung gegen 0,025 M Phosphatpuffer (*pH* 6,8) dialysiert (Medicell-Dialyseschlauch: Ausschlußgrenze 12000 – 14000 Dalton). Dieser Reinigungsschritt diente der Entfernung

von überschüssigem Dansylchlorid bzw. dessen Hydrolyseprodukt. Der Fortschritt der Reinigung wurde durch Messung der Extinktion der Lösung außerhalb des Dialyseschlauches über einen Wellenlängenbereich von 200 – 500 nm verfolgt.

**Tab. VI.9:** Ansatzmengen zur kovalenten Markierung der BSA-Moleküle mit Dansylfluorophoren

Dansyl-BSA	DanBSA1	DanBSA2
BSA (97 %)	15,46 g (0,224 mmol)	10,31 g (0,149 mmol)
Dansylchlorid (99 %)	61,0 mg (0,224 mmol)	56,2 mg (0,208 mmol)
Phosphatpuffer <i>pH</i> 7,8	190 ml	200 ml
Molverhältnis Dansylchlorid zu BSA (Ansatz)	1 : 1	1,4 : 1
Molverhältnis Dansyllabel zu BSA	1 : 1	1,2 : 1
Proteingehalt		
N-Gehalt	94 %	90 %
UV/VIS-Spektroskopie	97 %	95 %

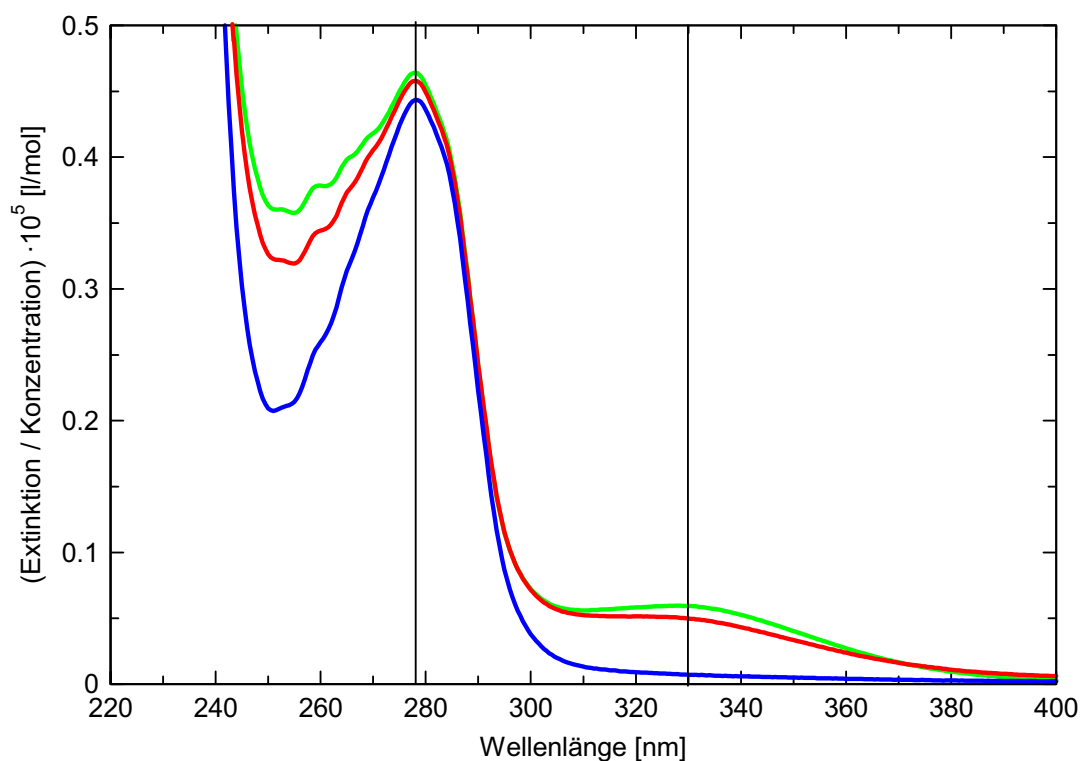
Nach Gefriertrocknung wurde der Proteingehalt der Proben über ihren Stickstoffgehalt (s. VI.2.5) ermittelt. Die Eduktmengen der beiden Reaktionsansätze, die sich im molaren Verhältnis von Dansylchlorid zu BSA unterscheiden, der erhaltene Markierungsgrad sowie der Proteingehalt sind in Tabelle VI.9 aufgeführt.

Die Bestimmung der mittleren Zahl der pro BSA-Molekül gebundenen Dansylfluorophore erfolgte aus den UV/VIS-Absorptionsspektren (s. Abb. VI.10) der beiden Proben (Wang *et al.* 1993). Zur Auswertung wurden die Extinktionen bei 278 nm (BSA:  $\epsilon_{BSA}(278 \text{ nm}) = 44.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , Giancola *et al.* 1997) bzw. 330 nm (Dansyl:  $\epsilon_{Dansyl}(330 \text{ nm}) = 3.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , Winter *et al.* 1998) herangezogen. Da BSA ebenfalls einen signifikanten Beitrag zur Extinktion bei 330 nm liefert (s. Abb.VI.10) wurde der BSA-Beitrag über ein Referenzspektrum des reinen Proteins bestimmt und bei der Auswertung entsprechend berücksichtigt. Die Bestimmung des BSA-Anteils aus der Bande bei 278 nm erfolgte ohne Korrektur, da die Dansylabsorption hier nur einen geringfügigen prozentualen Anteil spielt. Hierdurch wird aber ein leicht höherer Proteingehalt im Vergleich zur Stickstoffgehaltsanalyse erhalten (s. Tab. VI.9).

#### Statische Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten mit einem Instrument der Firma ISS (Champaign), welches auf Photonenzähltechnik basiert. Die Dansyllabel des Proteins wurden mit monochromatischem Licht einer Wellenlänge von 340 nm angeregt, welches von einer Xenon-

bogenlampe emittiert wurde. Die Fluoreszenzspektren wurden über einen Wellenlängenbereich von 370 - 650 nm aufgenommen. Die Fluoreszenzemissionsscans wurden auf die Intensität des einfallenden Lichts normiert und auf die Wellenlängen-abhängige Antwort des Detektors korrigiert. Hintergrundspektren der Pufferlösung sowie der Latexsuspension wurden aufgezeichnet und entsprechend von den Probespektren subtrahiert. Die Auswertung der Spektren erfolgte über eine Software aus dem Hause Galactic (Grams).



**Abb. VI.10:** Absorptionsspektren der Proben DanBSA1 (rot) und DanBSA2 (grün) im Vergleich zu einem Spektrum von unmarkiertem BSA (blau). Sämtliche Spektren sind auf die Proteinkonzentration normiert.

Bei einem stöchiometrischen Ansatzverhältnis von Dansylchlorid zu BSA wurde das Fluorophor nahezu komplett in das Protein eingebaut (s. Tab. VI.9), während *Wang et al.* (1993) einen Bindungsgrad von 60 % erzielten.



