

Charakterisierung des Einflusses von wässrigen ionischen Flüssig- keitsmischungen auf Struktur und Dynamik des Basischen Myelin Proteins (MBP)

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. Nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II
Chemie, Physik und Mathematik

Der Martin-Luther-Universität
Halle Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Jonas Volmer

Gutachter: Herr Prof. Dr. Dariush Hinderberger

Herr Prof. Dr. Andreas Taubert

Datum der Verteidigung: 26.06.2023

„Indes sie forschten, röntgten, filmten, funkten,
entstand von selbst die köstlichste Erfindung:
der Umweg als die kürzeste Verbindung
zwischen zwei Punkten“

Erich Kästner

Gesammelte Schriften für Erwachsene 1969

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Motivation	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Ionische Flüssigkeiten	3
2.1.1	1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat	4
2.1.2	Cholin-dihydrogenphosphat	4
2.2	Intrinsisch Ungeordnete Proteine	5
2.2.1	Basisches Myelin Protein	5
2.3	Spektroskopische Methoden	9
2.3.1	Dynamische Lichtstreuung	9
2.3.2	Elektrophoretische Lichtstreuung	11
2.3.3	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR).....	13
2.3.4	Infrarot-Spektroskopie.....	21
2.3.5	Brechungsindex und Refraktometrie	26
2.3.6	Small Angle X-Ray Scattering (SAXS)	28
2.4	Physikalische Methoden.....	32
2.4.1	Viskosität und Rheologie.....	32
3	Ergebnisse und Diskussion	35
3.1	Einfluss von Cholin-dihydrogenphosphat auf Struktur und Dynamik von MBP 36	
3.1.1	Ergebnisse Cholin-dihydrogenphosphat (CDHP) in PBS-Puffer	36
3.1.2	Ergebnisse Cholin-dihydrogenphosphat (CDHP) in HEPES-Puffer	44
3.1.3	Diskussion.....	49
3.2	Rekombinante Herstellung von MBP.....	51
3.2.1	Ergebnisse der Expressionsexperimente und Optimierung der Ausbeute 51	
3.2.2	Exkursion: Kristallisationsexperimente	58
3.2.3	Diskussion.....	61
3.3	Wasser/Ionische Flüssigkeitgemische als Minimalmodel für Lipiddoppelschichtmembranen	62

3.3.1	Ergebnisse Brechungsindex und Viskosität.....	62
3.3.2	DLS-Ergebnisse	63
3.3.3	ELS-Ergebnisse	68
3.3.4	EPR-Ergebnisse.....	70
3.3.5	IR-Ergebnisse	77
3.3.6	SAXS-Ergebnisse	80
3.3.7	Diskussion.....	83
4	Material und Methoden.....	90
4.1	Material	90
4.2	Probenvorbereitung.....	90
4.2.1	HEPES Puffer	91
4.2.2	Phosphat Puffer PBS	91
4.2.3	DLS- und ELS-Proben.....	91
4.2.4	EPR-Proben.....	94
4.2.5	IR-Proben.....	96
4.2.6	SAXS-Proben.....	96
4.3	DLS-Messungen	97
4.4	ELS-Messungen.....	98
4.5	EPR-Messungen	99
4.5.1	cw EPR-Messungen.....	99
4.5.2	Pulse EPR-Messungen	100
4.6	IR-Messungen.....	101
4.7	Refraktometer Messungen	101
4.8	Rheometer Messungen	101
4.9	SAXS-Messungen.....	102
4.10	Rekombinante Herstellung von MBP	103
4.10.1	Transformation und Expression.....	103
4.10.2	Zellaufschluss und Reinigung von MBP	104
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	107
	Literaturverzeichnis	110

Anhang.....	125
Anhang Kapitel 3.1	125
Anhang Kapitel 3.2	129
Anhang Kapitel 3.3	131
Anhang Kapitel 3.3.1	131
Anhang Kapitel 3.3.2.....	132
Anhang Kapitel 3.3.3.....	136
Anhang Kapitel 3.3.4	137
Anhang Kapitel 3.3.6.....	141
Danksagung	145
Curriculum Vitae.....	146
Publikationsliste	147
Eidesstattliche Erklärung.....	148

Abkürzungsverzeichnis

16-DSA	16-Doxylstearinsäure
ATR-IR	Attenuated Total Reflection Infrarot Spektroskopie
AS	Aminosäure
BMI	1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat
C/Cys	Cystein
C1S17CH85C	C1 Wildtyp an Position 17 und 85 mit Cystein substituiert
C1WT	C1 Wildtyp
CDHP	Cholin-dihydrogenphosphat
cw-EPR	continuous wave Electron Paramagnetic Resonance
DEER	Double Electron Electron Resonance
DLS	Dynamische Lichtstreuung
ELS	Elektrophoretische Lichtstreuung
ESE	Elektronenspin Echo
ESEEM	electron spin echo envelope modulation
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IDP	Intrinsisch Ungeordnete Proteine
IDR	Intrinsisch Ungeordnete Region
IL	Ionische Flüssigkeit
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRE	Internal Reflection Element
MAXS	Middle Angle X-Ray Scattering
MBP	Basisches Myelin Protein
MS	Massenspektrometrie
MS	Multiple Sklerose
MTSSL	(2,2,5,5-Tetramethyl-3-((2methyl-2,2-dioxo-2 λ ⁶ -disulfan-1-yl)methyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)oxyl
PALS	Phasenanalyse Lichtstreuung
PBS	Phosphate Buffered Saline
SAXS	Small Angle X-Ray Scattering
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl
WAXS	Wide Angle X-Ray Scattering

1 Einleitung und Motivation

Die Geschichte der Ionischen Flüssigkeiten ist ca. 150 Jahre alt, denn schon Friedel und Crafts bemerkten 1877 bei ihrer ersten Beschreibung ihrer Friedel-Crafts-Acylierung das sich bei der Zugabe von wasserfreiem Aluminiumchlorid zu Amylchlorid eine zweiphasige Flüssigkeit bildet.¹ Das erste Mal, das eine protische Ionische Flüssigkeit entdeckt wurde, war 1888 von Gabriel *et al.* Dabei handelte es sich um Ethylammoniumnitrat, dass vermutlich erste organische Salz mit einem Schmelzpunkt unter 100° C. ¹ 1914 veröffentlichte Walden *et al.* einen Synthese Mechanismus für Ethylammoniumnitrat mit einem Schmelzpunkt von 12,5° C, dies markierte die Geburtsstunde der Ionischen Flüssigkeiten, die bei Raumtemperatur flüssig sind. ¹

Die Fortschritte auf diesem Gebiet waren langsam, bis Anfang der 1990er neue Entwicklungen und Technologien zu einem exponentiellen Anstieg der Veröffentlichungen in diesem Forschungsgebiet ein reges Interesse der wissenschaftlichen Gemeinschaft an Ionischen Flüssigkeiten auslöste. Einen wichtigen Beitrag dazu leisteten Wilkes und Zaworotko die 1992 Wasser und Luft stabile ILs auf Imidazol-Basis synthetisierten. ¹⁻³

Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften wie, nicht Entflammbarkeit, geringer Toxizität, vernachlässigbarem Dampfdruck und Umweltfreundlichkeit werden sie auch als „Green Solvents“ bezeichnet, was sie in den letzten drei Jahrzehnten immer weiter in den Fokus der Wissenschaft gerückt hat. ^{4,5} Sie können zur Katalyse von chemischen Reaktionen, als Elektrolyt oder als Ersatz für konventionelle organische Lösemittel eingesetzt werden. Trotz dieser herausragenden Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten gehören Ionische Flüssigkeiten immer noch zu den am wenigsten erforschten Stoffklassen. ^{1,2,5-8}

Eine weitere eher unerforschte Stoffklasse bilden die intrinsisch ungeordneten Proteine (IDPs), bei ihnen handelt es sich um hochspezifische biologische Makromoleküle, die essenzielle Aufgaben im menschlichen Körper erfüllen, aber in wässrigen Lösungen keinerlei sekundär oder tertiär Struktur bilden.⁹⁻¹¹ Dies führte in der Vergangenheit zu einem Paradigma in der Strukturbiologie, da man lange Zeit annahm das für biologische Funktionen eine stabile globuläre Struktur notwendig sei.¹² IDPs spielen eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen wie Signalweiterleitung, Zellkommunikation und Chaperoneaktivität.¹³⁻¹⁷ Anders als globuläre Proteine können sie in zwei Kategorien eingeteilt werden, vollkommen ungeordnete Proteine (IDPs) und Proteine mit ungeordneten Regionen sogenannte IDRs.¹⁸⁻²¹ Wegen ihrer Beteiligung an physiologischen und pathologischen Prozessen ist die Umwandlung von Unordnung zu Ordnung von großem Interesse

für die Forschung. IDPs sind hochspezifische Zielproteine, die ihre Konformation nur an ihrem Bestimmungsort oder in der Nähe ihres Zielliganden verändern.^{10,21}

Diese Arbeit versucht, diese beiden relativ unerforschten Gebiete zu vereinen, indem der Einfluss von ionischen Flüssigkeiten auf intrinsisch ungeordnete Proteine untersucht werden soll. Wie schon zuvor und nochmal detaillierter in den theoretischen Grundlagen beschrieben, haben ILs mannigfaltige Eigenschaften und zählen trotz ihrer langen Geschichte immer noch zu den am wenigsten erforschten Stoffklassen. Diese Arbeit soll neue Anwendungsmöglichkeiten für ILs im Bereich der biophysikalischen Chemie aufzeigen. Aus früheren Veröffentlichungen ist zu entnehmen, dass der Einfluss von ILs auf Struktur und Dynamik von Proteinen schon längere Zeit im Fokus der wissenschaftlichen Gemeinschaft steht, doch meistens handelt es sich dabei um Proteine, die bereits in wässrigen Lösungen sekundär und tertiär Strukturen ausbilden.^{7,22-25} Deswegen liegt der Fokus dieser Arbeit auf intrinsisch ungeordneten Proteinen, die nachweislich keine Strukturfeatures in wässrigen Lösungen bilden.

Als Modell Protein wurde das Basische Myelin Protein (MBP) gewählt, dabei handelt es sich um ein IDP der Myelinscheide welches dafür sorgt, dass die Schichten der Multilamellaren Membran zusammenhält und eine ungehinderte Signalweiterleitung der Nervenzelle garantiert.²⁵⁻²⁷ Es spielt eine Schlüsselrolle bei demyelinisierenden Krankheiten wie Multiple Sklerose (MS) und ist deshalb ein Forschungsschwerpunkt der letzten Jahrzehnte.²⁸⁻³² Als Modell ILs wurden 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluorborat (BMIm) und Cholin-dihydrogenphosphat (CDHP) gewählt, da sich in früheren Projekten ILs auf Imidazol- oder Cholin-Basis als äußerst vielversprechend in Verbindung mit Proteinen gezeigt haben. Sie sind ungiftig und umweltfreundlich, weshalb sie für biophysikalische Versuche besonders geeignet sind. Wie zuvor erwähnt, wurde MBP als Modell Protein verwendet allerdings handelt es sich bei handelsüblichem MBP um eine Mischung aus all seinen Isoformen, weshalb sich ein großer Teil dieser Arbeit zusätzlich mit der rekombinanten Herstellung von MBP und einiger seiner Mutanten beschäftigt.³³

Für diese Arbeit wurden verschiedene Mischungen von Puffer und ILs mit unterschiedlichen Protein Konzentrationen hergestellt und mit unterschiedlichen Spektroskopischen Methoden untersucht. Als Hauptmethode wurde die dynamische Lichtstreuung (DLS) gewählt, sie liefert schnelle und zuverlässige Ergebnisse. Um zusätzliche Informationen über Struktur und Dynamik zu erhalten, wurden Methoden wie Infrarot-Spektroskopie (IR), Elektron Spin Resonanzspektroskopie (EPR) und Kleinwinkel Röntgenstreuung (SAXS) verwendet.³³⁻⁴⁶

2 Theoretische Grundlagen

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den Grundlagen, angefangen von Ionischen Flüssigkeiten, über intrinsisch ungeordnete Proteine bis hin zu den spektroskopischen und physikalischen Methoden, die verwendet wurden, um das Thema zu erforschen.

2.1 Ionische Flüssigkeiten

Als Ionische Flüssigkeiten werden organische Salze bezeichnet, deren Schmelzpunkte unter 100° C liegen. Einige ILs sind unter Raumtemperatur flüssig, was sie zu einer neuartigen Kategorie von Lösemitteln mit einzigartigen Eigenschaften macht. Diese Eigenschaften sind darauf zurückzuführen, dass sie ohne Lösemittel vollkommen dissoziiert vorliegen. Dieser geladene Zustand führt dazu, dass ILs einen vernachlässigbaren Dampfdruck besitzen. Des Weiteren sind sie nicht brennbar, ungiftig und umweltfreundlich, deshalb werden sie häufig auch als „Green Solvents“ bezeichnet.^{1-5,8} Der Grund für ihren niedrigen Schmelzpunkt liegt in ihrer Asymmetrie, welche die Kristallisation verhindern kann. Ionische Flüssigkeiten bestehen meist aus einem großen organischen Kation auf Imidazol-, Pyrrolidin- oder Ammonium-Basis. Das Spektrum der Anionen ist noch viel größer, es kann von kleinen und mittleren anorganischen bis hin zu großen komplexen organischen Molekülen gehen. Die große Variabilität an Kombinationen von Anion und Kation ist unter anderem verantwortlich für die geringe Toxizität bis hin zur Biogenität einiger ILs.^{1,3,4,7}

Trotz ihrer mannigfaltigen Eigenschaften sind sie erst in den letzten Jahren in den Schwerpunkt der Forschung gerückt. Obwohl es sich um eine relativ junge Klasse von Lösemitteln handelt, sind Alkylpyridiniumchloraluminat seit den 1950ern, Ethylmethylimidazoliumchloraluminat seit den 1980ern bekannt.¹ Erst als in den frühen 1990er Jahren die massenhafte Synthese von Imidazol basierten, in Wasser und Luft stabilen ILs gelang, wuchs das Forschungsgebiet der ionischen Flüssigkeiten rapide.³ Am Anfang waren die Anwendungen begrenzt, man beschränkte sich auf Katalyse, Steigerung der Ausbeute oder Entfernung von Nebenprodukten bei organischen Synthesen.² Da in den letzten Jahren vermehrt Umweltfreundlichkeit in den Fokus der Wissenschaft gerückt ist, fanden sich auf diesem Gebiet weitere Anwendungsmöglichkeiten von ILs. Es wurde entdeckt, dass sie eine hohe Affinität haben, Gase wie Kohlenstoffdioxid oder Schwefeldioxid zu absorbieren, des Weiteren können sie als Ersatz für herkömmliche organische Lösemittel eingesetzt werden.^{4,5} Mittlerweile werden Ionische Flüssigkeiten gezielt für spezielle Anwendungen designt, durch die gewünschte Kombination von Kation und

Anion oder durch Modifikation der ionischen Bestandteile. Aufgrund dieser vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten ist die Erforschung ihrer Eigenschaften und ihres physikochemischen Verhaltens notwendiger denn je.^{2,48}

2.1.1 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat

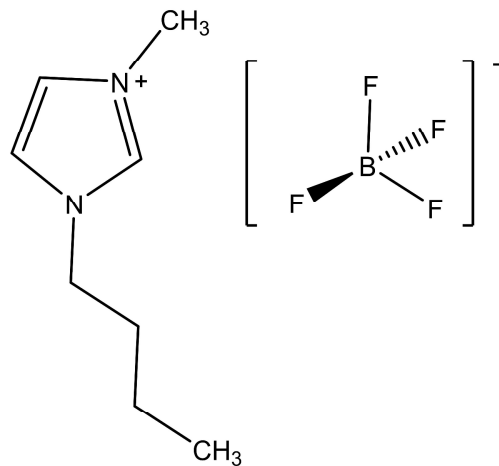


Abbildung 1 Strukturformel von 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat

1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat [BMIm][BF₄] ist eine ionische Flüssigkeit auf Imidazol-Basis. Es handelt sich um eine transparente hellgelbe Flüssigkeit mit einer molaren Masse von 226 g/mol, einer Dichte von 1,21 g/cm³ und einem Schmelzpunkt von -75° C. Der pH-Wert bei Raumtemperatur beträgt ≈ 5. Imidazol basierte ionische Flüssigkeiten wurden für eine Vielzahl von Proteinen ausgiebig studiert.⁴⁹ Dabei erwiesen sich aprotische, bei Raumtemperatur flüssige und mit Wasser mischbare ionische Flüssigkeiten als besonders vielversprechend. Sie konnten Strukturen in wässrigen Lösungen stabilisieren oder denaturiertes Protein neu falten.^{7,24,25,48,50}

[BMIm][BF₄] ist in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar, wegen seiner amphiphilen Natur neigt es dazu, lamellare oder mizelläre Strukturen zu bilden. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde es als Modell ausgewählt.^{3,51–53}

2.1.2 Cholin-dihydrogenphosphat

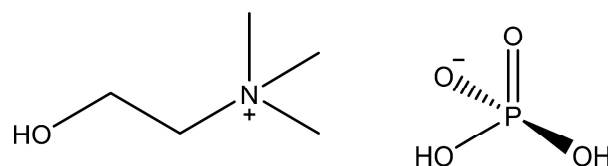


Abbildung 2 Strukturformel von Cholin-dihydrogenphosphat

Cholin-dihydrogenphosphat (CDHP) ist ein weißer kristalliner Feststoff mit einer molaren Masse von 201,1 g/mol und einem Schmelzpunkt von 190° C.⁵⁴ Trotz dieser Eigenschaften wird es als ionische Flüssigkeit klassifiziert. Cholin-basierte sind weniger gut erforscht als Imidazol-basierte ILs, jedoch bieten sie einige Vorteile wie z.B. geringere Zytotoxizität. In früheren Studien erwiesen sich Cholin-basierte ILs vor allem das Cholin-dihydrogenphosphat als besonders vielversprechend.^{6,22,23} Als biokompatible IL kann sie Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen in wässrigen Lösungen erhalten und sie vor Denaturierung bewahren. Deshalb wurde sie als zweite Modell-IL ausgewählt²³

2.2 Intrinsisch Ungeordnete Proteine

Proteinstrukturen können in vier Kategorien eingeteilt werden. Erstens die Primärstruktur; hierbei handelt es sich um die reine Aminosäuresequenz, aus der das Protein aufgebaut ist. Zweitens die Sekundärstruktur, sie entsteht aus der Interaktion der Aminosäuren untereinander, es können sich α -Helices, β -Faltblätter und Random Coils bilden. Drittens die Tertiärstruktur, mehrere Sekundärstrukturen die miteinander interagieren und so einzigartige Konformationen bilden. Viertens, die Quartärstruktur, hierbei lagern sich mehrere gefaltete Polypeptide zu einem funktionierendem Proteinkomplex zusammen.^{9-12,21,55,56}