## VI.3.11 Laser-Scanning-Konfokalmikroskopie (LSCM)

Bei der konfokalen Mikroskopie wird ein Laserstrahl auf einen Punkt des Untersuchungsobjekts fokussiert (Winter *et al.* 1998) und mit Hilfe eines beweglichen Spiegels Punkt für Punkt und Zeile für Zeile über die Probenoberfläche gerastert. In der Regel wird das Untersuchungsobjekt wie im vorliegenden Fall fluoreszenzmarkiert. Der Laserstrahl gelangt durch eine Lochblende (*pinhole*) zu einem Strahlteiler (*beam splitter*) und wird mittels eines Objektivs auf die Probe fokussiert (s. Abb. VI.11).

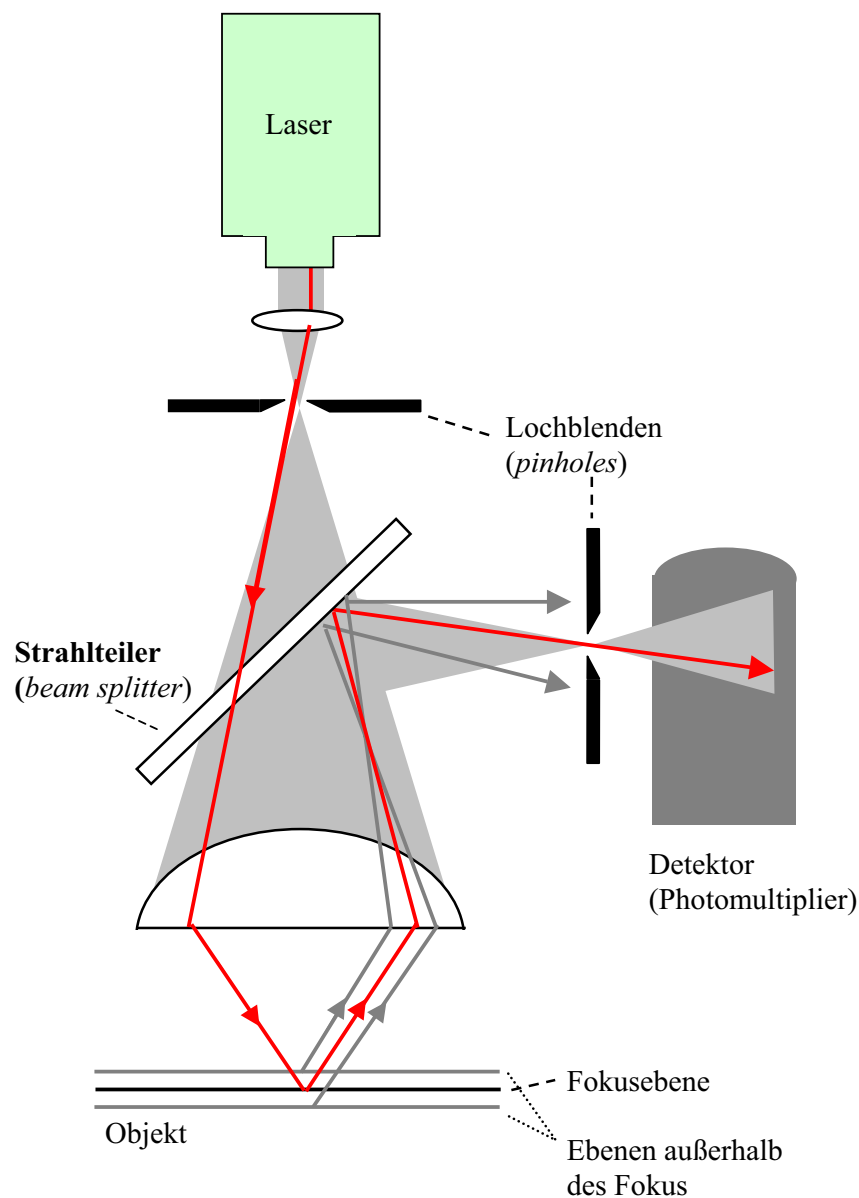


Abb. VI.11: Strahlengang bei der Laser-Scanning-Konfokalmikroskopie (LCSM)

Das gesamte, von der Probe kommende Licht (reflektiertes und gestreutes Laserlicht, Fluoreszenzlicht etc.) wird vom Objektiv eingesammelt, von dem Strahlteiler reflektiert und tritt durch ein weiteres *pinhole*, das lediglich die achsnahen (parallel zur optischen Achse verlaufenden) Strahlen passieren lässt. Dadurch kommt ausschließlich die aufgrund der Verwendung einer monochromatischen Lichtquelle eindeutig definierte Fokalebene zur Abbildung. Anschließend wird das Licht durch ein dispersives Element spektral zerlegt und trifft auf den Eingangsspalt eines Photomultipliers, dessen Spaltweite variiert werden kann. Es ist daher möglich, die Lichtintensität eines beliebigen Wellenlängenbereichs aus dem Spektrum integrativ zu erfassen und jedem abgerasterten Punkt zuzuordnen. Per Computer werden die am Photomultiplier erhaltenen elektrischen Signale in einem Monitorbild zusammengesetzt.

Die konfokalmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Gerät der Firma Leica (RXME-Mikroskop mit einem TCS SP2-x1-Scankopf) am Institut für Nanotechnologie (INT) des Forschungszentrums Karlsruhe durchgeführt (s. Kap. IV.7). Der Versuchsaufbau umfasste drei der oben beschriebenen synchron auslesbaren Photomultipliereinheiten, wobei die erfassbaren Wellenlängenbereiche der Detektoren unabhängig variiert und die Intensitäten dieser Bereiche simultan erfasst werden konnten. Mit Hilfe dieser Technik war es möglich, das von der Probenoberfläche reflektierte Laserlicht sowie die rotverschobene Fluoreszenzstrahlung separat und simultan zu erfassen. Über eine zuschaltbare Faserauskopplung unmittelbar vor dem dispersiven Element bestand die Möglichkeit, das Licht in ein Spektrometer einzukoppeln und so zu jedem Punkt der Probe die zugehörige spektrale Information zu erhalten.

### VI.3.12 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Die in Kapitel IV.8 beschriebenen Messungen mit der Röntgenkleinwinkelstreuung wurden von Frau E. Breininger und Herrn Dr. J. Bolze am Polymerinstitut durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch Herrn Dr. N. Dingenouts, Frau E. Breininger und Frau Dr. S. Rosenfeldt.

Zu den Messungen wurde eine modifizierte Kratky-Kompakt-Kamera (Eigenbau) mit Blockkollimationssystem eingesetzt (s. Abb. VI.12). Der experimentelle Aufbau setzte sich aus einem Röntgengenerator (Siemens Kristalloflex 710H), einer Röntgenröhre (Siemens K FL mit Kupferanode), dem evakuierten Kameragehäuse sowie einem ortsempfindlichen Detektor (Braun OED-50m-2160991) zusammen. Der Röntgenstrahl wies eine Wellenlänge von 0,154 nm ( $\text{Cu-K}_{\alpha}$ -Strahlung) auf. Betrieben wurde die Röntgenröhre bei einer Spannung von 35 kV sowie einem Anodenstrom von 30 mA. Die Betriebstemperatur

wurde über Wasserkühlung auf 20°C gehalten. Eine detaillierte Beschreibung von Kamera, Messung sowie der Entschmierung der erhaltenen Streuintensitäten wurde von Dingenouts *et al.* (1998) publiziert.