Für intrinsisch ungeordnete Proteine (IDPs) trifft diese Einteilung nicht zu, IDPs bilden keine Tertiärstruktur in Lösung und für die meisten liegen keine Kristallstrukturdaten vor. Schätzungen gehen davon aus, dass ca. 10 Prozent aller Proteine aus eukaryotischen Organismen ungeordnet sind. Die Struktur von IDPs ist stark von ihrer Funktion abhängig, so wird unterschieden in vollkommen unstrukturierte Proteine und Proteine mit intrinsisch ungeordneten Regionen (IDRs).⁵⁷ Zur allgemeinen Struktur von IDPs lassen sich folgende Aussagen treffen: Sie besitzen wenig bis keine voluminösen Aminosäuren, die sterische Hinderung begünstigen könnten und sie enthalten überdurchschnittlich viele geladenen Aminosäuren. Dies begünstigt elektrostatische Abstoßung und verhindert zusätzlich Strukturbildung. Intrinsisch ungeordnete Proteine erfüllen trotz ihres Mangels an Struktur wichtige Aufgaben im Organismus, so gibt es Proteine, die in ihrer Zielumgebung Strukturen ausbilden, um ihre Aufgabe zu erfüllen. Eines von ihnen ist das Basische Myelin Protein.^{9-17,19,21,55,57-59}

2.2.1 Basisches Myelin Protein

Die Myelinscheide ist ein multilamellares lipidreiches Membrankonstrukt, das sich von den Oligodendrozyten bis zu den Schwann-Zellen erstreckt und eine isolierende Schicht

um Axone im zentralen und peripheren Nervensystem bildet.^{26,60} Die Myelinscheide stellt eine Verbindung zwischen Axon und dem umliegenden Gewebe her und ermöglicht z.B. durch Salzkanäle eine schnelle Übertragung der Nervenimpulse.^{26,60} Basisches Myelin Protein (MBP), ist nach dem Proteolipid-Protein (PNP), das mengenmäßig häufigste Protein des zentralen Nervensystems (ZNS). Im ZNS sorgt hauptsächlich MBP dafür, dass die zytoplasmischen Membranen der kompakten Myelinscheide verbunden und zusammengehalten werden.^{26,27,30,61}

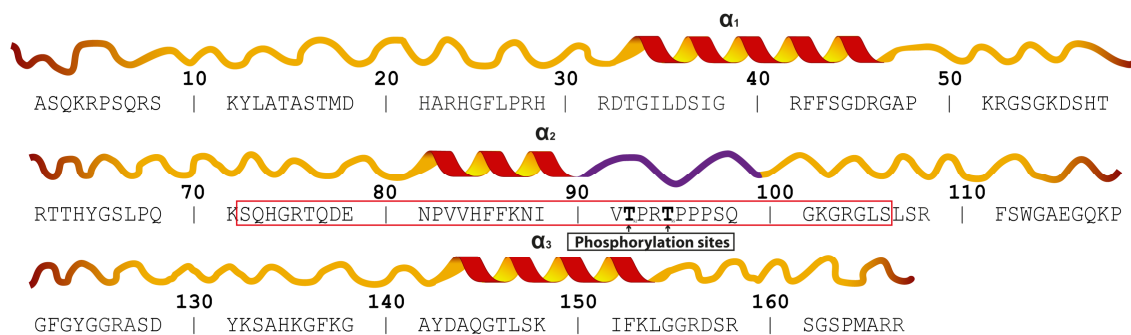


Abbildung 3 MBP-Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur 18,5 kDa entnommen von Vassall et al.⁶²

MBP gehört zur Klasse der intrinsisch ungeordneten Proteine (IDPs), wie in Kapitel 2.2 erwähnt, zeichnen sich IDPs durch geringe Anteile von voluminösen Aminosäuren und einem hohen Anteil geladener Aminosäuren aus. So liegt der Anteil an positiv geladenen Aminosäuren bei 10,7 % Arginin (R), 7,7 % Lysin (K) und 4,8 % Histidin (H). Wohingegen der Anteil an voluminösen Aminosäuren deutlich geringer ausfällt, 0,6 % Tryptophan (W), 3,0 % Tyrosin (T) und 5,4 % Phenylalanin (F). Aufgrund ihrer Zusammensetzung interagieren sie intrinsisch mit Membranen und im Gegensatz zu peripheren Proteinen, die nur mit der Membranoberfläche interagieren, reichen sie in die Membran hinein oder sogar hindurch. Ihre Flexibilität, aufgrund ihrer intrinsischen Unordnung erlaubt es ihnen, mit einer Vielzahl von Bindungspartnern zu interagieren.⁶¹

MBP entsteht aus einem Gen der Oligodendrozyten-Linie in Oligodendrozyten. Es wird in den unterschiedlichsten Isoformen von 14 – 21,5 kDa produziert, wobei die Spleiß-Isoform 18,5 kDa, mengenmäßig, die am häufigsten vorkommende im gesunden erwachsenen menschlichen Gehirn ist.²⁸ Bei neutralem pH-Wert weist sie eine Nettoladung von +19 und eine Größe von $55 \times 47 \times 40 \text{ \AA}^3$ gebunden an eine Membran auf. In wässriger Lösung liegt MBP in verlängerter Aminosäure-Kette vor und neigt dazu Aggregate zu bilden, um hydrophobe Bereiche vom hydrophilen Medium abzuschirmen.^{63–65}

In einer membranassoziierten Umgebung kommt es zu einer Konformationsänderung aufgrund von Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen. Dabei bildet MBP drei amphipathische α -helikale Strukturen aus, die mit der Lipiddoppelschicht in Wechselwirkung treten. Die Interaktion beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen des basischen, positiv geladenem MBP und der negativ geladenen Kopfgruppe der Lipide.

Deshalb ist die Interaktion abhängig von der Lipidzusammensetzung, Metallionenkonzentration und der MBP-Variante (vgl. Abb. 4)⁶⁶

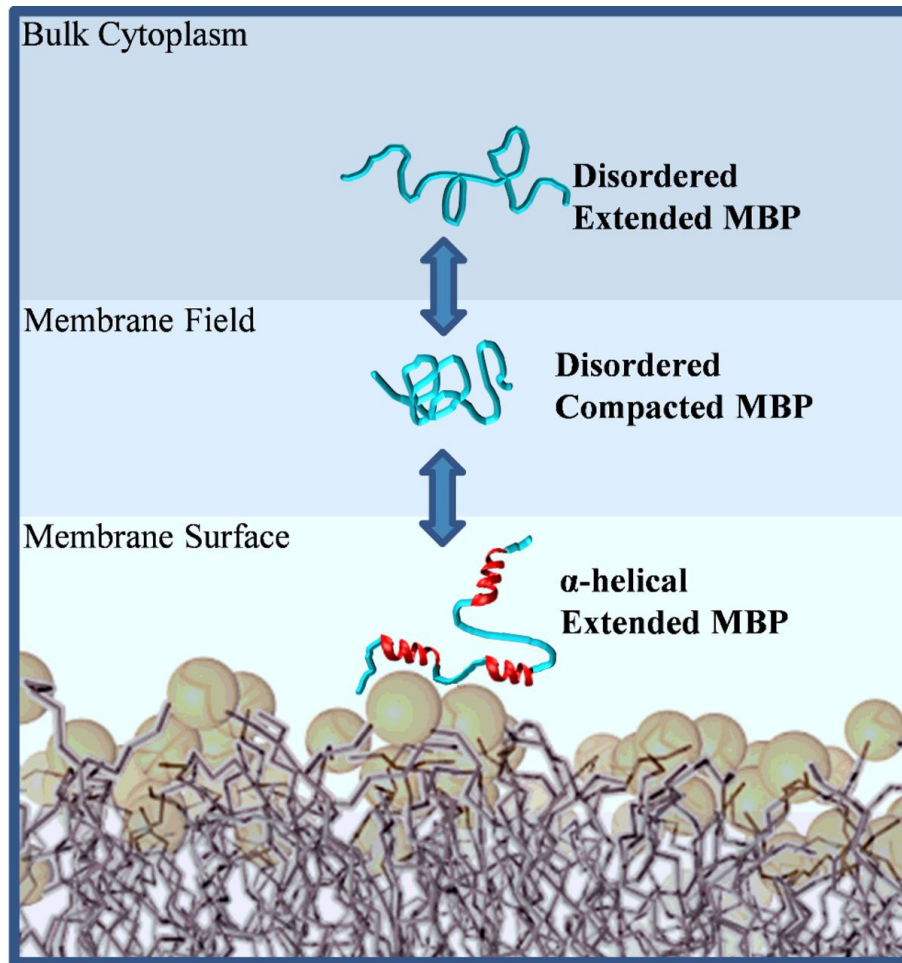


Abbildung 4 Übergang von ungeordnetem 18,5 kDa MBP zur α -helikalen Form entnommen nach Vassall et al.⁶⁷

Raasakka *et al.* postulierten einen plausiblen Stapel-Mechanismus, in dem freies MBP durch negative Ladung der Lipide angezogen wird, eine partielle Insertion in die Membran erfolgt, was zu einer Neutralisation der Ladung und einer partiellen Faltung des Proteins führt. Die Oberfläche der Lipidmembran reichert sich mit einseitig integriertem MBP an, was zu einem stark positiven Ladungsüberschuss führt. Wenn nun eine kritische Proteinkonzentration erreicht ist, interagieren MBP-Reste mit der gegenüberliegenden Lipiddoppelschicht. Durch eine Phasenumwandlung nimmt das MBP seine finale „Paperclip“-Form an, welche die Membranen wie Kleber zusammenhält, der Abstand zwischen den Membranen beträgt ca. 3 nm (siehe Abb. 5).^{66,68–70}

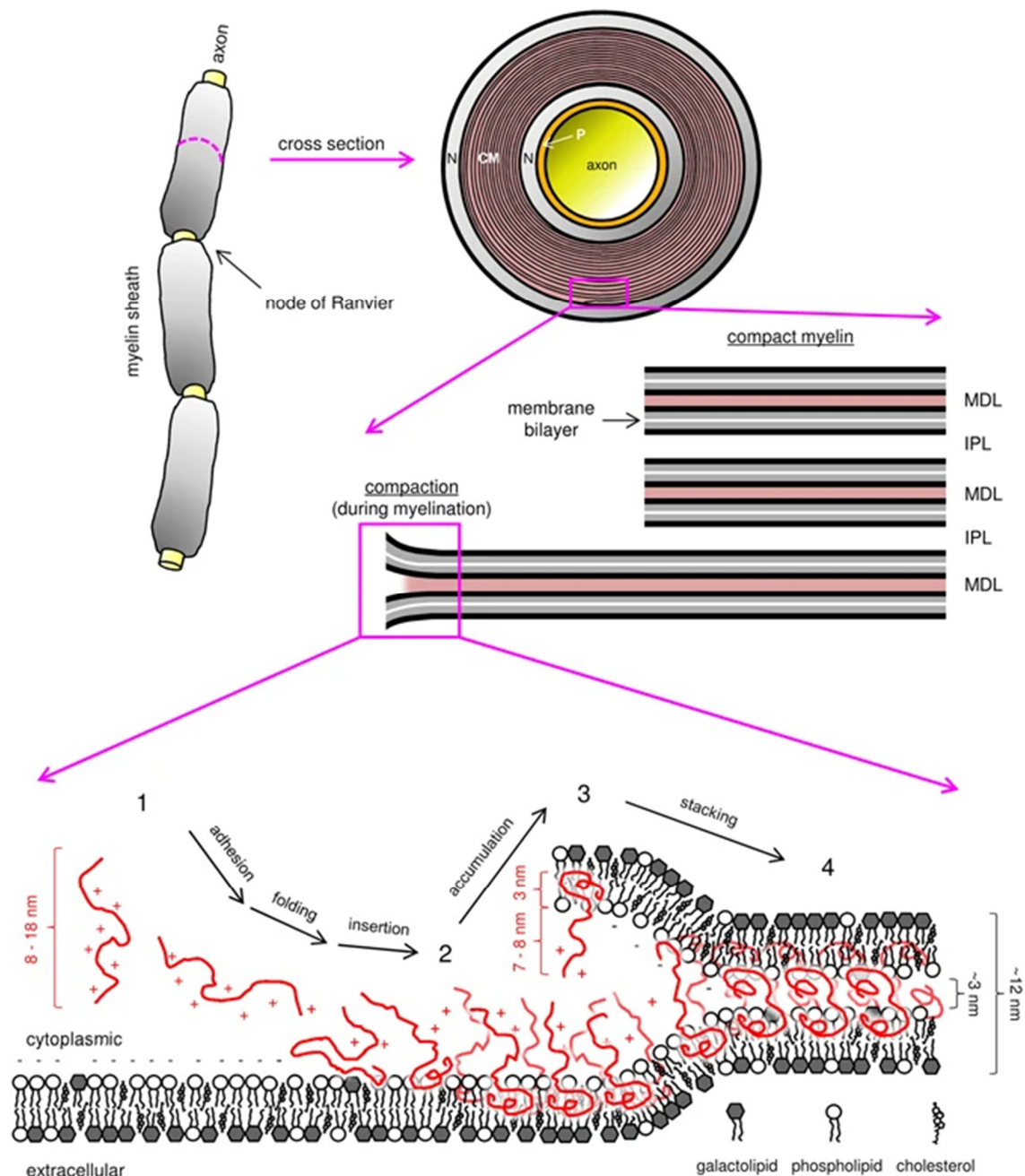


Abbildung 5 Mechanismus der Assoziation von MBP an die Myelin-Membran. Die Grafik zeigt einen möglichen Bildungsmechanismus des kompakten Myelins bestehend aus major dense line, interperiod line und den Lipidmembranen wie sie durch Interaktion mit MBP gebildet werden könnten. Grafik entnommen aus Raasakka et al.⁶⁹

Zusätzlich zu seinen mannigfaltigen Isoformen treten beim MBP außerdem noch die Ladungsvarianten C1 bis C8 auf. Hierbei handelt es sich um die Abnahmen der positiven Ladungen durch posttranslationale Modifikationen (PTMs), wie Deiminierung, Desamidierung, Methylierung, N-terminale Acylierung oder Phosphorylierung. Die 18,5 kDa C1 Isoform repräsentiert die am wenigsten modifizierte Variante und wird als „gesunde“ oder „Wildtyp“ Form bezeichnet, da sie im gesunden erwachsenen Gehirn von Säugetieren mengenmäßig am häufigsten vorkommt. Wie zuvor erwähnt unterscheiden sich die Varianten C2 bis C8 im sukzessiven Verlust einer weiteren positiven Ladung. Diese

Varianten treten auf natürliche Weise im Alterungsprozess von MBP auf, bei überdurchschnittlichem Vorkommen können sie Hinweise auf demyelinisierende Krankheiten wie Multiple Sklerose (MS) sein.^{29,31,68,71–78}

Charakteristisch für MS sind das Auftreten von Läsionen und Verlust der Membran Adhäsion bis zum Zerfall der Myelinstruktur. Durch den Verlust der Isolation des Axons kommt es zu Fehlern in der Signalübertragung, was zur Beeinträchtigung der sensorischen und motorischen Fähigkeiten führt. Die Demyelinisierung ist abhängig von der MBP-Konzentration, Lipidzusammensetzung, der Menge der Varianten und der Ionenkonzentration.^{29,68,71–78}

In den Experimenten wurde kommerzielles bMBP verwendet und mit rekombinant hergestelltem rmMBP C1 WT und rmMBP C1 S17CH85C verglichen (Sequenz vgl. Abb. 3).^{79,80}

2.3 Spektroskopische Methoden

Dieses Kapitel der Arbeit befasst sich mit den theoretischen Grundlagen und Messprinzipien der verwendeten spektroskopischen Methoden. Allgemein bezeichnet Spektroskopie eine Gruppe von physikalischen Methoden, bei der elektromagnetische Strahlung durch Interaktion mit Materie zerlegt oder verändert wird. Die so erhaltenen Intensitätsverteilungen werden als Spektren bezeichnet. Im Zuge dieser Arbeit wurde Strahlung des gesamten elektromagnetischen Spektrums verwendet, um die Proben zu untersuchen. Angefangen mit sichtbarem Licht bei der Dynamischen Lichtstreuung (DLS), über Mikrowellenstrahlung bei der Elektronen Spin Resonanz (EPR), Infrarotstrahlung bei der Infrarot-Spektroskopie (IR), bis hin zu Röntgenstrahlung bei der Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS).^{81,82}

2.3.1 Dynamische Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuung (DLS), auch bekannt als Photonen-Korrelations-Spektroskopie oder Quasielastische Lichtstreuung ist eine schnelle nicht-invasive Methode zur Bestimmung von Größen, Größenverteilung oder Formen von Nanostrukturen. Lichtstreuungsmethoden bilden die etablierte Grundlage zur Charakterisierung von Proteinen, Polymeren und nanostrukturierten Materialien in Lösung. Genaugenommen bestimmt man mit der DLS den hydrodynamischen Radius einer hypothetischen harten Kugel, die mit der gleichen Geschwindigkeit diffundiert wie die gemessenen Partikel.^{83,84}

Bevor die Methode genauer erläutert wird, muss der Begriff der Streuung erläutert werden. In der Physik ist Streuung definiert als die Ablenkung eines Objekts durch

Wechselwirkung mit einem lokalen anderen Objekt. Die Streuung an den Partikeln im DLS kann für Teilchen, deren Durchmesser klein im Vergleich zur Wellenlänge λ ($<\lambda/10$) ist, mittels Rayleigh-Streuung beschrieben werden. Ist diese Bedingung nicht erfüllt, müssen die Lichtstreuemuster mathematisch mit dem komplexeren Modell der Mie-Streuung erklärt werden.^{83,84}

Partikel in einer Dispersion folgen der Brown'schen Molekularbewegung, sie resultiert aus Zusammenstößen des dispergierten Stoffes mit Lösemittelmolekülen. Da die Kollisionen zufällig sind, handelt es sich um eine ungerichtete Bewegung, dabei diffundieren kleine Partikel schneller als Große. Die Geschwindigkeit der Brown'schen Bewegung kann quantifiziert werden als Translationsdiffusionskoeffizient D . Die Diffusionsgeschwindigkeit wird im DLS durch Einstrahlen von Laserlicht und der daraus resultierenden Fluktuation der Streulichtintensität über Zeit $I(t)$, aufgrund der Bewegung der Teilchen, gemessen. Je kleiner ein Partikel, desto höher ist die Geschwindigkeit dieser Intensitätsfluktuation, weshalb sie von der Diffusionsrate der Teilchen abhängig ist.^{83,84}

Das Gerät zeichnet schnell hintereinander das Lichtstreusignal $I(t+\tau)$ auf und vergleicht es mit dem ursprünglichem Signal $I(t)$. τ ist die Korrelationszeit und beschreibt die Zeit zwischen den Aufnahmen der Signale, je kleiner die Abstände, desto besser korrelieren die Signale. Mit Änderung des Intensitätssignals geht das ursprüngliche Signal verloren und es besteht keine Korrelation mehr. Der Vergleich verschiedener Zeitpunkte wird als Autokorrelation bezeichnet. Große Partikel diffundieren langsamer als kleine, was dazu führt, dass das Korrelationssignal später verloren geht (vgl. Abb. 6)⁸³⁻⁸⁵

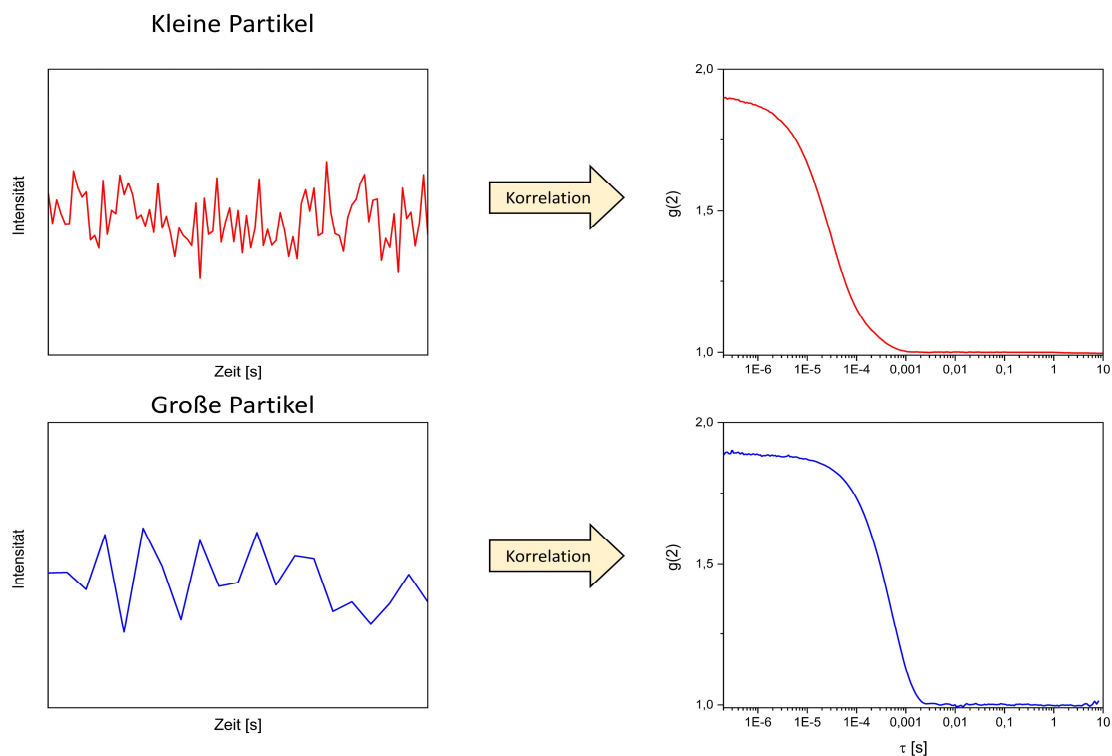


Abbildung 6 Verhältnis von kleinen und großen Partikeln im DLS. Links das fluktuierende Intensitätssignal; rechts die Intensitätskorrelationsfunktion

Aus der normierten Intensitätskorrelationsfunktion wird der Translationsdiffusionskoeffizient bestimmt.

$$g_2(\tau) = \frac{[I(t) * I(t - \tau)]}{[I(t)]^2} \quad (1)$$

Über die Siegert-Beziehung kann der Zusammenhang aus der Streufeld-Zeitkorrelationsfunktion g_1 hergeleitet werden.

$$g_2(\tau) = 1 + |g_1(\tau)|^2 \quad (2)$$

Für den Fall einer idealen monodispersen Suspension in der die Brown'sche Bewegung als exponentiell abfallende Funktion der Korrelationszeit ausgedrückt werden kann, gilt:

$$g_2(\tau) = C[1 + B e^{-2\tau\Gamma}] \quad (3)$$

Dabei ist C die Basislinie, B die Steigung und Γ die Abklingrate definiert als $\Gamma = D * q^2$ und $q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda}\right) \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$. η ist der Brechungsindex, θ ist der Streuwinkel und λ die Anregungswellenlänge. Der hydrodynamische Durchmesser wird mittels Stokes-Einstein Gleichung berechnet.

$$d_H = \frac{k_B * T}{3\pi * \eta * D} \quad (4)$$

k_B ist die Boltzmann-Konstante, die Variablen für Lösemittelviskosität η und die Temperatur T müssen bekannt sein, da sie die Diffusionsrate beeinflussen. Der Translationsdiffusionskoeffizient ist abhängig von der Partikelgröße, Oberflächenstruktur, Art und Konzentration der Ionen des Lösemittels und Dicke der elektrischen Doppelschicht.

Für Proben mit multimodaler Größenverteilung muss die Summe aller exponentiellen Abklingfunktionen $g_1(\tau)$ in der Korrelationsfunktion berücksichtigt werden.

$$g_2(\tau) = C[1 + B g_1(\tau)^2] \quad (5)$$

Der Polydispersitätsindex (PDI) gibt Aufschluss über die Breite der Partikelgrößenverteilung. Er wird aus der kumulativen Anpassung der Intensitätskorrelationsfunktion abgeleitet.^{38,83-88}

2.3.2 Elektrophoretische Lichtstreuung

Die elektrophoretische Lichtstreuung ist eine Methode zur Bestimmung des Zeta-Potentials.³⁸

Die meisten Partikel haben in Lösung eine geladene Oberfläche, sei es positiv oder negativ. In einer Elektrolytlösung herrscht eine gleichmäßige Verteilung von Anionen und Kationen. Allerdings kommt es in der Nähe von geladenen Partikeln zu einer asymmetrischen Verteilung von Ionen, da sich eine Ionenschicht bildet, die die Oberflächenladung des Teilchens ausgleicht, sie wird als Sternschicht bezeichnet.⁸⁹⁻⁹¹

Um diese starre Ionenschicht bildet sich eine weitere diffuse Ionenschicht, die hauptsächlich aus Gegenionen besteht, zusammen bilden sie eine elektrische Doppelschicht. Die geladenen Partikel und ihre Sternschicht sind relativ stark durch elektrostatische Wechselwirkungen verbunden, weshalb sie am Partikel bleibt, auch wenn sich die Ionen relativ zur Flüssigkeit bewegen. Der Übergang zwischen gebundenen und freien Ionen in der Flüssigkeit wird als Scherebene bezeichnet. Das elektrische Potential einer Oberfläche entspricht der Arbeit, die aufgebracht werden muss, um eine Ladungseinheit aus unendlicher Entfernung ohne zusätzliche Beschleunigung an die Oberfläche zu bringen. Die Oberflächenladung wird durch das Vorhandensein von gegenständig geladenen Ionen abgeschirmt. Das bedeutet, dass das Potential zwischen Partikeloberfläche und Scherebene abnimmt. Das Potential der Scherebene ist als Zeta-Potential definiert.^{89,91,92}

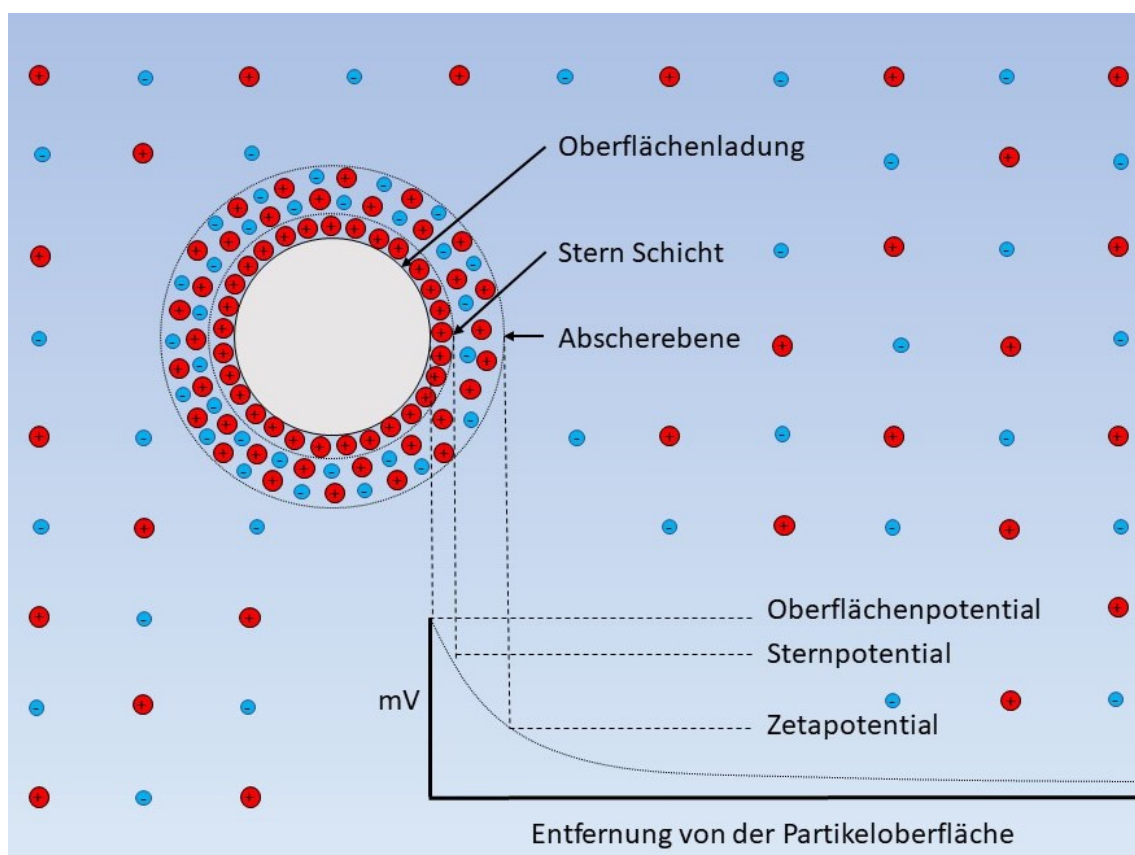


Abbildung 7 Schematische Darstellung des Zetapotentials an einem geladenen Partikel in Lösung

Die Abnahme über die Distanz hängt von mehreren Faktoren ab. Die Debye-Länge κ^{-1} ist definiert als die Doppelschichtdicke, bei der das Potential auf $1/e$ seines Anfangswertes abgefallen ist. Die Dicke nimmt mit steigender Ionenstärke ab, also muss κ umgekehrt proportional zur Konzentration sein.⁹³

Die übliche Methode zur Messung des Zetapotentials ist die Elektrophorese. Hierbei wird die elektrophoretische Mobilität eines Teilchens in Lösung zur Gegenelektrode in einem elektrischen Feld gemessen. Die Geschwindigkeit ist proportional zum angelegten elektrischen Feld, da sich ein Gleichgewicht zwischen elektrostatischer Kraft und

Reibungskraft bildet. Die Proportionalitätskonstante wird als elektroforetische Kraft U_E bezeichnet.⁹¹

Um das Zetapotential aus der elektroforetischen Mobilität zu berechnen, gibt es zwei Modelle für bestimmte Grenzfälle. Erstens, wenn das Verhältnis von Teilchenradius zur Dicke der Doppelschicht $\kappa \cdot \alpha$ kleine Werte zeigt, erfolgt die Auswertung nach der Hückel-Gleichung. Für den zweiten Grenzfall einer sehr dünnen Doppelschicht muss die Helmholtz-Smolochowski-Gleichung verwendet werden. Sollte $\kappa \cdot \alpha \approx 1$ sein, muss die Hückel-Gleichung um die Henry-Funktion erweitert werden. Daraus ergibt sich, dass die elektroforetische Mobilität U_E von Zetapotential ζ , der Feldstärke, der Dielektrizitätskonstante und der Viskosität des Lösemittels abhängig ist. Daraus folgt:

$$U_E = \frac{2 \cdot \varepsilon \cdot \zeta \cdot f(\kappa \cdot \alpha)}{3 \cdot \eta} \quad (6)$$

U_E elektroforetische Mobilität, ε Permittivität, ζ Zetapotential, η Lösemittelviskosität und $f(\kappa \cdot \alpha)$ Henry-Funktion mit α Teilchenradius und κ^{-1} Debye-Länge.⁹²⁻⁹⁴

Um das Zetapotential zu bestimmen, greift man auf die elektroforetische Lichtstreuung zurück, es wird ein ähnliches Gerätesetup wie bei der DLS verwendet, der einzige Unterschied ist, dass man eine spezielle Küvette verwendet, die innerhalb der Probe ein elektrisches Feld erzeugt. Ein geladenes Partikel wird sich in Abhängigkeit seiner Ladung in Richtung der Elektrode bewegen, wird nun die Probe mit einem Laser durchstrahlt streut der Partikel Licht und erzeugt eine Dopplerverschiebung, die von der Geschwindigkeit des Teilchens abhängig ist. Mittels der Laser Doppler Methode (LDV) wird aus der gemessenen Frequenzverteilung eine Geschwindigkeitsverteilung berechnet, welche dann zu einer elektroforetischen Mobilitätsverteilung transformiert wird, woraus am Ende das Zetapotential nach Gleichung 6 berechnet werden kann. Diese Technik hat allerdings ein gewisses Fehlerpotential, da sie abhängig von der Konzentration des Elektrolyten ist.^{92,93,95}

Dieses Problem kann umgangen werden, indem man Phase-Analysis-Light-Scattering (PALS) anwendet. Dabei wird nicht die gemessene Frequenzverschiebung, sondern die Phasenverschiebung verwendet, da die Phasenänderung proportional zur Änderung der Position des Partikels ist ($P=f \cdot t$). Das ermöglicht es auch, Proben mit hoher Elektrolytkonzentration zu messen.^{92,94}

2.3.3 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

Bei der Elektronen Spinresonanz wird die Mikrowellenabsorption eines freien Elektrons in einem Magnetfeld gemessen. Während dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche

Techniken zur Anregung des Elektrons verwendet, die in den folgenden Kapiteln erörtert werden. Zuvor müssen die Grundprinzipien dieser Methode erläutert werden.⁹⁶

ESR spektroskopische Verfahren basieren auf der Detektion des Resonanzverhaltens von ungepaarten Elektronen in einem äußeren Magnetfeld B . Der Eigendrehimpuls (Spin) S eines Elektrons ist durch folgende Beziehung mit dem magnetischen Moment μ_S verknüpft:

$$\mu_S = \frac{g_e \mu_B}{h} * S \quad (7)$$

Mit dem Bohr'schen Magneton μ_B und g_e dem Landé-Faktor für ein freies Elektron $g_e \approx 2,00232$. Das entartete Energieniveau eines einzelnen Elektrons spaltet sich abhängig von der Magnetquantenzahl $m_s = \pm 1/2$ und der Stärke des Magnetfeldes B_0 in zwei Energieniveaus auf (vgl. Abb.8).^{92,97-101}

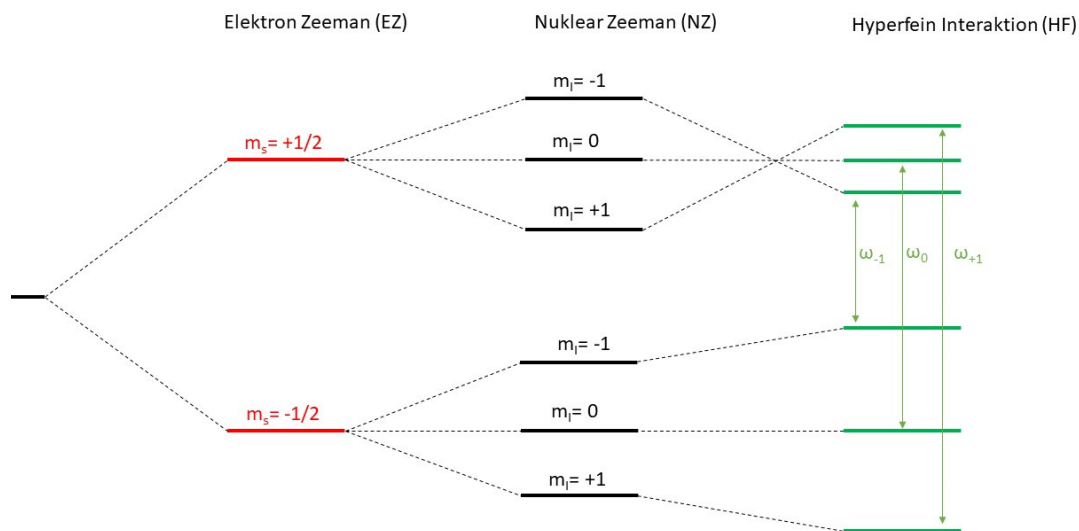


Abbildung 8 Energie Diagramm für ein Spinsystem $S=1/2$ mit Zeeman Aufspaltung Zeeman Kernaufspaltung und Hyperfeinaufspaltung. Mit erlaubten Übergängen (grüne Pfeile) welche zu einem drei Linien Spektrum führen

Deshalb kann das magnetische Moment des Elektrons zwei Orientierungen relativ zum Magnetfeld einnehmen. Erstens (α) antiparallel ($m_s=+1/2$) oder zweitens (β) Parallel ($m_s=-1/2$). Die Boltzmann-Verteilung liefert die relative Population n für die jeweiligen Energiezustände

$$\frac{n_\alpha}{n_\beta} = e^{-\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right)} \quad (8)$$

Die Resonanzbedingung erklärt, dass ein Übergang zwischen Energie-Niveaus stattfindet, wenn die Energie gleich der Differenz der Niveaus ist. Die Energiedifferenz zwischen den beiden Energieniveaus ist definiert als:

$$\Delta E = h * \nu = g_e * \mu_B * B_0 \quad (9)$$

Daher führt das Einstrahlen einer elektromagnetischen Welle mit der Frequenz ν zu einer Änderung des Spinquantenzustands des Elektrons von β zu α .¹⁰²

Das Grundprinzip der EPR ist die Detektion der vom Elektron absorbierten Energiemenge ΔE , praktisch wird das paramagnetische System in Resonanz gebracht. Dies wird durch Einstrahlen einer konstanten Mikrowellenfrequenz, bei gleichzeitiger Variation des Magnetfeldes erreicht, was zu einer Trennung der Energieniveaus führt. Zur Verbesserung des Signal-Rausch Verhältnisses des Spektrums wird das Magnetfeld zusätzlich durch ein sinusförmiges Feld mit einer Amplitude dB und einer Frequenz von $\nu = 100$ kHz moduliert. Die Modulation führt zur Detektion der ersten Ableitung des Absorptionssignals.^{96,102–104}

In einem paramagnetischen System mit einem ungepaarten Elektron wird der energetische Zustand des Elektronenspins durch das äußere Magnetfeld, andere Elektronenspins, sowie Kernspins in unmittelbarer Nähe beeinflusst. Der energetische Eigenwert des paramagnetischen Systems kann durch Lösen der Schrödinger-Gleichung beschrieben werden.¹⁰⁵

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \psi(r, t) = \hat{H} \psi(r, t) \quad (10)$$

Der statische Spin-Hamilton-Operator \hat{H} enthält alle magnetischen Wechselwirkungen des Elektronenspins.¹⁰⁵

$$\hat{H}(S) = \hat{H}_{ez} + \hat{H}_{zfs} + \hat{H}_{hf} + \hat{H}_{nz} + \hat{H}_{nq} + \hat{H}_{nn} \quad (11)$$

Angeordnet in absteigender Reihenfolge ihres Beitrags zum Gesamtenergiezustand werden die einzelnen Beiträge zu \hat{H} im Folgenden erläutert.