Um sicherzustellen, dass die Protein-haltigen Proben bei den 15 - 20 stündigen Messungen keinen Strahlungsschäden unterliegen, wurden zusätzlich Kurzzeitmessungen durchgeführt. Da sich jeweils eine gute Übereinstimmung mit den Langzeitstudien zeigte, konnten Strahlungsschäden ausgeschlossen werden.

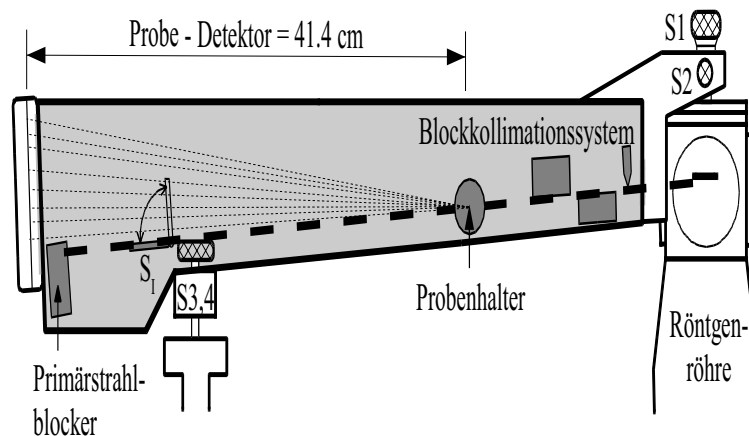


Abb. VI.12: Schematische Darstellung der modifizierten Kratky-Kompaktkamera

Neben der Messung der zu untersuchenden Proben wurde die Streuung der leeren und einer mit dem Dispersionsmedium bzw. der Pufferlösung gefüllten Kapillare bestimmt. Über eine Untergrundkorrektur erhält man die von der reinen Teilchenstreuung stammende Intensität  $I(q)$  (Müller 1990):

$$I(q) = I_L(q) - (1 - \phi) I_D(q) - \phi I_V(q) \quad (6-7)$$

- $I_L(q)$ : Streuintensität der mit Latex gefüllten Kapillare
- $I_D(q)$ : Streuintensität der mit Pufferlösung gefüllten Kapillare
- $I_V(q)$ : Streuintensität der leeren Kapillare
- $\phi$ : Volumenbruch der Teilchen bezogen auf das Probevolumen

Aufgrund der deutlichen Unterschiede der Streuintensitäten  $I_L(q)$ ,  $I_D(q)$  und  $I_V(q)$  war eine Auswertung über den gesamten erfassten Streuvektorbereich möglich. Die Berechnung des Volumenbruches  $\phi$  der untersuchten Spezies erfolgte über die Teilchendichte, welche nach der in Kapitel VI.3.13 beschriebenen Methodik bestimmt wurde.

### VI.3.13 Sonstige Methoden

#### *Bestimmung der Teilchendichten:*

Die Teilchendichten der Kern- und Kern-Schale-Latices wurden mittels eines Schwingzeitmessgerätes der Firma Paar (DMA-602) bei 25°C ermittelt. Hierzu wurden Konzentrationsreihen in Gew.-% des jeweiligen Latex erstellt und die Dichten der verschiedenen Proben gemessen. Die erhaltenen Dichten wurden gegen die zugehörigen Konzentrationen in g/cm<sup>3</sup> aufgetragen. Aus der Steigung der Regressionsgeraden und der Dichte des Dispersionsmediums lässt sich die Feststoffdichte der Latexteilchen in Lösung berechnen.

#### *Leitfähigkeitsmessung:*

Zur Bestimmung der Leitfähigkeit der Dispersionen, Puffer- und Elektrolytlösungen, wurde ein Leitfähigkeitsmessgerät der Firma WTW (LF 537) eingesetzt.

#### *Ionenaustausch:*

Vor der Charakterisierung des PS-co-AA-Latex PSAA mittels konduktometrischer Titration der Acrylsäuregruppen wurde die Dispersion über dem Kationenaustauscher Amberlite 200 (Fluka) und dem Anionenaustauscher Amberlite IRA-900 (Fluka) gereinigt. Die Ionenaustauscher wurden vor ihrer Verwendung getrennt gereinigt. Dabei wurde folgender Waschzyklus gewählt (Pulina 1995): 30 %ige HCl, heißes entionisiertes Wasser, Methanol, kaltes entionisiertes Wasser, 15 %ige NaOH, heißes entionisiertes Wasser, Methanol, kaltes entionisiertes Wasser. Dieser Zyklus wurde viermal durchlaufen, wobei im Falle des Kationenaustauschers nur ein halber Zyklus im letzten Durchgang erfolgte, so dass dieser in protonierter Form vorlag. Vor der intensiven Spülung mit kaltem entionisiertem Wasser wurde der Ionenaustauscher jeweils 20 Minuten über kaltem Wasser stehengelassen. Die abschließende Reinigung mit kaltem Wasser erfolgte solange, bis eine Leitfähigkeit des Spülwassers von unter 3 µS/cm erreicht wurde.

Nach diesem Reinigungsprozess wurden jeweils 8 g Kationen- und Anionenaustauscher als Mischbett zu 100 ml 7 Gew.-%iger Dispersion zugesetzt. Die Mischung wurde mehrere Tage im Kühlschrank unter gelegentlichem Schwenken gelagert. Danach wurde der Tauscher durch Filtration über Glaswolle abgetrennt.

#### *Gelpermeationschromatographie (GPC):*

Die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der abgespaltenen Polyacrylsäureketten (s. Abb. IV.14) mittels Gelpermeationschromatographie (Laufmittel: 0,2 M NaNO<sub>3</sub>-Lösung, Trennsäulen: 3 × ViscoGEL GMPWXL (*mixed bed*), Flussrate: 0,8 ml/min) wurde über ein externes Analysenlabor (Viscothek GmbH) durchgeführt. Die Messdaten wurden

über Dreifachdetektion (Brechungsindex, Viskosität und Lichtstreuung) ausgewertet. Die zur Auswertung über Lichtstreuung notwendigen Brechungsindexinkremente ( $dn/dc$ ) wurden auf Basis der Einwaagekonzentration aus den Brechungsindex-Chromatogrammen ermittelt.

#### VI.4 Fehlerbetrachtung

Die in dieser Arbeit bestimmten Größen sind mit Fehlern behaftet, die auf unterschiedlichen Ursachen beruhen. Eine der Hauptfehlerquellen liegt dabei in der Probenherstellung. Dies ist vor allem auf die Reinigung und die Einwaagen zurückzuführen. Weitere Fehler liegen in der Messmethode selbst begründet. In diesem Zusammenhang sind apparative Fehler wie Messungenauigkeiten, Temperierfehler oder Justierfehler zu nennen. Aber auch Vereinfachungen bei der Auswertung und die Eignung der Methode für das untersuchte System bzw. für die untersuchte Fragestellung haben einen entscheidenden Einfluss auf den Fehler. Da sich bei einem Teil der durchgeführten Untersuchungen nicht alle Fehlerquellen quantifizieren lassen, war in diesen Fällen eine Fehlerabschätzung basierend auf Mehrfachmessungen erforderlich.

Die in Kapitel IV vorgestellten experimentellen Resultate sind zumeist direkt mit Fehlerangaben versehen. In den übrigen Fällen sei auf die folgende Betrachtung verwiesen.