Die Interaktion des Elektronen-Spins mit dem externen magnetischen Feld wird vom Elektronen-Zeeman-Term beschrieben.

$$\hat{H}_{ez} = \frac{\mu_B}{\hbar} B_0^T g S \quad (12)$$

Durch die Orientierungs-Abhängigkeit des angelegten magnetischen Feldes B_0 und des Elektronenspinoperators S hat g einen Vektor mit 3x3 Komponenten. Euler-Winkel-Transformation mit drei Eulerwinkeln α , β und γ führt zu einer diagonalisierten Form des g -Vektors.¹⁰⁵

$$g = \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} g_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & g_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & g_{zz} \end{pmatrix} \quad (13)$$

Der gemittelte g -Wert, der bei schneller isotroper Rotation in Lösung angewendet wird, wird als isotroper Landé-Faktor g_{iso} bezeichnet.¹⁰⁵

$$g_{iso} = (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})/3 \quad (14)$$

Mehrere ungepaarte Elektronen in einem Atom führen zu einer Aufspaltung der Energiezustände ohne externes Magnetfeld, dieses Phänomen wird als Nullfeldaufspaltung (\hat{H}_{zfs}) bezeichnet. Durch Erzeugen eines intrinsischen Magnetfeldes kommt es zu Wechselwirkung mit den Elektronenspins, dies ist der Fall in Festkörpern oder in Systemen mit einem Gesamtspin $S \geq 1$. Im Gegensatz dazu kommt es bei Systemen mit kubischer Symmetrie $S \leq 2$ zu einem Wegfall des Terms.¹⁰⁵

Die Interaktion mehrerer ungepaarter Elektronenspins unterschiedlicher Atome ist definiert als Elektron-Elektron-Wechselwirkung (\hat{H}_{ee}). Die Interaktion wird in Dipol-Dipol-Wechselwirkung und Austausch-Wechselwirkung eingeteilt. Dipol-Dipol-Wechselwirkungen sind die Interaktionen von weit entfernten Elektronen. Die Ausrichtung ihrer Spinnmomente beeinflussen sich nicht gegenseitig und ihre Energie ist proportional zur dritten negativen Potenz ihres Abstandes r^{-3} . Kommt es zu einem quantenmechanischen Austausch der Spin-Ausrichtung, spricht man von Spinaustausch-Interaktion, sie kommt nur zustande, wenn sich die ungepaarten Elektronen in unmittelbarer Nähe zueinander befinden.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

Die Interaktion des Kern Dipolmoments mit dem Dipolmoment des freien Elektrons führt zur Hyperfein-Aufspaltung des Energieniveaus und wird als Hyperfein-Wechselwirkung (\hat{H}_{HF}) bezeichnet. Im EPR-Spektrum kann gemäß der Spinmultiplizität $2 * I + 1$ mit I als Kernspinquantenzahl und der quantenmechanischen Auswahlregel $\Delta m_S = \pm 1$ und $\Delta m_I = \pm 0$ eine entsprechende Anzahl an Absorptionslinien beobachtet werden. In Analogie zur Elektron-Elektron-Wechselwirkung kann auch die Hyperfein-Wechselwirkung in eine Dipol-Kern- (\hat{H}_{DN}) und eine Fermi-Kontakt-Wechselwirkung (\hat{H}_F) zerlegt werden. Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang:¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

$$\hat{H}_{HF} = \hat{H}_{DN} + \hat{H}_F = \sum S * A_K * I \quad (15)$$

Mit I dem Kernspinoperator und A_K dem Hyperfeinkopplungstensor, der sich aus den diagonalen Komponenten A_{XX} , A_{YY} und A_{ZZ} zusammensetzt. Ob die Hyperfein-Wechselwirkung von der Dipol-Dipol- oder dem Fermi-Kontakt abhängig ist entscheidet die Entfernung vom freien Elektron zum Atomkern. Aus den Abständen der Nulldurchgänge der Resonanzsignale kann die richtungsabhängige Hyperfeinkopplungskonstante a_{iso} bestimmt werden.^{105,107}

$$a_{iso} = (A_{XX} + A_{YY} + A_{ZZ})/3 \quad (16)$$

Allgemein beruht die isotrope Hyperfeinkopplung auf dem direkten Kontakt zwischen ungepaarten Elektronen und dem Kern, ihr Abstand wird durch die Polarität der Umgebung beeinflusst.^{105,107}

Die Kern-Zeeman-Wechselwirkung (\hat{H}_{NZ}) beschreibt den Einfluss eines externen Magnetfeldes auf den Kernspin I, der mit einem Elektronenspin S durch Hyperfein-

Wechselwirkung gekoppelt ist. \hat{H}_{NZ} spielt eine Rolle, wo anisotrope Anteile nicht ausgemittelt werden, z.B. in Festkörpern oder bei Doppelresonanz-Experimenten. In Lösung sorgt er für das typische Aufspaltungsmuster der Spektren z.B. drei Linien bei Nitroxid-Radikalen. In Flüssigkeiten entspricht die Quantisierungsrichtung der Kern-Zeeman -Interaktion und ist parallel zur Richtung des externen Magnetfeldes ausgerichtet.^{105,107} Die nicht kugelförmige Symmetrie der Ladungsverteilung führt zu einem Quadrupolmoment, bei Kernspins $I \geq 1$ tritt eine Kern Quadrupol-Wechselwirkung (\hat{H}_{NQ}) auf. Es kommt zu einer Wechselwirkung mit dem elektrischen Feldgradienten am Kernort, diese ist normalerweise vernachlässigbar klein.^{105,107,108}

2.3.3.1 continuous wave Electron Paramagnetic Resonance

Bei der continuous wave (cw) Electron Paramagnetic Resonance Spektroskopie wird eine Probe, die ungepaarte Elektronen enthält, mit einer konstanten Mikrowelle in einem variierenden Magnetfeld bestrahlt. Durch die Aufzeichnung der absorbierten Mikrowellenleistung als Funktion des Magnetfeldes erhält man das cw-EPR-Spektrum. Im Zuge dieser Arbeit wurden stabile Nitroxid-Radikale verwendet und anhand dieser wird die Analyse der Spektren näher erläutert. Durch Einführen paramagnetischer Zentren in die Probe durch Spinmarker können EPR-Spektren aufgenommen werden. In den meisten Fällen handelt es sich bei diesen Spinmarkern um Nitroxid-Radikale mit geringem Molekulargewicht, die aufgrund sterischer Hinderung chemisch stabil sind. Die ungepaarten Elektronen der Nitroxide halten sich bevorzugt in den Sauerstoff- und Stickstofforbitalen auf. Die x-Achse verläuft entlang der NO-Bindung, die z-Achse entlang der $2p_z$ -Orbitale und die y-Achse senkrecht zur xz-Ebene.^{105,109,110}

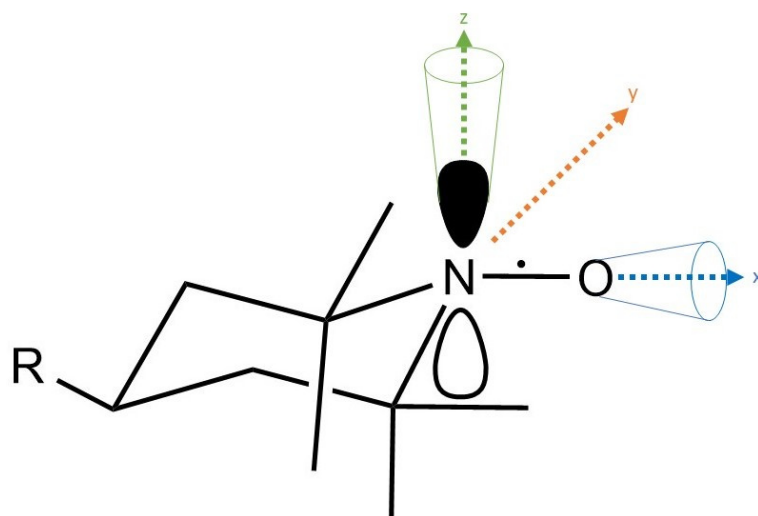


Abbildung 9 Struktur einer Nitroxid-Spinsonde mit angedeuteter Tensorhauptachse und ihre Rotation entlang der Achsen. R kann ein Rest sein, der je nach Anwendung variiert werden kann

Der Vorteil von Nitroxid-Radikalen ist, dass der Spin-Hamilton-Operator mit der Elektron-Zeeman- und Hyperfein-Wechselwirkung vereinfacht werden kann, um das Spinsystem zu charakterisieren. Aus der Kernspinquantenzahl für ^{14}N -Isotope $m_I = -1, 0, +1$ ergibt sich $I(^{14}\text{N}) = 1$ weshalb jedes Zeeman-Energieniveau in drei Unterniveaus aufgespalten wird, die durch Hyperfein-Wechselwirkungen verursacht werden. Weshalb sich bei schneller isotroper Rotation ein typisches drei Resonanzlinien Spektrum bildet, die um a_{iso} separiert sind.^{105,107,109,110}

Die chemische Umgebung der Spinsonde beeinflusst den Aufenthaltsort des ungepaarten Elektrons, normalerweise befindet es sich anstelle der π -Bindung zwischen Stickstoff und Sauerstoff. Allerdings lässt sich die Elektronendichte in einer polaren Umgebung durch Wasserstoffbrückenbindung oder Dipol-Dipol-Wechselwirkung in Richtung des Stickstoffs verschieben, daraus resultiert eine größere Hyperfeinkopplungskonstante. Mittels isotroper Hyperfeinkopplungskonstante a_{iso} wird die Umgebungspolarität der Spinsonde bestimmt. Für Nitroxide ist die Verschiebung axial und kann mit guter Näherung ($A_{XX} \approx A_{YY}$) vereinfacht werden.^{107,111,112}

$$a_{\text{iso}} = (2 * A_{XX} + A_{YY})/3 \quad (17)$$

Im Gegenzug bedeutet es, dass die Kopplungskonstante in hydrophober Umgebung abnimmt.^{107,111}

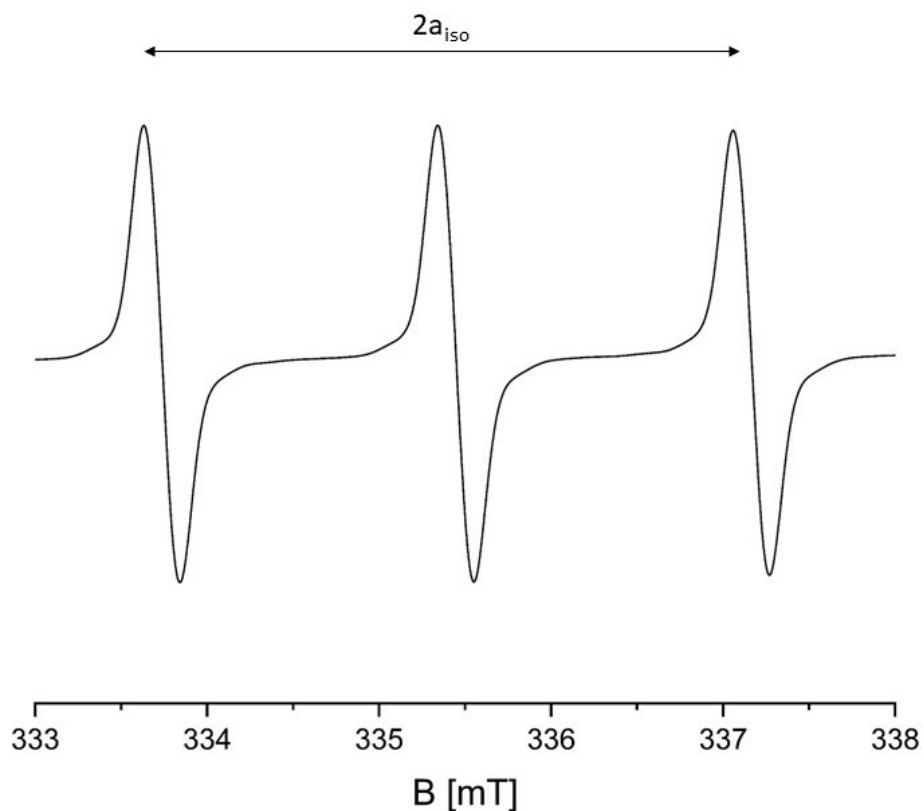


Abbildung 10 cw-EPR Spektrum mit der Hyperfeinkopplungskonstante a_{iso} . hier vereinfacht als $2a_{\text{iso}}$ als Abstand zwischen Hochfeld-Peak und Tieffeld-Peak.

Für das EPR- Spektrum ist die molekulare Dynamik der Spinsonde von großer Bedeutung für die Untersuchung der möglichen Wechselwirkungen. Die isotrope Bewegung von Spinsonden wird durch die Rotationskorrelationszeit τ , die aus der Brown'schen Rotationsdiffusion mit der Stokes-Einstein Diffusion charakterisiert:^{109,111–113}

$$\tau = \frac{1}{6 * D} \quad (18)$$

Mit dem Rotationsdiffusionskoeffizient D. Für nicht sphärische Moleküle muss ein anisotroper Rotationsdiffusionstensor D eingeführt werden, der aus dem geometrischen Mittel der Tensorhauptwerte die mittlere Rotationskorrelationszeit berechnet.^{111,113}

$$\tau_c = \frac{1}{6^3 \sqrt{(D_{XX} D_{YY} D_{ZZ})}} \quad (19)$$

Dazu wird mittels der Eulerwinkel α , β und γ das Hauptachsensystem des Rotationsdiffusionstensors in das Molekülkoordinatensystem überführt. Für die detaillierte Auswertung siehe Kapitel 4.5.1.^{111–114}

2.3.3.2 Puls EPR

Der Nachteil der cw-EPR-Spektroskopie ist die Schwierigkeit der Unterscheidung zwischen den einzelnen Wechselwirkungsbeiträgen des Spin-Hamilton-Operators. Puls-techniken bieten eine Lösung für dieses Problem, bei ihnen wird eine Probe mit kurzen Mikrowellenpulsen bestrahlt und anschließend die zeitaufgelöste Reaktion gemessen. Dies ermöglicht eng beieinander liegende Spektrallinien aufzulösen und eignet sich zur Messung von Relaxationseffekten. Dadurch können spezifische Wechselwirkungen selektiv betrachtet werden, z. B. ESEEM-Experimente die Elektron-Kern-Wechselwirkungen oder DEER-Experimente, die dipolare Elektron-Elektron-Wechselwirkungen zeigen. Zur Beschreibung von Puls-Experimenten mit Bewegung der Magnetisierung eignet sich das Vektorbild. Die Pulse ändern den Spinzustand der als Änderung des Winkels des Magnetisierungsvektors in Bezug auf das externe Magnetfeld B_0 beschrieben werden kann. Die Drehung des Magnetisierungsvektors ist von der Pulslänge und der Magnetfeldamplitude abhängig.¹⁰⁶

Das Hahn-Echo-Experiment beschreibt ein Einfaches zwei Puls Experiment, bei der das Primärecho der anfänglichen Magnetisierung nach einer Impulssequenz von $\frac{\pi}{2} - \tau - \pi - \tau$ detektiert wird, wobei τ die freie Evolutionszeit ist.^{106,115,116}

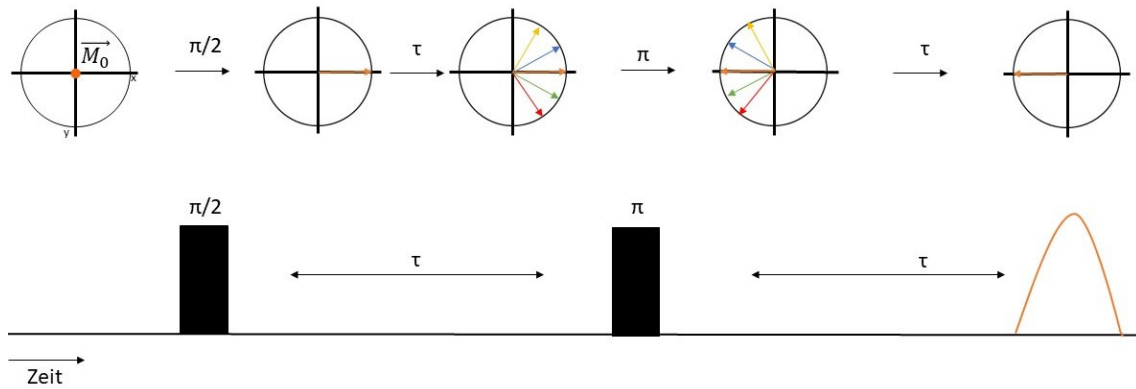


Abbildung 11 Schematischer Ablauf des Hahn-Echo-Experiments bis zur Detektion des Primärechos

Abbildung 11 zeigt die Hahn Echo-Sequenz. Am Anfang ist der Magnetisierungsvektor parallel zum statischen Magnetfeld und befindet sich im thermodynamischen Gleichgewicht. Der $\pi/2$ -Puls ändert die Magnetisierung entlang der y -Achse um 90° . Mit Beginn der Evolutionszeit τ präzedieren die Spinpakete mit ihrer jeweiligen Larmor-Frequenz, was zu einer Defokussierung der transversalen Magnetisierung führt. Der π -Puls ändert den Vektor der y -Achse um 180° , ohne die Richtung der Rotation zu verändern, was zu einer Refokussierung der Spinpakete in der darauffolgenden Evolutionszeit führt. Aus den nun aufeinander zulaufenden Spinpaketen wird das Elektronenspin-Echo (ESE) detektiert. Über ein zwei Puls Experiment wird das Echo in Abhängigkeit der Zeit in einem definierten Magnetfeld gemessen. Der daraus ermittelte exponentielle Abfall, ist definiert als die Phasengedächtniszeit T_m , von der die Echointensität anhängig ist.^{115,116}

Double Electron Electron Resonance (DEER) EPR erlaubt es, den Abstand zwischen Spins über schwache dipolare Kopplung zwischen zwei ungepaarten Elektronen zu messen. Durch Pulse mit zwei unterschiedlichen Frequenzen lässt sich die Elektron-Elektron-Wechselwirkung von anderen Interaktionen trennen und erlaubt die Bestimmung von Distanzen im Bereich von 1,5-8 nm, in Abhängigkeit von r^3 . Folgende vier Puls Sequenz ohne Totzeit wurde für alle DEER-Experimente verwendet:¹¹⁵⁻¹²⁰

$$\pi/2(\nu_{obs}) - \tau_1 - \pi(\nu_{obs}) - t' - \pi(\nu_{pump}) - (\tau_1 + \tau_2 - t') - \pi(\nu_{obs}) - \tau_2 - Echo \quad (20)$$

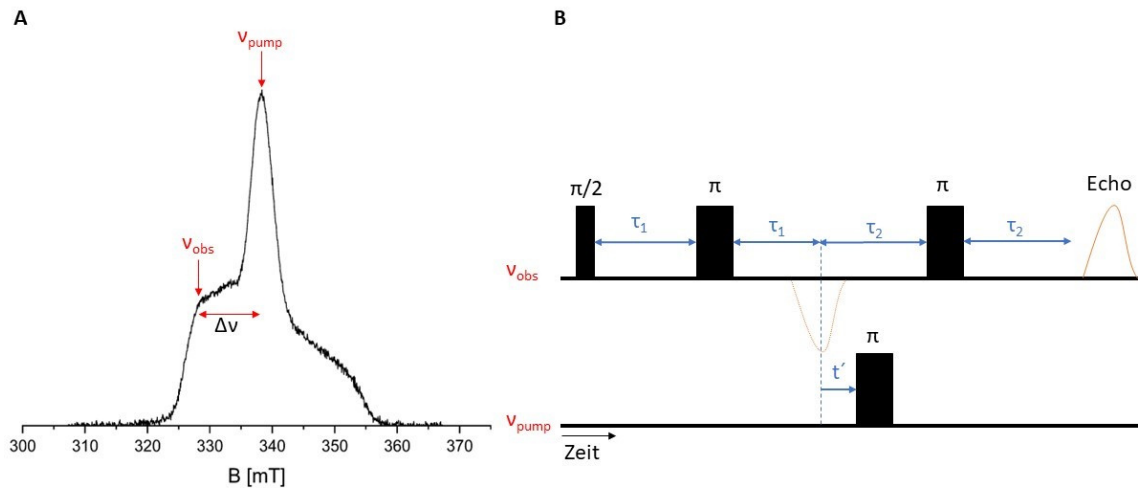


Abbildung 12 A: Ergebnis des Hahn-Echo-Experiments daraus werden Pumpfrequenz und Beobachterfrequenz ermittelt. B: Graphische Darstellung des Vier-Puls-Experiments für die DEER-Messung

Unter der Annahme, dass die Beobachterfrequenz nur A-Spins und die Pumpfrequenz nur B-Spins anregt, erzeugt die Beobachterfrequenz ein refokussiertes Echo aus drei Pulsen der Beobachterfrequenz ν_{obs} mit konstanten Evolutionszeiten τ_1 und τ_2 . Durch den Pumpimpuls mit der Pumpfrequenz ν_{pump} kommt es zur Inversion der Spinzustände, wobei die Bestrahlungszeit des Pumpimpulses zwischen der Position des Primärechos und des π -Pulses der Pumpsequenz variiert wird. Die Änderung der Präzessionsfrequenz der A-Spins um die Elektron-Elektron-Wechselwirkung ist eine Folge der Invertierung. Es entsteht ein Phasenunterschied der Magnetisierung von $\Delta\phi = \nu_{DD} * t'$. Die Echointensität des refokussierten Echos wird als Funktion des Pumpimpulses zur Zeit t' aufgenommen. Basierend auf,

$$\nu_{DD} = \frac{\mu_0 * g_A * g_B * \mu_B^2}{4 * \pi * n} * \frac{1}{r_{AB}^3} \quad (21)$$

werden die Abstandsdaten aus dem Datensatz extrahiert.^{106,117–121}

2.3.4 Infrarot-Spektroskopie

Bei der Infrarotspektroskopie (IR) werden durch Absorption von Infrarotstrahlung Molekülschwingungen und -rotationen angeregt. Es gibt verschiedene Methoden zur Messung von Rotationen und Schwingungen von Molekülen, erstens die IR-Spektroskopie, bei der direkt die Absorption gemessen wird oder zweitens Raman-Spektroskopie, bei der die indirekte Strahlung gemessen wird. Die für Strukturaufklärung interessanten Banden befinden sich in einem Wellenlängenbereich $\lambda=2,5-1,5 \mu\text{m}$. Man könnte dies einfach im IR-Spektrum darstellen, aber man verwendet üblicherweise die reziproke Wellenlänge, die sogenannte Wellenzahl $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}]$. Sie gibt an, wie viele Wellen der Infrarotstrahlung auf einen Zentimeter kommen.^{81,122–125}

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (22)$$

Der Vorteil bei der Verwendung der Wellenzahl ist, dass sie proportional zur Frequenz ν und somit auch direkt proportional zur Energie ΔE ist. Daraus ergibt sich folgende Beziehung:

$$c = \lambda * \nu \quad \nu = \frac{c}{\lambda} = c * \tilde{\nu} \quad (23)$$

$$\Delta E = h * \nu = \frac{h * c}{\lambda} = h * c * \tilde{\nu} \quad (24)$$

Mit c der Lichtgeschwindigkeit, h dem Planck'schen Wirkungsquantum, ν der Frequenz, λ der Wellenlänge und $\tilde{\nu}$ der Wellenzahl. Der übliche Bereich eines IR-Spektrums liegt im Wellenzahlbereich von $4000-800 \text{ cm}^{-1}$. Die IR-Spektroskopie ist eine einfache und schnelle Methode zur Identifizierung einer Substanz, da funktionelle Gruppen in einem Molekül charakteristische Absorptionsbanden zeigen. Das größte Problem hierbei ist, dass sich keine Aussagen über den Rest des Moleküls treffen lassen. Um die physikalischen Grundlagen hinter der Entstehung eines IR-Spektrums zu verstehen, kann auf ein einfaches Modell aus der Mechanik zurückgegriffen werden.^{81,122,126}

Man stellt sich die Atome eines Moleküls als Punktmassen m_1 und m_2 vor, die durch eine elastische Feder verbunden sind. Dehnt man nun den Gleichgewichtsabstand r_0 um den Betrag $x_1 + x_2$ entsteht die rücktreibende Kraft K . Lässt man los, schwingt das System um seine Gleichgewichtslage. Durch Anwendung des Hooke'schen Gesetz ist die rücktreibende Kraft näherungsweise proportional zur Auslenkung Δr .

$$K = -k * \Delta r \quad (25)$$

Das negative Vorzeichen kommt davon, dass die Kraft entgegen der Ausrichtung wirkt. K ist im mechanischen Modell die Federkonstante und entspricht im Molekül der Bindungsstärke zwischen den Atomen.^{81,122}

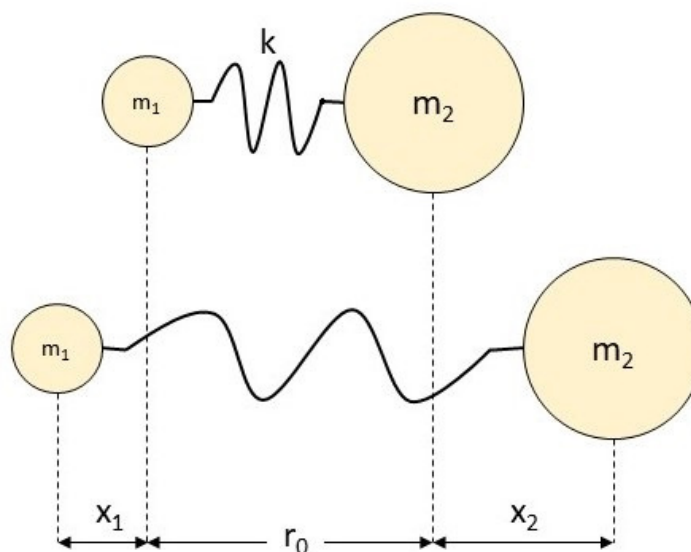


Abbildung 13 Mechanisches Modell eines schwingenden zweiatomigen Moleküls

Die Energie der Schwingung kann mit dem Modell des harmonischen Oszillators als Funktion des Kernabstandes r berechnet werden

$$U = \frac{1}{2}K * x^2 = 2\pi^2\mu\nu_{osc}^2 * x^3 \quad (26)$$

Mit U der potenziellen Energie, K der Kraftkonstante, x der Auslenkung, $\mu = \frac{m_1 * m_2}{m_1 + m_2}$ der reduzierten Masse und ν_{osc} der Schwingfrequenz des Oszillators. Aus der Gleichung kann die Schwingfrequenz nach dem mechanischen Modell für ein zweiatomiges Molekül berechnet werden. Für größere Moleküle ist diese einfache Beziehung nicht anwendbar, doch kann man über den Zusammenhang von Bindungsstärke und Schwingfrequenz die Absorptionsfrequenzen im IR-Spektrum qualitativ abschätzen.^{81,122}

Das klassische Modell des harmonischen Oszillators stößt bei der Betrachtung molekularer Schwingungsvorgänge an seine Grenzen, da es nicht die Schwächung der Bindung bei der Absorption höherer Energiebeträge berücksichtigt. Deswegen geht man zum Modell des anharmonischen Oszillators über. Dieses besagt, dass mit zunehmendem Abstand r die Bindungskräfte des schwingenden Systems schwächer werden. Des Weiteren muss die gequantelte Energieabsorption berücksichtigt werden, das hat zur Folge, dass ein molekularer anharmonischer Oszillator durch diskrete Energieaufnahme nur bestimmte Schwingzustände einnehmen kann. Bei einer Quantenzahl $n=0$ befindet sich das schwingende System im Grundzustand, alle Abweichung vom Gleichgewichtszustand r_0 können für konstante Temperatur durch Heisenberg'sche Unschärfe erklärt werden. Über die Schrödinger-Gleichung kann der absorbierte Energiebetrag ΔE_{vib} zweier benachbarter Energieeigenwerte E_1 und E_n berechnet werden.^{81,122}

$$E_{vib} = h * \nu_{osc} \left(n + \frac{1}{2} \right) = \frac{n}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \left(n + \frac{1}{2} \right) \quad (27)$$

Mit $n=1, 2, 3, \dots$ $\Delta E_{vib} = E_{n+1} - E_n = h * \nu_{osc} n$ der Schwingungsquantenzahl, h dem Planck'sche Wirkungsquantum und E_{vib} der Schwingungsenergie. Bei der Anregung wird das Molekül unter Absorption eines Lichtquants vom Schwingungszustand n in einen höheren z.B. $n+1$ versetzt. Der Abstand zwischen den Schwingungsniveaus wird mit steigendem n kleiner, da die Bindung mit zunehmender Dehnung schwächer wird, bis die Dissoziationsgrenze erreicht ist. Bei einem Übergang von $n=0$ zu $n=1$ spricht man von einer Grundschiwingung, beim sogenannten Doppelquantenübergang von $n=0$ zu $n=2$ spricht man von der ersten Oberschiwingung, ihre Frequenz ist ca. doppelt so groß wie die Grundschiwingung.^{81,122}

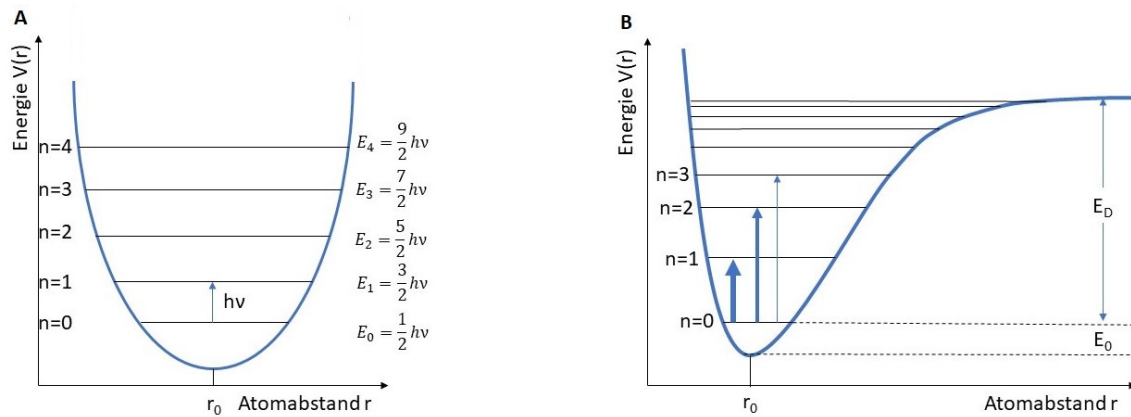


Abbildung 14 A: Potentialkurve des harmonischen Oszillators mit diskreten Schwingungsniveaus. B: Potentialkurve des anharmonischen Oszillators

Doppel- oder Mehrquantenübergänge nehmen mit zunehmender Ordnung ab, weshalb die Absorptionsbandenintensität schwach ist. Um im IR eine Schwingung anzuregen, muss nicht nur die Resonanzbedingung ($\Delta E = h \cdot \nu$) erfüllt sein, sondern das Dipolmoment muss sich während einer Schwingung periodisch ändern, um eine sichtbare Bande zu generieren, deshalb sind die Bandenintensitäten stark von der Symmetrie des Moleküls abhängig. Für diese Arbeit wurde ein ATR-IR verwendet, welches im nächsten Kapitel explizit erklärt wird.^{81,122}

2.3.4.1 Attenuated Total Reflection Infrarot Spektroskopie (ATR-IR)

Bei der Attenuated Total Reflection Infrarot Spektroskopie (ATR-IR), früher auch Internal Reflection Spektroskopie (IRS) genannt, handelt es sich um eine spektroskopische Methode, bei der die Oberfläche einer Probe mit einem internen Reflexionselement (IRE) mit hohem Brechungsindex in Kontakt gebracht wird. Da die Strahlung zwischen Probe und IRE „gefangen“ ist, kann sie nur mit der Oberfläche der Probe interagieren, die eindringtiefen liegen zwischen einigen Nanometern bis zu Mikrometern. Dies macht die ATR-IR-Spektroskopie zu einer Methode mit einem breiten Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten, z.B. zur Verfolgung von chemischen Reaktionen, chemischer Zusammensetzung und zur qualitativen und quantitativen Analyse.¹²⁵

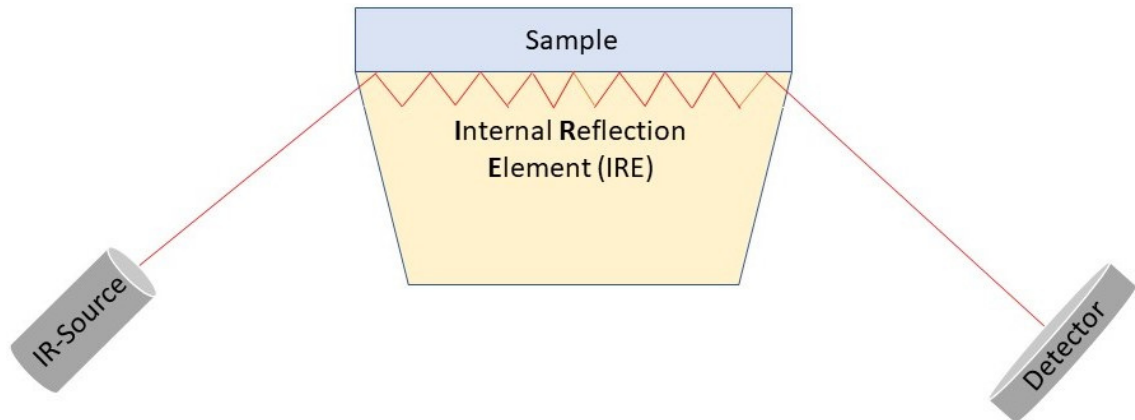


Abbildung 15 Schematische Darstellung eines ATR-IR Aufbaus mit Strahlungsquelle, Probe, IRE und Detektor

Wie schon bei der Refraktometrie spielt bei dieser Methode der Grenzwinkel der Totalreflexion θ_c eine große Rolle. Der Einfallswinkel θ beträgt 0° bis 90° , daraus wird der Grenzwinkel der Totalreflexion in Abhängigkeit vom Verhältnis der Brechungsindices von Probe (n_2) und IRE (n_1) zueinander berechnet.¹²⁵

$$\theta = \sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (28)$$

Der Grenzwinkel wird von höherem Einfallswinkel angenähert, je weiter man sich vom Grenzwinkel entfernt, desto verzerrter erscheint das Spektrum. Diese Verzerrung des Spektrums hängt mit der Eindringtiefe der einfallenden Strahlung zusammen. Die einfallende Strahlung durchdringt nicht die Probe, sondern verhält sich wie eine evaneszente Welle oder ein exponentiell abfallendes elektrisches Feld. Die Feldamplitude verringert sich nach folgendem Zusammenhang:¹²⁵

$$E = E_0^{(-\gamma z)} \quad (29)$$

Mit E der Amplitude in der Probe, z der Eindringtiefe, γ einer Konstanten und E_0 der Amplitude an der Probenoberfläche. Die Intensität der evaneszenten Welle verringert sich, je tiefer sie in die Probe eindringt, weshalb sie schon bei geringen Eindringtiefen vernachlässigbar klein wird. Die Eindringtiefe dp ist die Strecke, die die Strahlung in der Probe zurücklegt, dass daraus resultierende Spektrum wird durch folgende Gleichung beschrieben:¹²⁵

$$dp = \frac{\lambda/n_1}{2\pi(\sin^2\theta - (n_2/n_1)^2)^{\frac{1}{2}}} \quad (30)$$

Mit λ der Wellenlänge, θ dem Einfallswinkel, n_2 Brechungsindex der Probe und n_1 dem Brechungsindex des IRE. dp ist unabhängig von der Polarisation der Strahlung und in ATR-Experimenten ist es die „geschätzte“ Eindringtiefe, aus der der Hauptteil der spektralen Informationen kommt. Es handelt sich also um einen Durchschnittswert an

spektralen Informationen einer abklingenden evaneszenten Welle mit abnehmendem Beitrag tieferer Schichten bis d_p erreicht wurde.¹²⁵

Die Anzahl der Reflexionen hängt von der Geometrie des IRE ab, je mehr Reflexionen der einfallenden Strahlung, desto höher ist die Intensität des entstehenden Spektrums. Die Anzahl der Reflexionen kann nach folgender Formel berechnet werden:¹²⁵

$$N = \frac{l}{d} \cot \theta \quad (31)$$

Mit N der Anzahl an Reflexionen, l Länge des IREs, d der Dicke des IREs und θ der Einfallswinkel. ATR-Spektren haben niedrige Intensitäten für kürzere Wellenlängen und hohe Intensitäten bei langen Wellenlängen, was zu einer gewissen Wellenlängenabhängigkeit führt. Dieses Problem kann vermieden werden, indem IREs aus Materialien mit hohem Brechungsindex, wie z.B. Germanium, Zinkselenid, Thalliumbromidiodid (KRS-5), Silicium oder Diamant verwendet werden. Bei modernen ATR-IR-Spektrometern gibt es spezielle Software, die eine automatische Korrektur dieser Wellenlängenabhängigkeit ermöglichen. Einer der größten Vorteile der ATR-IR ist, dass die Probe nicht durchstrahlt werden muss, was die Messung von nicht transparenten Materialien ermöglicht. Des Weiteren sind Messungen mit Polarisation in alle drei Raumrichtungen möglich, dies liefert Informationen über präferierte Ausrichtung und Anisotropie der Probe. Einer der größten Nachteile dieser Methode ist, dass die Probe in Kontakt mit dem IRE gebracht werden muss. Durch Kontamination der Oberfläche kann es zu falschen Ergebnissen kommen, da sich die Konzentration an der Oberfläche durch Diffusion verändern könnte. Trotzdem handelt es sich bei der ATR-IR-Spektroskopie um eine schnelle und robuste Methode zur Identifikation von Substanzen.¹²⁵

2.3.5 Brechungsindex und Refraktometrie

Refraktometrie bezeichnet die spektroskopische Methode zur Bestimmung des Brechungsindex. Der Brechungsindex oder auch Brechzahl genannt ist das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum zur Lichtgeschwindigkeit in einem lichtdurchlässigen Medium. Die Geschwindigkeit hängt von der Dichte und Beschaffenheit des Mediums ab. Die Absolute Brechzahl ist definiert als:

$$n_0 = \frac{c_{Vak}}{c_{Med}} \quad (32)$$

Da es in der Praxis kompliziert ist, den Brechungsindex gegen Vakuum zu messen, greift man auf die relative Brechzahl zurück, welche gegen Luft gemessen wird.¹²⁷

Trifft ein Lichtstrahl im Einfallswinkel i_1 auf die Grenzfläche zwischen zwei Medien, wird er aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeiten gebrochen, daraus ergibt sich der Brechungswinkel i_2 . Beide Winkel gehorchen dem Snellius'schen Brechungsgesetz:

$$n_1 * \sin i_1 = n_2 * \sin i_2 \quad (33)$$

Aufgrund zunehmender Dispersion bei abnehmender Wellenlänge der elektromagnetischen Strahlung ist der Brechungsindex von der Wellenlänge λ des einfallenden Lichts abhängig. Der Brechungsindex wird üblicherweise für die Wellenlänge der Natrium-D-Linie von $\lambda = 589 \text{ nm}$ angegeben. Da die Dichte der meisten Stoffe temperaturabhängig ist, ist auch der Brechungsindex temperaturabhängig. Die Dichte nimmt mit steigender Temperatur ab, was dazu führt, dass der Temperaturkoeffizient der Brechzahl $\frac{dn}{dT}$ negativ ist. Für Gase ist der Brechungsindex zusätzlich druckabhängig, da dieser die Gasdichte beeinflusst.¹²⁷

Der Brechungsindex wird hauptsächlich mit Hilfe des Grenzwinkels der Totalreflexion gemessen. Wie zuvor erwähnt, folgt die Brechung des Lichts an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien dem Snellius'schen Brechungsgesetz.