##### *Feststoffgehaltsbestimmung:*

Es erfolgte eine statistische Fehlerbetrachtung. Hierzu wurde der Feststoffgehalt der einzelnen Latexprouben mehrmals bestimmt, der Mittelwert gebildet und eine Standardabweichung von 0,01 Gew.-% erhalten. Der Einwaagefehler ist demgegenüber vernachlässigbar. Der relative Fehler liegt somit je nach Größe des Feststoffgehalts zwischen 0,4 % und 1 %.

##### *Dichtebestimmungen:*

Die Fehler bei den in Kapitel IV.2 beschriebenen Dichtemessungen sind in erster Linie auf Einwaagefehler und den oben erwähnten Fehler bei der Feststoffgehaltsbestimmung zurückzuführen. Demgegenüber kann die Messungenauigkeit des Schwingzeitmessgerätes vernachlässigt werden, da eine Mittelung von jeweils 10 - 15 Einzelmessungen pro Probe erfolgte. Der Fehler der mittels linearer Regression erhaltenen Teilchendichten beträgt  $\pm 0,005$  g/ml.

### *Scheibenzentrifuge (DCP), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM):*

Norhausen und Weiss untersuchten ebenfalls sterisch stabilisierte Latices bezüglich ihrer Teilchengröße und Teilchengrößenverteilung mit Hilfe der Scheibenzentrifuge und der Transmissionselektronenmikroskopie (Norhausen 1997, Weiss 1998). In diesen Arbeiten wurden Fehlerabschätzungen beider Methoden durchgeführt. Der relative Fehler bei der Messung der Teilchengröße und der Teilchengrößenverteilung wurde bei beiden Methoden mit 5 % angegeben.

### *Dynamische Lichtstreuung (DLS):*

Bei den hier durchgeführten Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung können sich Fehler zum einen durch Abweichungen von der Messtemperatur, Agglomeratanteile in der Suspension sowie durch Mehrteilchendiffusion ergeben. Des weiteren kann aufgrund der Polydispersität der Latices ein Fehler durch die Messung bei einem festen Streuwinkel resultieren.

Infolge der intensiven Reinigung und Filtration der Latexprouben lassen sich Fehler durch Agglomeratanteile ausschließen. Weiterhin kann von einer Einteilchendiffusion ausgegangen werden, da bei Messungen von Latexprouben verschiedener Konzentration keine Konzentrationsabhängigkeit der erhaltenen Messergebnisse auftrat. Die Latexprouben sind bezüglich ihrer Partikelgrößen sehr eng verteilt. Folglich sollte die Auswertung der Messdaten bei einem festen Streuwinkel mit der Kumulantenmethode nur zu geringfügigen Abweichungen führen (Norhausen 1997). Somit bleibt als Hauptfehlerquelle bei dieser Methode die Temperierung der Messzelle auf die jeweilige Messtemperatur übrig.

Zur Fehlerangabe erfolgte eine statistische Betrachtung. Hierbei wurde der hydrodynamische Radius der Latexteilchen mehrmals gemessen. Im Falle der kompakten PS- und PS-co-HMEM-Partikel wurde dabei eine Standardabweichung von 1 nm vom Mittelwert erhalten. Bei den Kern-Schale-Partikel beträgt der Fehler 2 nm nach intensiver Reinigung der Suspension (s. VI.1.6).

### *Gelelektrophorese*

Eine Hauptfehlerquelle bei der Gelelektrophorese mit Polyacrylamidgelen stellen Inhomogenitäten des Gelnetzwerks dar, welche zu einer Verschiebung der Wanderungsfront der Banden führen. Im Falle der SDS-Gelelektrophorese waren derartige Effekte teilweise am Rand des Gels zu beobachten. Bei der isoelektrischen Fokussierung hängt die Qualität der Methode entscheidend von einer möglichst störungsfreien Ausbildung des *pH*-Gradienten im Gel ab, was wiederum wesentlich von Netzwerkinhomogenitäten bzw. Verunreinigungen beeinflusst werden kann. Bei der quantitativen Auswertung des Gellaufs kommen Ungenauigkeiten bei der exakten Festlegung der Position der Gelbanden sowie Ablesefehler bei der Vermessung des Gels hinzu. Geht man von einem absoluten Ablesefehler bei der Lokalisierung der Proteinbanden von einem Millimeter aus, ergibt sich ein

Absolutfehler von 0,1 bei der Bestimmung des isoelektrischen Punkts. Der Relativfehler bei der Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine bei der SDS-PAGE beträgt unter dieser Annahme 5 % bei Molekulargewichten von 13 kDa steigt bis zu 20 % an bei Molekulargewichten von 130 kDa (geringere Wanderungsstrecke).

#### *Adsorptionsisothermen*

Die Menge an adsorptiv auf den *brushes* gebundenem Protein wird indirekt über die Extinktion des freien Proteins in Lösung bestimmt (s. VI.2.2), welches zuvor mittels Ultrafiltration abgetrennt wird. Die Extinktionsfehler sind gegenüber eventuellen Verlusten an Protein bei der Abtrennung vernachlässigbar. Letztere können durch eine unvollständige Abtrennung des freien Proteins, Adsorption des Proteins an der Ultrafiltrationszelle oder auf der Membrane sowie Verlusten bei der Filtration der Proteinlösungen über einen Spritzenvorsatzfilter vor der Extinktionsmessung verursacht werden. Um diesen Punkten Rechnung zu tragen, wurden definierte Proteinmengen in Pufferlösung derselben Ultrafiltrationsmethodik unterzogen wie die Protein-haltigen Suspensionen. Je nach Protein konnten 95 – 98 % der eingesetzten Proteinmenge nach der Ultrafiltration in der abgetrennten Lösung nachgewiesen werden. Die Verluste an freiem Protein wurden bei der Ermittlung des Adsorptionsgrads auf den *brushes* entsprechend berücksichtigt.

Die Angabe eines Absolutfehlers des Adsorptionsgrads ist relativ schwierig, da er von zahlreichen Faktoren beeinflusst wird. Im Falle geringer Adsorptionsgrade ist die Bindung des Proteins an die *brushes* relativ schwach, weswegen die Adsorptionsergebnisse an Reproduzierbarkeit verlieren und relativ stark von äußeren Einflüssen abhängen. Bei einer sehr hohen Affinität des Proteins zu den *brushes*, beispielsweise im Falle der Adsorption von BSA auf *quenched brushes*, wird das Protein nahezu quantitativ gebunden. Die Konzentration des freien Proteins in Lösung und damit die Abszisse der Adsorptionsisothermen liegt daher im Bereich des experimentellen Fehlers.

Die Adsorptionsisothermen wurden einer Fit-Anpassung nach Gleichung 3-7 bzw. 3-10 unterzogen. Der Fehler des Fitparameter  $\tau_{ads,M}$  kann als Maß für den Fehler im Adsorptionsgrad der zugehörigen Messreihe herangezogen werden.

#### *Sekundärstrukturanalyse*

Die Ableitung der Sekundärstrukturinformation aus den FT-IR-Spektren stützt sich auf einen Datensatz von Referenzspektren 30 verschiedener Proteine bekannter Röntgenstruktur. Zur Bestimmung des Fehlers des  $\alpha$ -Helix- bzw.  $\beta$ -Faltblattgehaltes der untersuchten Proteine wurde eine Kreuzvalidierung über die Messsoftware durchgeführt. Hierbei werden die Anteile der jeweiligen Sekundärstrukturelemente jedes Referenzproteins durch PLS-Analyse (Haaland *et al.* 1988, Geladi *et al.* 1986) über den Satz der übrigen 29 Referenzspektren bestimmt. Die dabei erhaltenen Werte wurden gegen die entsprechenden Werte aus einer Proteindatenbank („The Protein Databank“ PDB,

<http://www.rcsb.org/pdb/>) aufgetragen. Der experimentelle Fehler wurde als Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung der Werte von der Winkelhalbierenden erhalten.

Die in Tabelle IV.16 aufgeführten Fehler der Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie wurden über eine Größtfehlerabschätzung anhand von Mehrfachmessungen durchgeführt. Die Abweichung der Wurzel der mittleren Fehlerquadrate zwischen den gemessenen CD-Spektren und den aus den Einzelkomponentenspektren der Strukturmerkmale berechneten Spektren erwiesen sich mit Werten von maximal 5,0 (s. Tab. IV.16) als relativ klein. Generell gelten Werte unter 10 als akzeptabel (Czeslik *et al.* 2004).

### *Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS):*

Der statistische Fehler der Streuintensitäten berechnet sich aus der Zählrate  $N$  zu  $\sigma = \sqrt{N}$ . Das Auswertprogramm berücksichtigt den statistischen Fehler sowohl beim Untergrundabzug, als auch bei der Bestimmung der Primärintensität automatisch. Von den apparativen Fehlern erfasst das Programm zudem die Totzeiten des Detektors. Ungenauigkeiten in der Detektorposition sowie im Schwerpunkt des Primärstrahls bleiben hingegen unberücksichtigt.

Der Fehler bei der Bestimmung der Teilchenradien wird entscheidend von dem zur Beschreibung der Partikelmorphologie eingesetzten Modell bestimmt. Im Falle eines steil abfallenden Modells der Elektronendichte ergibt sich ein Fehler des Teilchenradius von 2 % (Norhausen 1997).



## VII Literatur

- Al-Duri, B.; Yong, Y. P. *Biochemical Engineering Journal* **2000**, *4*, 207.
- Andersson, M. M.; Hatti-Kaul, R. *J. of Biotechnology* **1999**, *72*, 21.
- Andrade, J. D., in *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*, Andrade, J. D. (Hrsg.), Vol. 2 (Protein Adsorption), Plenum, New York, 1985.
- Aleshin, A. E.; Hoffman, C.; Firsov, L. M.; Honzatko, R. B. *J. Mol. Biol.* **1994**, *238*, 575.
- Arai, T.; Norde, W. *Colloids and Surfaces* **1990**, *51*, 1.
- Azioune, A.; Chehimi, M. M.; Miksa, B.; Basinska, T.; Slomkowski, S. *Langmuir* **2002**, *18*, 1150.
- Bajpai, A. K.; Shrivastava, M. *J. Macromol. Sci.* **2001**, *A38 (11)*, 1123.
- Ballauff, M. *Cur. Op. Colloid Polym. Sci.* **2001**, *6*, 132.
- Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN 46038-2886, TechNote 201 (www.bangslabs.com): *Working with Microspheres*, **1999**.
- Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN 46038-2886, TechNote 205 (www.bangslabs.com): *Covalent Coupling*, **1999**.
- Baron, M.-H.; Revault, M.; Servagent-Noinville, S.; Abadie, J.; Quiquampoix, H. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *214*, 319.
- Bewley, M. C.; Qin, B. Y.; Jameson, G. B.; Sawyer, L.; Baker, E. N. *International Dairy Federation* **1997**, *S.I: 9702*, 100.
- Borrega, R.; Tribet, C.; Audebert, R. *Macromolecules* **1999**, *32*, 7798.
- Bowen, W. R.; Hughes, D. T. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *158*, 395.
- Brandrup, J.; Immergut, E. H. *Polymer Handbook*, 2<sup>nd</sup> Ed., John Wiley & Sons Inc. New York, 1975.
- Brownlov, S.; Morais Cabral, J. H.; Cooper, R.; Flower, D. R.; Yewdall, S. J.; Polikarpov, I.; North, A. C. T.; Sawyer, L. *Structure* **1997**, *5(4)*, 481.
- Brunauer, S.; Emmet, P. H.; Teller, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309.
- Cantarero, L. A.; Butler, J. E. Osborne, J. W. *Anal. Biochem.* **1980**, *105*, 375.
- Carter, D. C.; Ho, J. X. *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 153.
- Caruso, F.; Fiedler, H.; Haage, K. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *169*, 287.
- Caruso, F.; Schüler, C. *Langmuir* **2000**, *16*, 9595.
- Caruso, F.; Schüler, C. *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 750.
- Caruso, F.; Trau, D.; Möhwald, D.; Renneberg, R. *Langmuir* **2000**, *16*, 1485.
- Chatani, E.; Hayashi, R. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *92 (2)*, 98.

- Chatterjee, S.; Chowdhury, R.; Bhattacharya, P. *Biochemical Engineering Journal* **2000**, *5*, 77.
- Choi, S.-W.; Yoon, J.-Y.; Haam, S.; Jung, J.-K.; Kim, J.-H.; Kim, W.-S. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *228*, 270.
- Christensen, T.; Svensson, B.; Sigurskjold, B. W. *Biochemistry* **1999**, *38*, 6300.
- Chu, B. *Laser light scattering*, 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press London, 1991.
- Czeslik, C.; Winter, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 235.
- Czeslik, C.; Royer, C.; Hazlett, T.; Mantulin, W. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 2533.
- Dalmia, B. K.; Nikolov, Z. L. *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 982.
- Das, B.; Guo, X.; Ballauff, M. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **2002**, *121*, 34.
- Decher, G. *Science* **1997**, *277*, 1232.
- Deike, I.; Ballauff, M.; Willenbacher, N.; Weiss, A. *J. Rheol.* **2001**, *45* (3), 709.
- Devon, M.; Meyer, E.; Provder, T.; Rudin, A. Weiner, B. B.; *ACS Symp. Ser.* **1991**, *472*, 155.
- Dikov, M. M.; Osipov, A. P.; Egorov, A. M.; Karulin, A. Y.; Mustafayev, M. I.; Kabanov, V. A. *J. of Solid-Phase Biochem.* **1980**, *5*, 1.
- Dingenouts, N.; Pulina, T.; Ballauff, M. *Macromolecules* **1994**, *27* (21), 6133.
- Dingenouts, N.; Ballauff, M. *Acta Polym.* **1998**, *49*, 178.
- Dingenouts, N.; Merkle, R.; Guo, X.; Narayanan, T.; Goerigk, G.; Ballauff, M. *J. Appl. Cryst.* **2003**, *36*, 578.
- Dorman, L. C. *Method for forming an amide bond between a latex and protein*, USPat. 4,045,384 (1977).
- Dousseau, F.; Pézolet, M. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8771.
- Elgersma, A. V.; Zsom, R. L. J.; Norde, W.; Lyklema, J. *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, *138*(1), 145.
- Fabian, H.; Schultz, C. P. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis in Encyclopedia of Analytical Chemistry* **2000**, 5779.
- Fabian, H.; Schultz, C. P.; Naumann, D.; Landt, O.; Hahn, U.; Saenger, W. *J. Mol. Biol.* **1993**, *232*, 967.
- Fragneto, G.; Su, T. J.; Lu, J. R.; Thomas, R. K.; Rennie, A. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 5214.
- Geladi, P.; Kowalski, B. R. *Anal. Chem. Acta* **1986**, *185*, 1.
- Geluk, M. A.; Norde, W.; Van Kalsbeek, H. K. A. I.; Van't Riet, K. *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 748.
- Giacomelli, C. E.; Norde, W. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *233*, 234.
- Giancola, C.; De Sena, C.; Fessas, D.; Graziano, G.; Barone, G. *International Journal of Biological Macromolecules* **1997**, *20*, 193.
- Gilbert, R. G. *Emulsion Polymerization: a Mechanistic Approach*, Academic Press Inc. London, 1995.