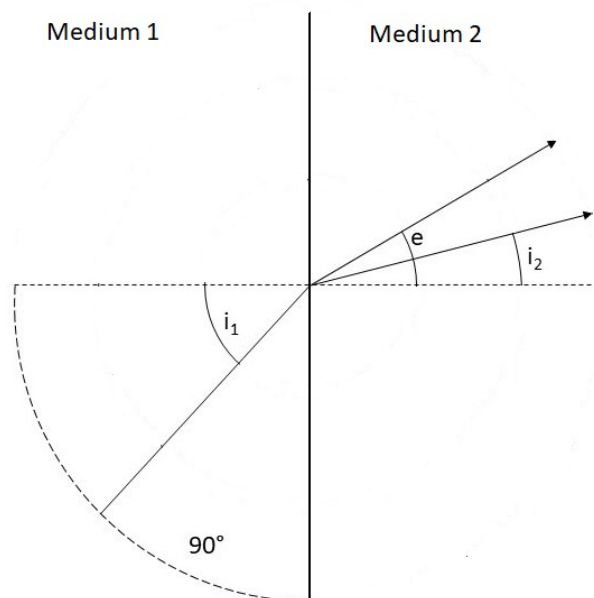


Abbildung 16 Schematischer Eintritt eines Lichtstrahls von einem Medium in ein anderes mit Grenzwinkel der Totalreflexion

Der Maximalwert für den Winkel beträgt $i_1 = 90^\circ$, folglich erreicht auch i_2 seinen Maximalwert, fortan bezeichnet als e . Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$n_1 * \sin 90^\circ = n_2 * \sin e \quad (34)$$

da $\sin 90^\circ = 1$ folgt:

$$n_1 = n_2 * \sin e \quad (35)$$

oder vereinfacht:

$$n = N * \sin e \quad (36)$$

Der Winkel e in dem optisch dichteren Medium wird als Grenzwinkel der Totalreflexion bezeichnet. Zur Messung des Grenzwinkels werden in der Praxis nicht einzelne Strahlen, sondern ein Mittelwert aus unendlich vielen Strahlen verwendet, um das Verhältnis

n: N oder wenn N bekannt ist, n direkt zu messen. Ein typisches Gerät zur Messung des Brechungsindex ist ein Abbe-Refraktometer.¹²⁷

2.3.6 Small Angle X-Ray Scattering (SAXS)

Kleinwinkel Streuung (SAS) von Röntgenstrahlung (SAXS) oder Neutronen (SANS) ist eine effektive Methode zur Bestimmung von Struktur oder Strukturänderungen von Makromolekülen in Lösung. Von den ersten Streumustern der 1930er, aus denen strukturelle Informationen nicht kristalliner Proben aus Biologie, Physik und Materialwissenschaften gewonnen wurden, haben Verbesserungen der Instrumente und Datenanalyse in den vergangenen Jahren dazu geführt, dass SAS-Methoden zur Charakterisierung von Proteinen eine ähnlich große Rolle spielen wie Röntgenkristallographie oder NMR.^{128,129}

Im speziellen können SAS-Methoden für flexible Systeme wie Multi-Domänen-Proteine mit flexiblen Linkern oder intrinsisch ungeordnete Proteine (IDPs) eingesetzt werden. Die Grundlagen von Streumethoden sowohl SAXS als auch SANS ist die Interaktion von Strahlung mit Atomen in der Probe, wobei die Photonen der Röntgenstrahlung mit Elektronen und die Neutronen mit dem Kern interagieren. Zur Strukturaufklärung werden nur elastische Streueffekte ohne Energieaustausch mit der Probe betrachtet. Photonen der Röntgenstrahlung können als elektromagnetische Wellen betrachtet werden. Zwischen Energie E und Wellenlänge λ gilt folgende Beziehung:¹²⁹

$$E = h * \frac{c}{\lambda} \quad (37)$$

Für strukturelle Studien werden harte Röntgenstrahlen von ca. 10 keV verwendet.¹²⁹

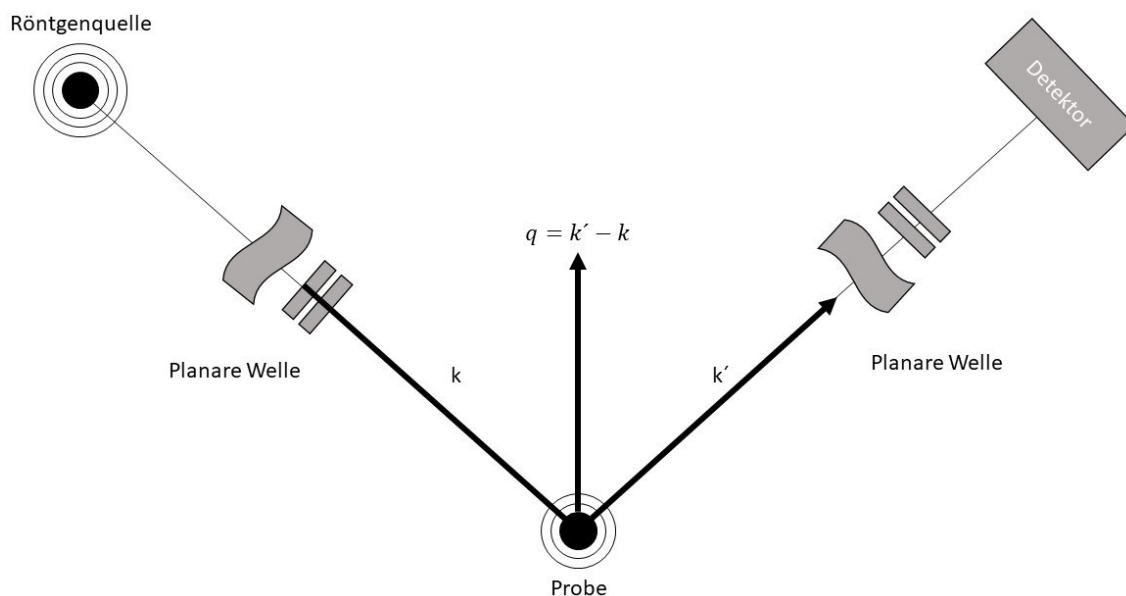


Abbildung 17 Schema eines Röntgenexperimentes

In einem Streuexperiment spielt der Abstand von Probe zur Strahlungsquelle (L_1) und Probe zum Detektor (L_2) eine große Rolle, es handelt sich um makroskopische Größen, die typischerweise in Metern [m] angegeben werden. Mittels der charakteristischen Größe der strukturellen Inhomogenitäten der Probe von $d \approx 10^0 - 10^3 \text{ nm}$ und der Wellenlänge der Strahlung $\lambda \approx 0,1 - 0,15 \text{ nm}$ kommt man zur sogenannten Fresnelnummer:

$$\frac{d^2}{\lambda L_2} \gg 1 \quad (38)$$

Deshalb kann die eingestrahlte Strahlung und die gestreute Strahlung in alle Raumrichtungen als ebene Welle betrachtet werden, obwohl die Gesamtstreuung als divergent angesehen wird.¹²⁹

Wenn ein Objekt mit einer monochromatischen Welle mit einem Vektor $k = |k| = 2\pi/\lambda$ angestrahlt wird, interagieren Atome mit dieser Strahlung und es entstehen sphärische Wellen. Aus diesen gestreuten Wellen ergibt sich der Vektor $k' = |k'| = k$. Da nur elastische Streuung ohne Energietransfer berücksichtigt wird, gilt für die Impulsübertragung:

$$q = k' - k \quad (39)$$

In der Quantentheorie wird die elastische Streuung von Röntgenstrahlung mit der Born'schen Näherung beschrieben, dabei wird angenommen, dass jeder streuende Punkt (Streuer) durch das eingestrahlte Feld und nicht das Gesamtfeld angetrieben wird. Diese kinetische Betrachtung der Streuung trifft nur dann zu, wenn das Streufeld wesentlich kleiner als das eingestrahlte Feld ist. Da biologische Makromoleküle hauptsächlich aus leichten Atomen bestehen, sind die definierten Streulängen ausreichend klein, um Mehrfachstreuung zu ignorieren, sodass man innerhalb der Born'schen Näherung bleibt.¹²⁹⁻¹³³

Die einzelnen Streuer innerhalb eines kohärent streuenden Volumens emittieren Wellen, auf deren Interferenz die elastische Streuung beruht. Die Streuer haben eine korrelierte Position im Raum, durch Umwandlung vom „realen“ Raum mit Laborkoordinaten r in den „reziproken“ Raum mit dem Streuvektor q wird die definierte Struktur des streuenden Objekts über die gestreute Strahlung gemessen. Dieser Umwandlungsvorgang wird in der Born'schen Näherung mittels Fourier-Transformation beschrieben. Das bedeutet für die Reziprozität zwischen Dimensionen, dass reziproke Größen größer werden, je kleiner die reale Größe ist. In Lösung ist die Streuung isotrop und die Streuintensität nur abhängig vom Betrag der Impulsübertragung $|q| = q = (4\pi \sin \theta)/\lambda$. Durch den differentiellen Streuquerschnitt $\frac{d\sigma}{d\Omega}$ wird die Stärke der Wechselwirkung der eingestrahlten Strahlung und Probe beschrieben. Die Streuamplitude ist die Summe der Streuer N an Position r_i mit $(1 \leq i \leq N)$, der von den einzelnen Zentren gestreuten Wellen. Sie werden durch den Faktor b_i als Streulänge beschrieben und besitzen deshalb die Einheit [cm].

Die Streuamplitude ist die Fourier-Transformation der Verteilung der Streuer $A(q)$ und hängt von den individuellen Streuern und der Phase definiert von ihrer Position ab.

$$A(q) = \sum_{i=1}^N b_i \exp(iq \cdot r_i) \quad (40)$$

Angenommen ein Objekt besteht aus N Streuern, die jede Orientierung annehmen können, wird der Phasenfaktor durch folgende Gleichung ausgedrückt:

$$\langle \exp(iq \cdot r_i) \rangle = \frac{\sin(qr)}{qr} \quad (41)$$

Ein Objekt kann durch eine diskrete Verteilung von Streuern dargestellt werden, dabei ist es praktikabler, eine kontinuierliche Verteilung der Streulängendichte $\rho(r)$ (gesamte Streulänge der Atome pro Volumeneinheit) zu verwenden. Je nach Anwendung können beide Ansätze eingesetzt werden.^{128,129}

Die Streulängendichteverteilung ist abhängig von der Interaktion der Strahlung mit Materie, bei harter Röntgenstrahlung findet die Interaktion ausschließlich mit Elektronen statt, da sie im Vergleich zu Protonen eine wesentlich geringere Masse aufweisen. Für ein einzelnes Elektron beträgt der Radius $b = r_0 = 2,82 \cdot 10^{-13} \text{ cm}$. Für ein Atom mit einer radialen Elektronendichte mit der Streulängendichte $\rho(r)$ als Ursprungsort gilt:

$$b_x(q) = r_0 4\pi \int \rho(r) r^2 \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (42)$$

Da $\lim_{x \rightarrow 0} \left(\frac{\sin(x)}{x} \right) = 1$, die Atomare Streulänge in Vorwärtsrichtung ($q = 0$) ist $b_x(0) = Zr_0$ mit Z als Ordnungszahl ist der Grund, weshalb Röntgenstrahlen stärker mit schweren Atomen interagieren. Die Röntgenstreuungslänge sollte Wellenlängen-unabhängig sein, außer die Photonenenergie löst Absorptionsvorgänge im Molekül aus, was zu sogenannter resonanter oder anomaler Streuung führt.¹²⁹

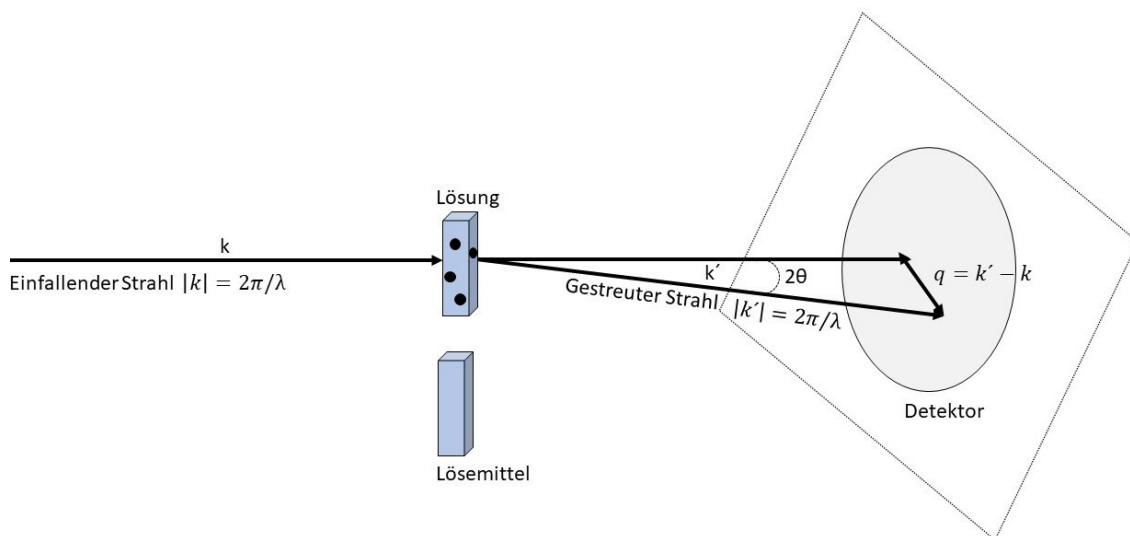


Abbildung 18 Schematische Darstellung eines SAXS-Experiments in Lösung

Für Streuexperimente an Makromolekülen in Lösung ist es praktisch, ihre Streulängendichteverteilung $\rho(r)$ zu bestimmen. Dies erfordert die Messung sowohl des Lösemittels mit und ohne das zu analysierende Makromolekül. Um die Nettostreuung der Partikel zu erhalten, werden die Streumuster voneinander abgezogen. Dabei wird das Lösemittel als merkmallose Matrix mit konstanter Streulängendichte ρ_s angesehen und das Abweichen dieser Streulängendichte wird ausschließlich durch Partikel in der Lösung verursacht.^{42,129,130,133}

$$\Delta\rho(r) = \rho(r) - \rho_s \quad (43)$$

Mittels Fourier-Transformation erhält man die zugehörige Streuamplitude:

$$A(q) = \zeta[\rho(r)] = \int_V \Delta\rho(r) \exp(iqr) dr \quad (44)$$

Die Amplitude kann nicht direkt gemessen werden, sondern nur die Intensität. Für monochromatische Strahlung entspricht dieser der Anzahl an Photonen pro Fläche und Zeit in Richtung 2θ , daraus ergibt sich folgender Zusammenhang:¹²⁹

$$I(q) = A(q) * A^*(q) \quad (45)$$

Für die Intensität die am Detektor gemessen wird, gilt folgende Gleichung:¹²⁹

$$I_{meas}(q) = \frac{I_e(q)}{L_2^2} = \frac{I_0}{L_2^2} * \frac{d\sigma}{d\Omega} \quad (46)$$

Für die Anzahl der Streuer $N_{meas}(q)$ gilt die Anzahl der Photonen in einem Pixel A während der Zeit Δt :¹²⁹

$$N_{meas}(q) = I_e \frac{A}{L_2^2} \Delta t = I_0 \frac{A}{L_2^2} \frac{d\sigma}{d\Omega}(q) \Delta t \quad (47)$$

Diese Funktion beschreibt die Betrachtung eines einzelnen Partikels in der Probe unter der Annahme, dass die Probe aus einer Kombination von identischen Partikeln besteht. Dadurch ist die Gesamtstreuung von der Partikelverteilung in der Probe abhängig. Das bedeutet, die totale Streudichte setzt sich aus einer Funktion für die Partikeldichteverteilung $\Delta\rho(r)$ und einer Funktion von Lage und Orientierung der Partikel $d(r)$ zusammen, daraus ergibt sich:¹²⁹

$$\Delta\rho_{total}(r) = \Delta\rho(r) * d(r) \quad (48)$$

Daraus ergeben sich aus der Fourier-Transformation folgende Gleichungen für Amplitude:

$$A_{total}(q) = \zeta[\Delta\rho(r)] \times \zeta[d(r)] = A(q) * F(q) \quad (49)$$