- Glatter, O.; Kratky, O. *Small Angle X-ray Scattering*, 2. Auflage, Academic Press Inc. London, 1983.
- Green, R. J.; Hopkinson, I.; Jones, R. A. L. *Langmuir* **1999**, *15*, 5102.
- Guinier, A.; Fournet, G. *Small Angle Scattering of X-rays*, John Wiley & Sons Inc. New York, 1955.
- Guo, X.; Ballauff, M.; *Langmuir* **2000**, *16*, 8719.
- Guo, X.; Ballauff, M.; *Phys. Rev. E.* **2001**, *64*, 051406.
- Guo, X.; Weiss, A.; Ballauff, M. *Macromolecules* **1999**, *32*, 6043.
- Haaland, D. M.; Thomas, E. V. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1193.
- Hager, H. J. *Latex polymer reagents for diagnostic tests*, USPat. 3,857,931 (**1974**).
- Halperin, A. *Langmuir* **1999**, *15*, 2525.
- Hariharan, R.; Biver, C.; Mays, J.; Russel, W. B. *Macromolecules* **1998**, *31*, 7506.
- Hartmeier, W. *Immobilisierte Biokatalysatoren*, Springer-Verlag Berlin, 1986.
- Hattori, T.; Hallberg, R.; Dubin, P. L. *Langmuir* **2000**, *16*, 9738.
- Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1995.
- Heyn, M. P.; Blume, A.; Rehorek, M.; Dencher, N. A. *Biochemistry* **1981**, *20*, 7109.
- Hunter, A. K.; Carta, G. *J. of Chromatography A* **2001**, *930*, 79.
- Inbar, L.; Miller, I. R. *Biochimica et Biophysica Acta* **1976**, *452*, 421.
- Iwata, H.; Saito, K.; Furusaki, S. *Biotechnol. Prog.* **1991**, *7*, 412.
- Jackler, G.; Steitz, R.; Czeslik, C. *Langmuir* **2002**, *18*, 6565.
- Jackler, G.; Wittemann, A.; Ballauff, M.; Czeslik, C. *Spectroscopy*, im Druck (**2004**).
- Jeon, S. I.; Lee, L. H.; Andrade, J. D.; de Gennes, P. G. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 149.
- Jin, W.; Shi, X.; Caruso, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8121.
- Jusufi, A.; Likos, C. N.; Löwen, H. *J. Chem. Phys.* **2002**, *116(24)*, 11011.
- Kalnin, N. N.; Baikalov, I. A.; Venyaminov, S. Y. *Biopolymers* **1990**, *30*, 1273.
- Kawaguchi, H. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 1171.
- Kawaguchi, H.; Amagasa, H.; Hagiya, T.; Rimura, N.; Ohtsuka, Y. *Colloids and Surfaces* **1985**, *13*, 295.
- Kawai, T.; Nakamura, M.; Sugita, K.; Saito, K.; Sugo, T. *Biotechnol. Prog.* **2001**, *17*, 872.
- Kawai, T.; Sugita, K.; Saito, K.; Sugo, T. *Macromolecules* **2000**, *33*, 1306.
- Kennedy, J. F.; Melo, E. H. M. *Chemical Engineering Progress* **1990**, *86*, 81.
- Kiefhaber, Th.; Baldwin, R. L. *Biophysical Chemistry* **1996**, *59*, 351.
- Kim, M.; Sasaki, M.; Saito, K.; Sugita, K.; Sugo, T. *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14*, 661.
- Kim, J.-H.; Yoon, J.-Y. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science* **2002**, 4373.
- Kim, Y. S. *Dissertation*, Universität Karlsruhe (TH), 1993.
- Klostergaard, H.; Pasternak, R. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5671.

- Koguma, I.; Sugita, K.; Saito, K.; Sugo, T. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 456.
- Kotelnikova, N. E.; Lashkevich, O. V.; Panarin, E. F. *Macromol. Symp.* **2001**, *166*, 147.
- Kralchewsky, P. A.; Nagayama, K. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2000**, *85*, 145.
- Krisdhasima, V.; Vinaraphong, P.; McGuire, J. *Colloid Interface Sci.* **1993**, *161*, 325.
- Kulkarni, A. P.; Mehrotra, K. N. *Anal. Biochem.* **1970**, *38* (1), 285.
- Kunze, U. R.; Schwedt, G. *Grundlagen der qualitativen und quantitativen Analyse*, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1995.
- Langer, G. *Colloid Polym. Sci.* **1979**, *257*, 522.
- La Rosa, C.; Milardi, D.; Fasone, S.; Grasso, D. *Thermochim. Acta* **1994**, *235*, 231.
- Lee, J. H.; Yoon, J.-Y.; Kim, W.-S. *Biomed. Chromatogr.* **1998**, *12*, 330.
- Lee, S. H.; Ruckenstein, E. J. *Colloid Interface Sci.* **1988**, *125* (2), 365.
- Lewis, D.; Whateley, T. L. *Biomaterials* **1988**, *9*, 71.
- Ludikhuyze, L.; Van den Broeck, I.; Weemaes, C.; Hendrickx, M.; Tobback, P. *Food Technology* **1997**, *11*(3), 241.
- Lunelli, L.; Zuliani, P.; Baldini, G. *Biopolymers* **1994**, *34*, 747.
- Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T.; *Thin Solid Films* **1996**, *284-285*, 797.
- Lvov, Y.; Caruso, F. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4212.
- Lyster, R. L. J. *J. Dairy Res.* **1972**, *39*, 279.
- Mahltig, B.; Werner, C.; Müller, M.; Jérôme, R.; Stamm, M. *J. Biomater. Sci.* **2001**, *12* (9), 995.
- Malmsten, M.; Emoto, K. Van Alstine, J. M. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *202*, 507.
- Marra, A.; Peuvrel-Disdier, E.; Wittemann, A.; Guo, X.; Ballauff, M. *Colloid Polym. Sci.* **2003**, *281* (6), 491.
- Mattison, K. W.; Wang, Y.; Grymonpré, K.; Dubin, P. L. *Macromol. Symp.* **1999**, *140*, 53.
- Meersman, F.; Smeller, L.; Heremans, K. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2635.
- Mei, Y.; Wittemann, A.; Sharma, G.; Ballauff, M.; Koch, Th.; Gliemann, H.; Horbach, J.; Schimmel, Th. *Macromolecules* **2003**, *36* (10), 3452.
- Miura, S.; Kubota, N.; Kawakita, H.; Saito, K.; Sugita, K.; Watanabe, K. Sugo, T. *Radiation Physics and Chemistry* **2002**, *63*, 143.
- Müller, K. *Small angle X-ray scattering*, Academic Press London, 1990.
- Müller, M.; Rieser, Th.; Dubin, P. L.; Lunkwitz, K. *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, *22*, 390.
- Nakamura, M.; Kiyohara, S.; Saito, K.; Sugita, K. Sugo, T. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1323.,
- Neira, J. L.; Rico, M. *Folding & Design* **1997**, *2* (1), R1.
- Norde, W. *J. Dispersion Science and Technology* **1992**, *13* (4), 363.
- Norde, W. *Advances in Colloid and Surface Science* **1986**, *25*, 267.
- Norde, W. Gonzalez, F. G.; Haynes, C. A.; *Polymers for Advanced Technologies* **1995**, *6*, 518.
- Norde, W. Lyklema, J.; *J. Colloid Interface Sci.* **1978**, *66* (2), 257.

- Norhausen, Ch. *Dissertation*, Universität Karlsruhe (TH), 1997.
- Oberg, K. A.; Fink, A. L. *Anal. Biochem.* **1998**, *256*, 92.
- Oh, J.-T.; Kim, J.-H. *Enzyme and Microbial Technology* **2000**, *27*, 356.
- Oppenheimer, L. E. *J. Colloid Interface Sci.* **1983**, *92*, 350.
- Ostuni, E.; Chapman, R. G.; Liang, M. N.; Meluleni, G.; Pier, G.; Ingber, D. E.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2001**, *17*, 6336.
- Panick, G.; Malessa, R.; Winter, R. *Biochemistry* **1999**, *38*, 6512.
- Perczel, A.; Hollósi, M.; Tusnády, G.; Fasman, G. D. *Prot. Eng.* **1991**, *4*, 669.
- Perczel, A.; Park, K.; Fasman, G. D. *Anal. Biochem.* **1992**, *203*, 83.
- Peters, T. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 161.
- Pincus, P. *Macromolecules* **1991**, *24*, 1912.
- Porcar, I.; Gareil, P.; Tribet, C. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 7906.
- Proteins at Interfaces II, *ACS Symposium Series 602*, Horbett, T. A.; Brash, J. L. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, 1995.
- Prucker, O.; Schimmel, M.; Tovar, G.; Knoll, W.; Rühle, J. *J. Adv. Mater.* **1999**, *10*, 1073.
- Pulina, T. *Dissertation*, Universität Karlsruhe (TH), 1995.
- Rahmelow, K.; Hübner, W. *Anal. Biochem.* **1996**, *241*, 5.
- Raines, R. T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1045.
- Reynaud, J. A.; Tavernier, I. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1986**, *15*, 103.
- Robeson, J. L.; Tilton, R. D. *Langmuir* **1996**, *12*, 6104.
- Robertson, A. D.; Baldwin, R. L. *Biochemistry* **1991**, *30*, 9907.
- de Robillard, Q.; Guo, X.; Ballauff, M. *Macromolecules* **2000**, *33*, 9109.
- Römpp Lexikon Chemie*, Falbe, J.; Regnitz, M. (Hrsg.), 10. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1997.
- Rovira-Bru, M.; Giralt, F.; Cohen, Y. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *235*, 70.
- Saito, K. *Sep. Sci. Tech.* **2002**, *37(3)*, 535.
- Sawyer, L.; Brownlov, S.; Polikarpov, I.; Wu, S.-Y. *Int. Dairy Journal* **1998**, *8*, 65.
- Seelenmeyer, S.; Ballauff, M. *Langmuir* **2000**, *16*, 4094.
- Seelenmeyer, S.; Deike, I.; Rosenfeldt, S.; Norhausen, C.; Dingenouts, N.; Ballauff, M.; Narayanan, T.; Lindner, P. *J. Chem. Phys.* **2001**, 10471.
- Seradyn company, Indianapolis, IN 46268, technical bulletins ([www.seradyn.com](http://www.seradyn.com)): *Microparticle-Bound Protein Assay and Quick Elution Technique*, **1999**.
- Servagent-Noinville, S.; Revault, M.; Quiquampoix, H.; Baron, M.-H. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *221*, 273.
- Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Senger, B. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 2204.
- Scheraga, H. A.; Wedemeyer, W. J.; Welker, E. *Methods in Enzymology* **2001**, *341*, 189.
- Schwinté, P.; Ball, V.; Szalontai, B.; Haikel, Y.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1135.

- Schwinté, P.; Voegel, J.-C., Picart, C.; Haikel, Y.; Schaaf, P.; Szalontai, B. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 11906.
- Shirahama, H.; Ohno, H.; Suzawa T. *Colloids and Surfaces* **1991**, *60*, 1.
- Shirahama, H.; Suzawa T. *J. Colloid Interface Sci.* **1989**, *104* (2), 416.
- Shirahama, H.; Suzuki, K.; Suzawa T. *J. Colloid Interface Sci.* **1989**, *129* (2), 483.
- Smith, P. K. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76.
- Sorimachi, K.; Le Gal-Coëffet, M. F.; Williamson, G.; Archer, D. B. Williamson, M. P. *Structure* **1997**, *5*(5), 647.
- Surewicz, W. K.; Mantsch, H.; Chapman, D. *Biochemistry* **1993**, *32*(2), 389.
- Suzawa T.; Shirahama, H. *Colloid and Polymer Science* **1985**, *263* (2), 141.
- Suzawa T.; Shirahama, H. *Advances in Colloid and Surface Science* **1991**, *35*, 139.
- Suzawa T.; Shirahama, H.; Fujimoto, T. *J. Colloid Interface Sci.* **1982**, *86* (1), 144.
- Suzawa T.; Shirahama, H.; Fujimoto, T. *J. Colloid Interface Sci.* **1983**, *93* (2), 498.
- Szyk, L.; Schaaf, P.; Gergely, C.; Voegel, J.-C.; Tinland, B. *Langmuir* **2001**, *17*, 6248.
- Tanaka, M.; Mochizuki, A.; Motomura, T.; Shimura, K.; Onishi, M.; Okahata, Y. *Colloids and Surfaces A* **2001**, *193*, 145.
- Tanford, C; Hauenstein, J. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 5287.
- Tilley, J. M. A. *Dairy Science Abstracts* **1960**, *22*(3), 111.
- Thomas, J. C. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *117*, 187.
- Tong, X.-D.; Xue, B.; Sun, Y. *Biotechnol. Prog.* **2001**, *17*, 134.
- Tong, X.-D.; Sun, Y. *Biotechnol. Prog.* **2001**, *17*, 738.
- Tran, Y.; Auroy, P.; Lee, L.-T.; Stamm, M. *Phys. Rev. E* **1999**, *60*(6), 6984.
- Tsuneda, S.; Kagawa, H.; Saito, K.; Sugo, T. *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *176*, 95.
- Tsuneda, S.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T. *J. of Chromatography A* **1995**, *689*, 211.
- Tsuneda, S.; Shinano, H.; Saito, K.; Furusaki, S. *Biotechnol. Prog.* **1994**, *10*, 76.
- Valkonen, K. H.; Marttinen; N.; Alatossava, T. *Milchwissenschaft* **2000**, *55*(3), 126.
- Vermonden, T.; Giacomelli, C. E.; Norde, W. *Langmuir* **2001**, *17*, 3734.
- Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemie*, 1. korr. Nachdr. der 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 1994.
- Von Hippel, P. H.; Wong, P. H. *J. Biol. Chem.* **1965**, *10*, 3913.
- Wang, R.; Bright, F. V. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 4231.
- Wedler, G. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, 3. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 1987.
- Weiss, A. *Dissertation*, Universität Karlsruhe (TH), 1998.
- Wenisch, E.; Schneider, P.; Hansen, S. A.; Rezzonico, R.; Righetti, P. G. *J. of Biochemical Biophysical Methods* **1993**, *27*, 199.
- Wertz, C. F.; Santore, M. M. *Langmuir* **2001**, *17*, 3006.
- Wertz, C. F.; Santore, M. M. *Langmuir* **2002**, *18*, 706.
- Wertz, C. F.; Santore, M. M. *Langmuir* **2002**, *18*, 1190.