Und für die Intensität:¹²⁹

$$I_{total}(q) = I(q) * S(q) \quad (50)$$

Wobei $I(q)$ die Struktur des Partikels und $S(q)$ seine Verteilung berücksichtigt. In einem idealen Einkristall haben alle Atome die gleiche Ausrichtung und sind gleichmäßig im Raum verteilt. Das bedeutet alle Streuamplituden der individuellen Partikel können für

alle Interpartikelinterferenzen summiert werden. Das hat zur Folge, dass die totale Streuintensität entlang eines definierten reziproken Gitters verläuft und als diskrete dreidimensionale Funktion $I(q_{hkl})$ für den gesamten Kristall aus einer Streudichteverteilung einer einzelnen Einheit des Kristalls gemessen werden kann. Diese Einheiten werden als Diffraktionsmuster bezeichnet.^{128–130}

Sind die Partikel hingegen zufällig im Raum verteilt und ist ihre Position und Ausrichtung nicht korreliert, wie in Lösung üblich ist, ist die Intensität dieses Ensembles eine kontinuierliche isotrope Funktion proportional der Streuintensität eines Partikels gemittelt über alle Orientierungen:

$$I(q) = [I(q)]_{\Omega} \quad (51)$$

Dies gilt für ausreichend verdünnte Lösungen ohne Interaktion der Moleküle untereinander.¹²⁹

Der zweite Fall beschreibt das Vorliegen von teilverdünnten Lösungen, mit zufällig verteilten aber miteinander interagierenden Partikeln. Solange sie zufällig orientiert sind, bleibt die Funktion isotrop und für sphärische Moleküle bleibt sie ein Produkt von:¹²⁹

$$I_{total}(q) = I(q) \times S(q) \quad (52)$$

Mit dem Streuintensitätsterm $I(q)$ auch als Formfaktor und dem Interferenzterm $S(q)$ als Strukturfaktor bekannt. Für die Analyse der Struktur und Interaktion von Makromolekülen in Lösung sind sowohl der Term für die Streuintensität als auch der Interferenz von großer Bedeutung. Durch Veränderung der Konzentration der Makromoleküle oder Veränderung der Eigenschaften des Lösemittels, z.B. pH-Wert, Ionenstärke usw. können die Terme voneinander unabhängig untersucht werden. Aus der unterschiedlichen Gewichtung der Gesamtstreuintensität kann so bestimmt werden, ob unterschiedliche Partikelgrößen und/oder Ausrichtungen in der Probe vorliegen.¹²⁹

2.4 Physikalische Methoden

Dieses Kapitel der Arbeit befasst sich mit den theoretischen Grundlagen und Messprinzipien der verwendeten physikalischen Methoden

2.4.1 Viskosität und Rheologie

Die Viskosität oder früher auch Zähigkeit einer Flüssigkeit, bezeichnet den auftretenden Fließwiderstand, der aus Reibungskräften entsteht, wenn Moleküle in einem Fluid gegeneinander verschoben werden. Per Definition sind Fluide alle Stoffe oder Stoffgemische, die ein Fließverhalten an den Tag legen, z.B. Flüssigkeiten oder Gase.

Bei konstanter Temperatur ist das Verhältnis von Schubspannung τ und Scherrate $\dot{\gamma}$ eine Materialkonstante.¹³⁴ Dies gilt allerdings nur für idealviskoses- oder Newton'sches Fließverhalten. Ist diese Bedingung erfüllt, kann aus dem Newton'schen Reibungsgesetz,

$$F = \eta * A * \frac{dv}{dx} \quad (53)$$

zwischen zwei laminaren Schichten das Newton'sche Gesetz abgeleitet werden.

$$\tau = \eta * \dot{\gamma} \quad (54)$$

Mit η der Viskosität, $\dot{\gamma}$ der Scherrate und τ der Schubspannung^{134–136}

Die graphische Darstellung des Fließverhaltens wird als Fließkurve bezeichnet, hierbei wird die Scherrate $\dot{\gamma}$ gegen die Schubspannung τ aufgetragen. Aus der Fließkurve wird die Viskositätskurve abgeleitet, dabei wird die Scherrate $\dot{\gamma}$ gegen die Viskosität η aufgetragen, für Newton'sche Fluide ergibt sich eine Ursprungsgerade (vgl. Abb. 19).

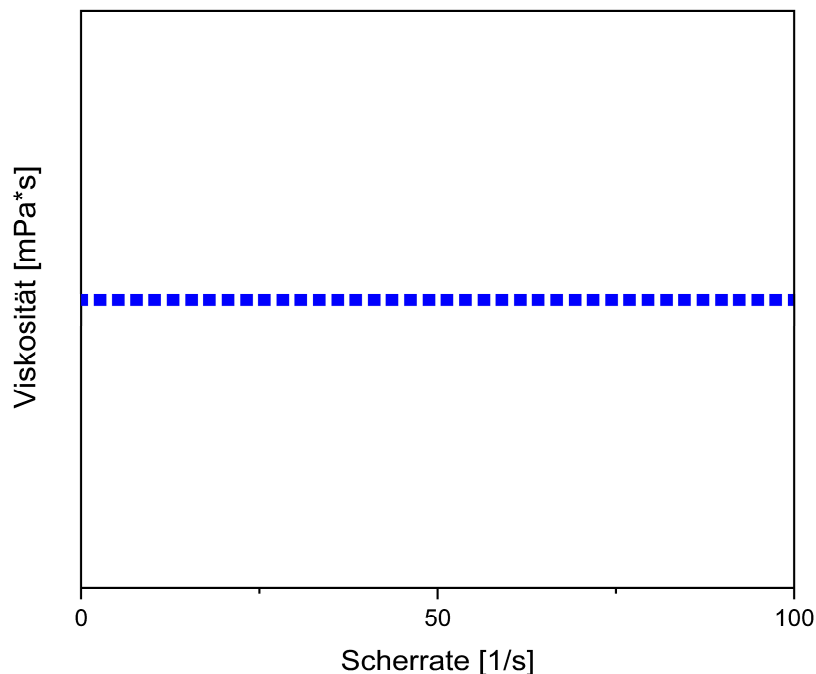


Abbildung 19 Fließkurve eines Newton'schen Fluids

Daraus ergibt sich, dass die Viskosität für idealviskose Fluide unabhängig von der Höhe und Dauer der Scherbelastung ist. Viskositäten können mittels Auslaufbechern, Kapillar-, Kugelfall- oder Stabinger-Viskosimetern gemessen werden.^{134,136}

Um das wesentlich komplexere Fließverhalten von nicht Newton'schen Fluiden zu bestimmen, wird auf die Technik der Rheologie zurückgegriffen. Mit dieser Messtechnik ist es möglich, Deformations- und Fließverhalten von sehr niedrigen bis sehr hohen Scherbelastungen zu messen. Die Grundlage für alle rheologischen Parameter ist das Zwei-Platten-Modell, bei dem die obere Platte (Fläche A) durch eine Kraft F bewegt und die Geschwindigkeit v gemessen wird. Die untere Platte ist unbeweglich, was zur Scherung des Fluids im Spalt mit dem Abstand h führt.^{134,136}

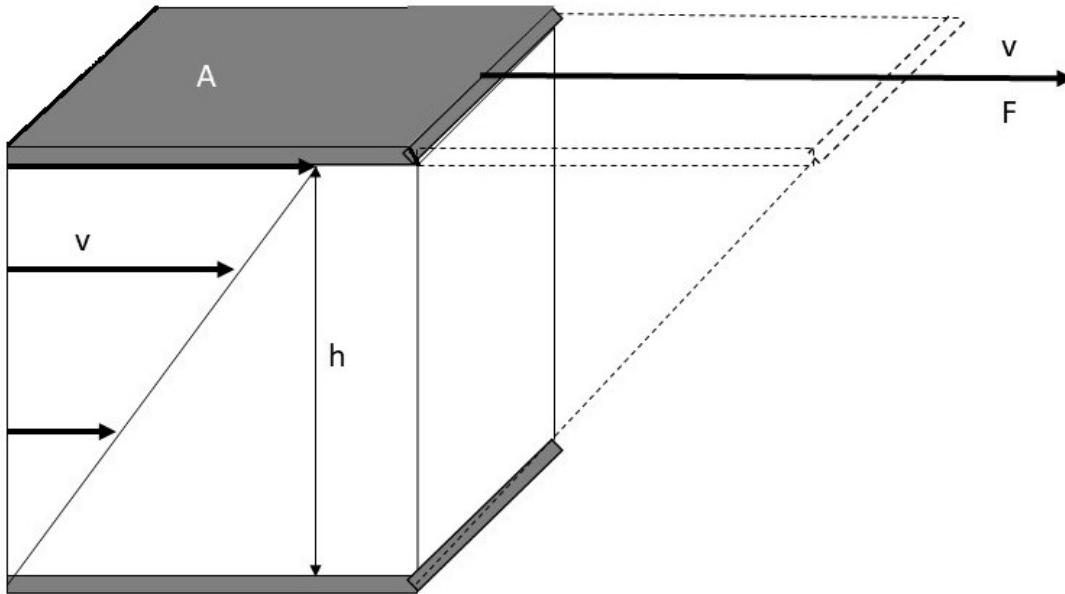


Abbildung 20 Schematische Darstellung der Fließgeschwindigkeit einer Flüssigkeit im Spalt eines Zwei-Platten-Modells für Scherversuche

Für eine exakte Berechnung der rheologischen Parameter müssen zwei Bedingungen erfüllt sein, erstens die Probe muss über Adhäsion mit beiden Platten verbunden sein, zweitens es gibt nur laminare Fließbedingungen und keine turbulente Strömung. Die realen geometrischen Verhältnisse in einem Rheometer sind nicht so ideal wie im Zwei-Platten-Modell beschrieben, weshalb die Annahmen nur bei kleinen Messspalthöhen gelten.^{134–137}

Die Schubspannung τ ist definiert als Kraft F pro Fläche A

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (55)$$

und die Scherrate $\dot{\gamma}$ als Geschwindigkeit v durch die Messspalthöhe h

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{h} \quad (56)$$

Daraus ergibt sich für die Viskosität η

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (57)$$

In der praktischen Anwendung wurde das Platte-Platte-Messsystem durch ein Kegel-Platte-Messsystem ausgetauscht, das bietet den Vorteil das die Scherrate unabhängig vom Radius ist.^{134–137}

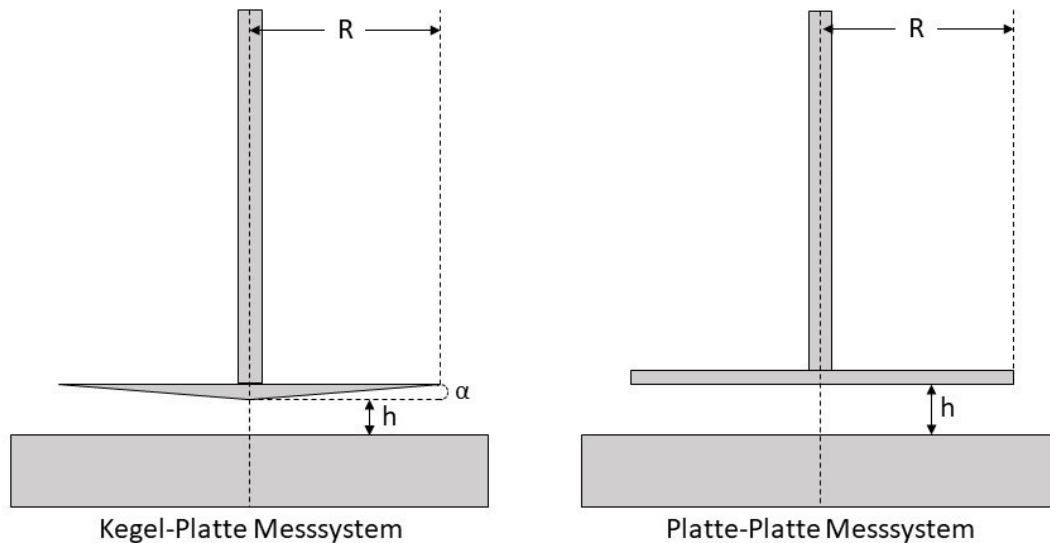


Abbildung 21 Schematische Darstellung der Messsysteme eines Rheometers mit allen wichtigen Kenngrößen

Der Messspalt h zwischen Kegel und Platte vergrößert sich nach außen mit dem Abstand r von der Drehachse ($0 \leq r \leq R$). Der Maximalwert für den Messspalt wird bei $r=R$ erreicht daraus folgt:

$$\tan \alpha = \frac{h_{max}}{R} \quad (58)$$

Die Umfangsgeschwindigkeit ist ebenfalls vom Radius abhängig und erreicht ihren Maximalwert bei $r=R$, was zu folgender Beziehung führt.

$$\dot{\gamma} = \frac{v_{max}}{h_{max}} = \frac{\omega * R}{R * \tan \alpha} = \frac{\omega}{\tan \alpha} \approx \frac{\omega}{\alpha} \quad (59)$$

Das bedeutet, dass die Scherrate unabhängig vom Radius wird, wenn $\alpha < 3^\circ$ ist.¹³⁴⁻¹³⁸

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse und Diskussion sind in drei große Themenblöcke unterteilt, die in Kapitel 5 nochmal als Gesamtergebnis mit Ausblick auf zukünftige Projekte zusammengefasst werden. Die einzelnen Themenblöcke beschreiben ein in sich abgeschlossenes Projekt, das die unterschiedlichen Eigenschaften ausgewählter ILs und ihren Einfluss auf das Basische Myelin Protein als Modellprotein für IDPs zeigen. Der erste Abschnitt befasst sich hauptsächlich mit dem Einfluss von Cholin-dihydrogenphosphat auf die Lösungsstruktur von MBP in unterschiedlichen Puffern. Während es im zweiten Abschnitt eher um die rekombinante Herstellung und die Ausbeutenmaximierung von MBP und seinen Mutanten geht. Der dritte und letzte Abschnitt stellt eine Vereinigung der

vorherigen Projekte dar, wobei anhand einer Modell IL auf Imidazolbasis ein Modellmembransystem geschaffen werden sollte, dass die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstruktur von IDPs ermöglichen sollte.

3.1 Einfluss von Cholin-dihydrogenphosphat auf Struktur und Dynamik von MBP

Obwohl Ionische Flüssigkeiten schon seit mehr als 150 Jahren bekannt sind, steckt die Erforschung ihrer Anwendungsmöglichkeiten noch in den Kinderschuhen, da sie erst in den letzten Jahren stärker in den Fokus der Wissenschaft gerückt sind. In früheren Studien wurde bereits der positive Einfluss von einigen ILs auf Struktur und Dynamik von Proteinen festgestellt. Bis jetzt wurde der Einfluss von Cholin-dihydrogenphosphat hauptsächlich für Proteine, die bereits Sekundär- oder Tertiärstrukturen aufweisen, erforscht.^{6,23} Deswegen war eines der Ziele dieses Projekts den, Einfluss von CDHP auf intrinsisch ungeordnete Proteine, wie MBP eines ist, zu untersuchen und zu klären, ob auch unterschiedliche Puffer bei gleichem pH-Wert einen Einfluss auf die Lösungsstruktur haben können.

Bei Basischem Myelin Protein handelt es sich um ein IDP, das in Wasser oder wässrigen Lösungen Cluster oder Aggregate bildet, um seine hydrophoben Regionen bestmöglich vom polaren Lösemittel abzuschirmen.

Um herauszufinden, welchen Einfluss ILs auf MBP haben können, wurden Proben mit 0, 5, 10, 15, 20, 25 und 50 Prozent CDHP hergestellt und mit Konzentrationen von 2-10 μM MBP versetzt, da MBP bereits bei niedrigen Konzentrationen zur Aggregation neigt. Um dieses Aggregationsverhalten zu beobachten, wurde die dynamische Lichtstreuung (DLS) als Methode gewählt und zur Ergänzung noch die elektrophoretische Lichtstreuung (ELS), um das Zetapotential zu bestimmen.

3.1.1 Ergebnisse Cholin-dihydrogenphosphat (CDHP) in PBS-Puffer

In diesem Teil der Arbeit wird der mögliche Einfluss von PBS-Puffer auf IL/Wasser-Mischungen und die Struktur und Dynamik von MBP diskutiert.

3.1.1.1 Ergebnisse Brechungsindex und Viskosität

Der Puffer wurde wie in Kapitel 4.2.2 und die Proben nach dem Pipettierschema in Kapitel 4.2.3 hergestellt. Zuerst mussten der Brechungsindex und die Viskosität bestimmt

werden, da es sich bei beiden Größen um stoffspezifische Eigenschaften handelt, mit denen das Gemisch aus Puffer/IL charakterisiert werden kann. Des Weiteren werden die beiden Größen zur Berechnung des hydrodynamischen Radius für die Dynamische Lichtstreuung (DLS) benötigt. Die Messung des Brechungsindex erfolgte, wie in Kapitel 4.7 beschrieben. Die Ergebnisse befinden sich in Tabelle 1.¹²⁷

Tabelle 1 Brechungsindex von Cholin-dihydrogenphosphat in PBS-Puffer

T [°C]	PBS	CDHP 5%	CDHP 10%	CDHP 15%	CDHP 20%	CDHP 25%	CDHP 50%
20	1,33465	1,34186	1,34908	1,35634	1,36319	1,3702	1,4047
25	1,33411	1,34128	1,34844	1,35566	1,36247	1,36946	1,40384
30	1,33351	1,34064	1,34774	1,35494	1,36172	1,36869	1,40305
35	1,33281	1,33993	1,34698	1,35417	1,3609	1,36785	1,40217
37	1,3325	1,33963	1,34668	1,3539	1,36063	1,3675	1,40179

Danach wurde die Viskosität mittels Rheometer wie in Kapitel 4.8 beschrieben gemessen. Aus der Fließkurve der dynamischen Viskosität lässt sich bereits die Aussage treffen, dass es sich um ein Newton'sches Fluid handelt (Abb. 22).^{137,138}

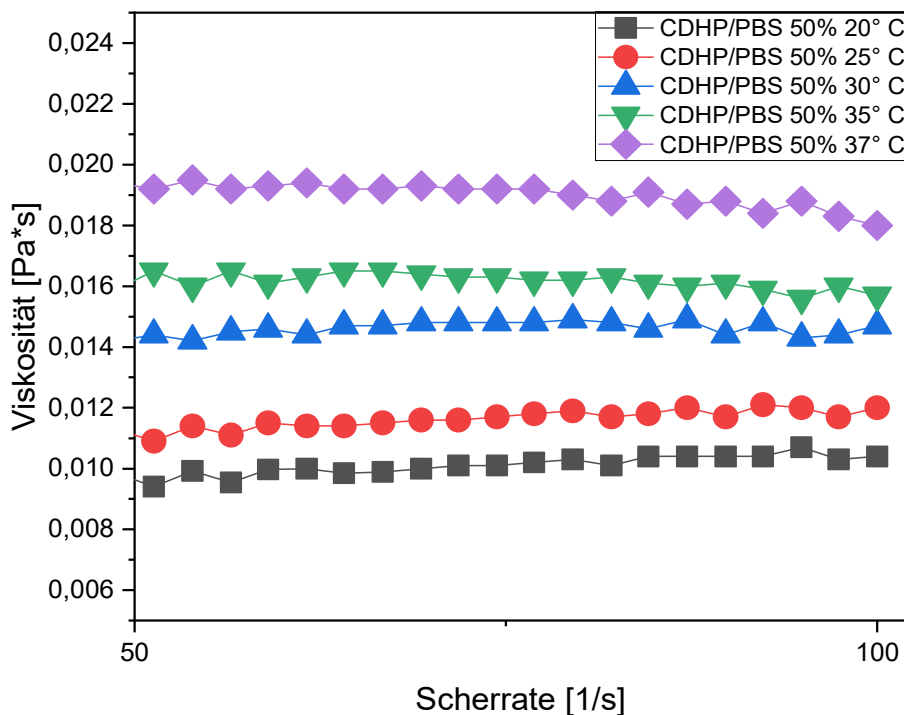


Abbildung 22 Graphische Darstellung einer Fließkurve der dynamischen Viskosität in Abhängigkeit von Scherrate und Temperatur

Bei den Ergebnissen in Tabelle 2 handelt es sich um die Mittelwerte, die aus jeweils 40 Messpunkten berechnet wurden.