- Wiese, H. *GIT Fachz. Lab.* **1992**, *10*, 1029.
- Winter, R.; Noll, F. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, B. G. Teubner Stuttgart, 1998.
- Xia, J.; Dubin, P. L. *Protein-Polyelectrolyte-Complexes in Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Dubin, P. L.; Bock, J.; Davies, R. M.; Schulz, D. N.; Thies, C. (Hrsg.), Springer-Verlag Berlin, 1994.
- Xia, J.; Mattison, K.; Romano, V.; Dubin, P. L.; Muhoberac, B. B. *Biopolymers* **1997**, *41*, 359.
- Yamamoto, T.; Tasumi, M. *J. Mol. Struct.* **1991**, *242*, 235.
- Yoon, J.-Y.; Kim, J.-H.; Kim, W.-S. *Colloids and Surfaces A* **1999**, *153*, 413.
- Yoon, J.-Y.; Park, H.-Y.; Kim, J.-H.; Kim, W.-S. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *177*, 613.

## VII Abkürzungen

AA	Acrylsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asp. niger	Aspergillus niger
Bac. subt.	Bacillus subtilis
BCA	Bicinchoninsäure
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
BLG	$\beta$ -Lactoglobulin
CCA	<i>Convex constraint analysis</i>
CD	Circluardichroismus
CHES	2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
Dansyl	5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonyl-
DCP	Scheibenzentrifuge
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMF	N,N-Dimethylformamid
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetrie</i>
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid
FG	Feststoffgehalt
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
Gew.-%	Gewichtsprozent
GPC	Gelpermeationschromatographie
HMEM	Methacrylsäure-2-[4-(2-hydroxy-2-methyl-propionyl)-phenoxy]-ethylester
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IR	Infrarotspektroskopie
Konz.	Konzentration
KPS	Kaliumperoxodisulfat
LSCM	Laser-Scanning-Konfokalmikroskopie
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MCT	Hg <sub>1-x</sub> Cd <sub>x</sub> Te-Detektor
MD	Molekulardynamik
NaSS	Natrium-4-vinyl-benzolsulfonat



NHS	N-Hydroxysuccinimid
PAA	Polyacrylsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDB	“ <i>The Protein Databank</i> “ ( <a href="http://www.rcsb.org/pdb/">http://www.rcsb.org/pdb/</a> )
PLS	<i>Partial least squares</i>
PS	Polystyrol
PSS	Polystyrolsulfonat
RNase	Ribonuklease
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPB	<i>Spherical polyelectrolyte brushes</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Vol.-%	Volumenprozent



## Schriftenverzeichnis

„*Fixation of proteins onto the surface of functionalized polymer particles.*”

Witte mann, A.; Haupt, B.; Guo, X.; Ballauff, M. in *DECHEMA Monographien, Vol. 137 (7th International Workshop on Polymer Reaction Engineering)*, VCH Verlag GmbH Weinheim, 2001.

„*Rheology of dilute and semidilute suspensions of spherical polyelectrolyte brushes.*”

Marra, A.; Peuvrel-Disdier, E.; Witte mann, A.; Guo, X.; Ballauff, M. *Colloid Polym. Sci.* **2003**, 281 (6), 491.

„*Adsorption of proteins on spherical polyelectrolyte brushes in aqueous solution.*”

Witte mann, A.; Haupt, B.; Ballauff, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, 5 (8), 1671.

„*Interaction of dissolved proteins with spherical polyelectrolyte brushes.*”

Witte mann, A.; Haupt, B.; Merkle, R.; Ballauff, M. *Macromol. Symp.* **2003**, 191, 81.

„*Engineering the Interaction of Latex Spheres with Charged Surfaces: AFM Investigation of Spherical Polyelectrolyte Brushes on Mica.*”

Mei, Y.; Witte mann, A.; Sharma, G.; Ballauff, M.; Koch, Th.; Gliemann, H.; Horbach, J.; Schimmel, Th. *Macromolecules* **2003**, 36 (10), 3452.

„*Mechanism of protein binding to spherical polyelectrolyte brushes studied in situ using two-photon excitation fluorescence fluctuation spectroscopy.*”

Czeslik, C.; Jansen, R.; Ballauff, M.; Witte mann, A.; Royer, C. A.; Gratton, E.; Hazlett T. *Physical Review E* **2004**, 69, 021401.

„*Spherical Polyelectrolyte Brushes as Carrier Particles for Proteins: An Investigation of the Structure of Adsorbed and Desorbed Bovine Serum Albumin.*”

Jackler, G.; Witte mann, A.; Ballauff, M.; Czeslik, C. *Spectroscopy*, im Druck.

„*Secondary structure analysis of proteins embedded in spherical polyelectrolyte brushes (SPB) by FT-IR spectroscopy.*”

Witte mann, A.; Ballauff, M. *Anal. Chem.*, im Druck.



## Lebenslauf

### zur Person:

Name: Alexander Wittemann  
Anschrift: Knaudenheimer Str. 7  
76661 Philippsburg  
Geboren am: 12.09.1974 in Karlsruhe  
Familienstand: ledig

### Schulausbildung:

1981 – 1985 Franz-Christoph-von-Hutten-Schule, Grundschule  
Philippsburg-Huttenheim  
1985 – 1994 Copernicus-Gymnasium Philippsburg  
Juni 1994 Abitur

### Studium:

WS 1994 – SS 2000 Chemie / Universität Karlsruhe (TH)  
WS 1996 / SS 1997 Diplom-Vorprüfung  
WS 1999 Diplom-Hauptprüfung, Vertiefungsfach: Polymerchemie  
WS 1999 / SS 2000 Diplomarbeit:  
„Synthese und Charakterisierung von temperatursensitiven  
Kern-Schale-Latices“  
Polymer-Institut Universität Karlsruhe (TH), Arbeitskreis  
Prof. Dr. M. Ballauff

### Promotion:

seit Juli 2000 „Untersuchung der Wechselwirkung von Proteinen mit auf  
der Oberfläche von Polymerdispersionen aufgepfropften,  
dicht gepackten Polyelektrolytbürsten“  
Polymer-Institut, Universität Karlsruhe (TH), ab Nov. 2003  
Lehrstuhl für Physikalische Chemie I, Universität Bayreuth  
Arbeitskreis Prof. Dr. M. Ballauff