Tabelle 2 Viskosität von Cholin-dihydrogenphosphat in PBS-Puffer

T	PBS	CDHP	CDHP	CDHP	CDHP	CDHP	CDHP
		5%	10%	15%	20%	25%	50%
[°C]	[PA*S]	[PA*S]	[PA*S]	[PA*S]	[PA*S]	[PA*S]	[PA*S]
20	0,00101	0,001087	0,001302	0,001513	0,00168	0,00208	0,00995
25	0,000887	0,001031	0,001101	0,001225	0,00139	0,00187	0,01092
30	0,000649	0,000849	0,001006	0,001017	0,00134	0,00168	0,01381
35	0,000503	0,000789	0,000837	0,000998	0,00127	0,00163	0,01548
37	0,000467	0,000705	0,000797	0,000954	0,00106	0,00156	0,01841

In den Werten für die Viskositäten sieht man die typische Disproportionalität. Mit steigender Temperatur nimmt die Viskosität ab, mit einer Ausnahme: Bei der Mischung mit einem Massenanteil von 50 % Ionischer Flüssigkeit sieht man einen Anstieg der Viskosität mit der Temperatur (vgl. Abb. 22). Dies könnte für einen konzentrationsabhängigen Effekt der IL sprechen und muss im Auge behalten werden.^{137,138}

3.1.1.2 Ergebnisse Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Nachdem der Brechungsindex und die Viskosität bestimmt waren, wurden DLS-Messungen durchgeführt. Zuerst wurden die Referenzmessungen der IL/Puffer Mischungen ohne Protein gemessen, um herauszufinden, ob bereits in der Lösung Strukturen vorhanden sind.

Bei den Messungen handelt es sich um Temperaturserien von 20°-37° C, gemessen in der Rückwärtsstreuung in einem Winkel von 175°, die Zugehörigen Messung der Seitwärtsstreuung befinden sich im Anhang. In Abbildung 23 A sind exemplarisch die Korrelations-Zeit-Funktionen für 37° C abgebildet.

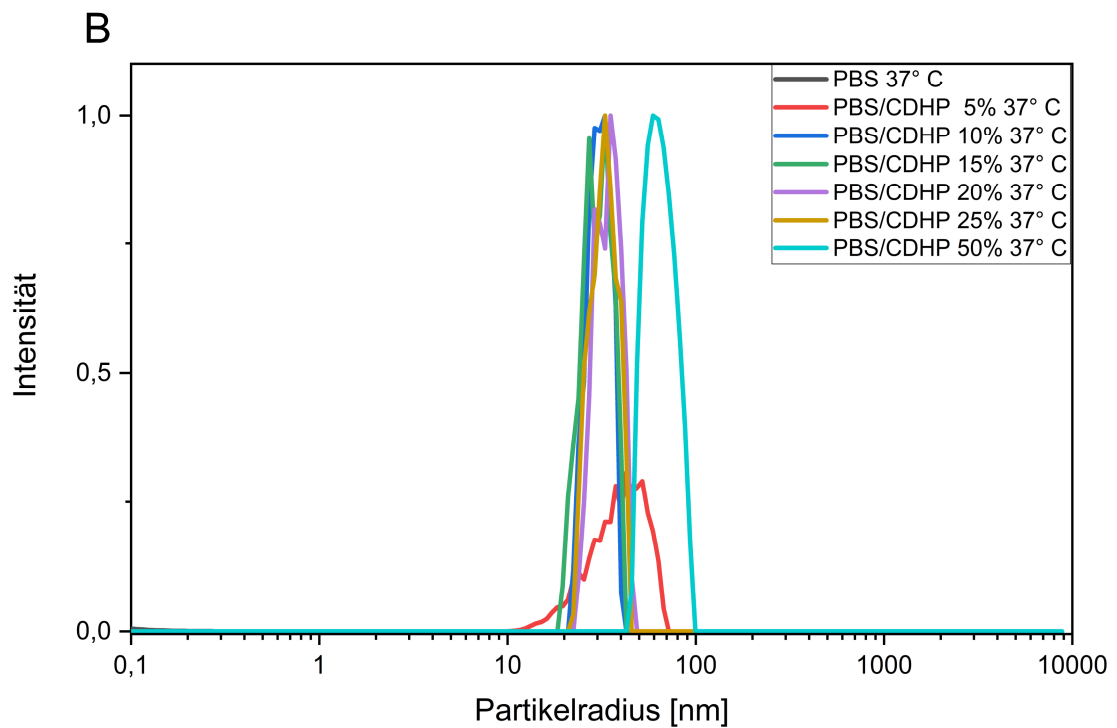
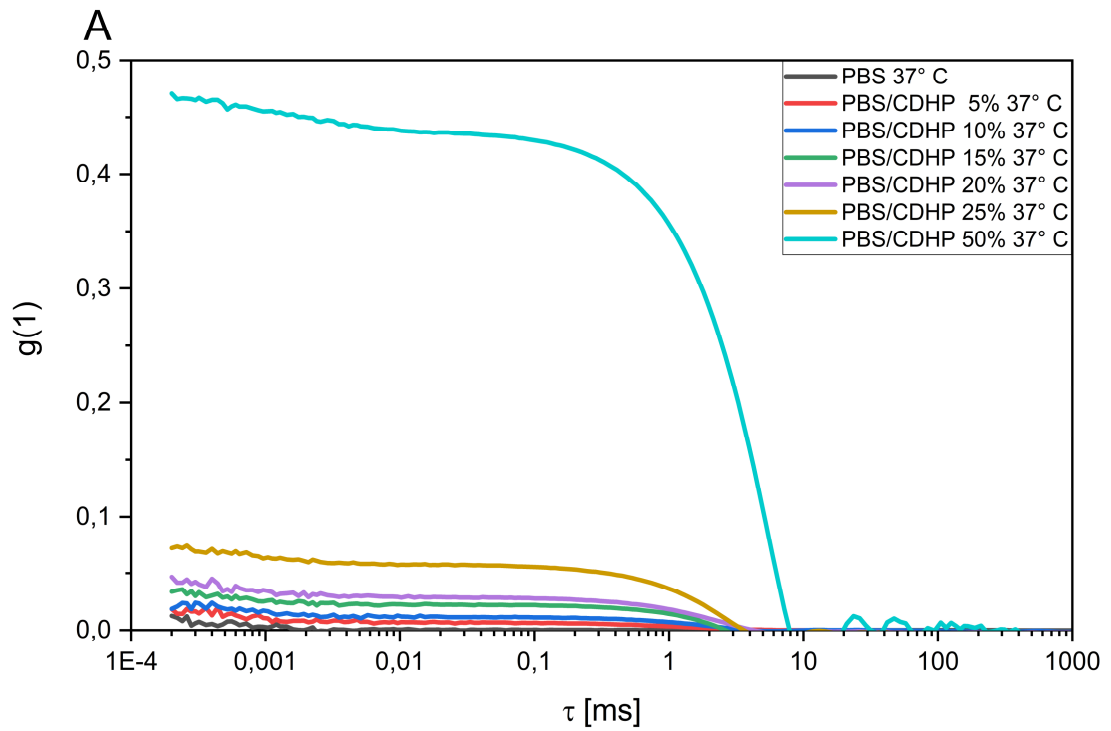


Abbildung 23 A: Korrelations-Zeit-Funktionen von PBS-Puffer mit unterschiedlichen Konzentrationen Cholin-dihydrogenphosphat B: die dazugehörigen Partikelgrößenverteilungen

37° C wurde ausgewählt, da die Messungen zu einem späteren Zeitpunkt mit Protein wiederholt werden sollten und dies der Körpertemperatur eines Menschen entspricht,

bei der man die höchstmögliche Funktionalität eines Proteins erwartet. In Abbildung 23 B finden sich die dazugehörigen Partikelgrößenverteilungen.

Wie zuvor erwähnt, handelt es sich bei der DLS um eine schnelle Methode zur Messung der Partikelgröße bzw. Partikelgrößenverteilung. Sie gibt keinen Aufschluss über Struktur oder Zusammensetzung der Partikel, außerdem ist die Methode sehr anfällig für Verunreinigungen. Allgemein sind DLS-Messungen mit Vorsicht zu beurteilen, da der berechnete hydrodynamische Radius einer idealen harten Kugel entspricht, die mit der Geschwindigkeit des zu untersuchenden Partikels diffundiert.

Um Informationen über das Verhalten von MBP in PBS-Puffer und unterschiedlichen Konzentrationen CDHP zu erhalten, sind Messungen ohne Protein entscheidend. Da aus der Autokorrelation die Partikelgrößenverteilung abgeleitet wird, ist die Analyse der Referenz Proben von größter Bedeutung. Generell sollten Korrelationsfunktionen $\geq 0,3$ sein, damit sie signifikant sind; ansonsten können aus ihnen nur Trends abgelesen werden und ihre Partikelgrößenverteilungen könnten ungültig sein.

Auffällig ist, dass alle Korrelationsfunktionen, mit Ausnahme von PBS/CDHP 50% unter 0,1 liegen. Das hat zur Folge, dass die Aussagekraft sehr gering ist und man die berechneten Partikelgrößenverteilung höchstens als einen Trend ansehen sollte. Als Nächstes sollte auffallen, dass die Korrelationsfunktionen einer aufsteigenden Ordnung folgen; mit zunehmender Konzentration an CDHP steigt ihre Intensität. Des Weiteren fällt auf, dass alle Kurven eine typische Form aufweisen: erst ein langsamer Abfall bis zu 1 ms, gefolgt von einem schnellen Abfall.

Wie zuvor erwähnt wird aus der Autokorrelationsfunktion die Partikelgrößenverteilung berechnet und bei einer zu niedrigen Korrelationsfunktion kann der Wert nur als Trend angesehen werden.

Dies bestätigt sich, wenn man zur weiteren Auswertung die Seitwärtsstreuung im Anhang in Betracht zieht. Die Autokorrelationen zeigen nun Werte teilweise > 1 , ihre zuvor beobachtete Ordnung geht verloren und sie wirken zufällig. Ihre Form ist ähnlich, ein langsamer Abfall bis zu 1 ms, gefolgt von einem schnelleren Abfall, durch ihre größere Intensität hier deutlicher zu erkennen. Die daraus resultierende Partikelgrößenverteilung zeigt einen deutlich größeren hydrodynamischen Radius als die der Rückwärtsstreuung. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurden die DLS-Messungen unter gleichen Bedingungen mit 2 μM MBP wiederholt. In Abb. 24 sind die Ergebnisse der Rückwärtsstreuung für die Autokorrelationsfunktion und der Partikelgrößenverteilung gezeigt.

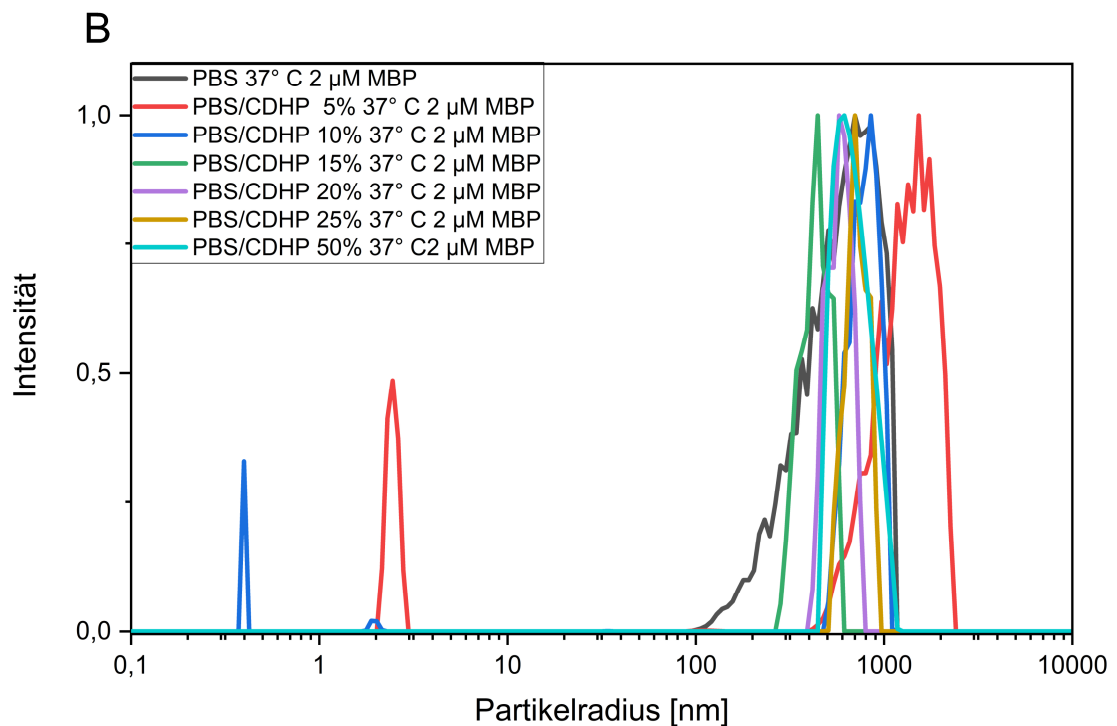
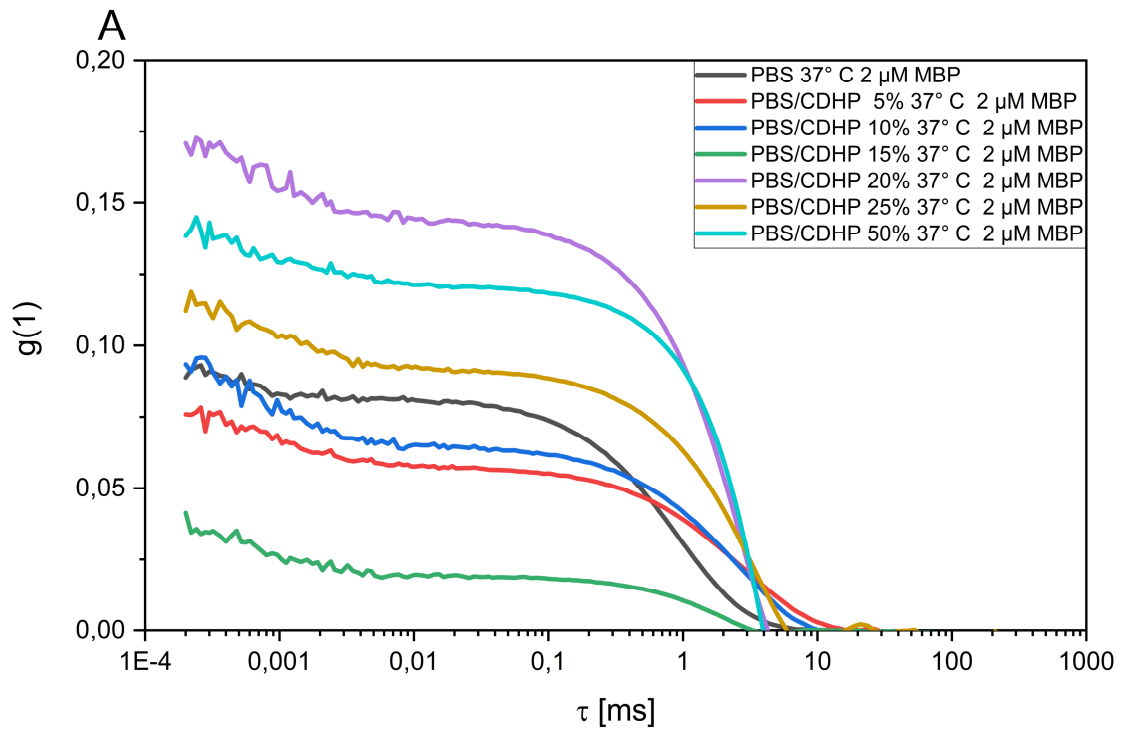


Abbildung 24 A: Korrelations-Zeit-Funktion verschiedener PBS/CDHP Mischungen B: Die zu A gehörenden Partikelgrößenverteilungen

Beginnen wir die Betrachtung hier bei der Größe der Korrelationsfunktionen. Durch die Zugabe von MBP hat sich ihre Höhe nahezu verdoppelt, ist aber immer noch unter der Signifikanzgrenze von 0,3. Es ist keine übergeordnete Ordnung zu erkennen, ähnlich

der Seitwärtsstreuung im Anhang. Aus ihrer Form lässt sich ableiten, dass es sich mindestens um eine bimodale Verteilung handelt. Die bimodale Verteilung spricht dafür, dass die Probe mindestens zwei Spezies enthält, die unterschiedliche Streumuster aufweisen. Vergleicht man die Partikelgrößenverteilung von Seitwärts- und Rückwärtsstreuung, zeichnet sich ein deutliches Bild ab; vergleicht man die Form der Peaks, sieht man nicht nur eine bimodale, sondern eher eine multimodale Partikelgrößenverteilung. Das spricht dafür, dass in der Probe Proteinaggregate in allen erdenklichen Formen und Größen vorliegen müssen.

3.1.1.3 Ergebnisse Elektrophoretische Lichtstreuung (ELS)

Als letztes Experiment zur Charakterisierung des Einflusses von PBS/CDHP Mischungen auf MBP, wurde die Elektrophoretische Lichtstreuung (ELS) durchgeführt. Hierbei werden durch die Messung des Potentials an der Scherebene das Zetapotential und die elektrophoretische Mobilität bestimmt. Da man bei den Messungen ohne MBP annähernd von einer monomodalen Verteilung ausgehen kann, sind Veränderungen des Zetapotentials ausschließlich auf die Zugabe von MBP zurückzuführen. Zetapotential Messungen können ausschließlich in der Rückwärtsstreuung durchgeführt werden. Alle Messungen wurden bei 25° C durchgeführt.

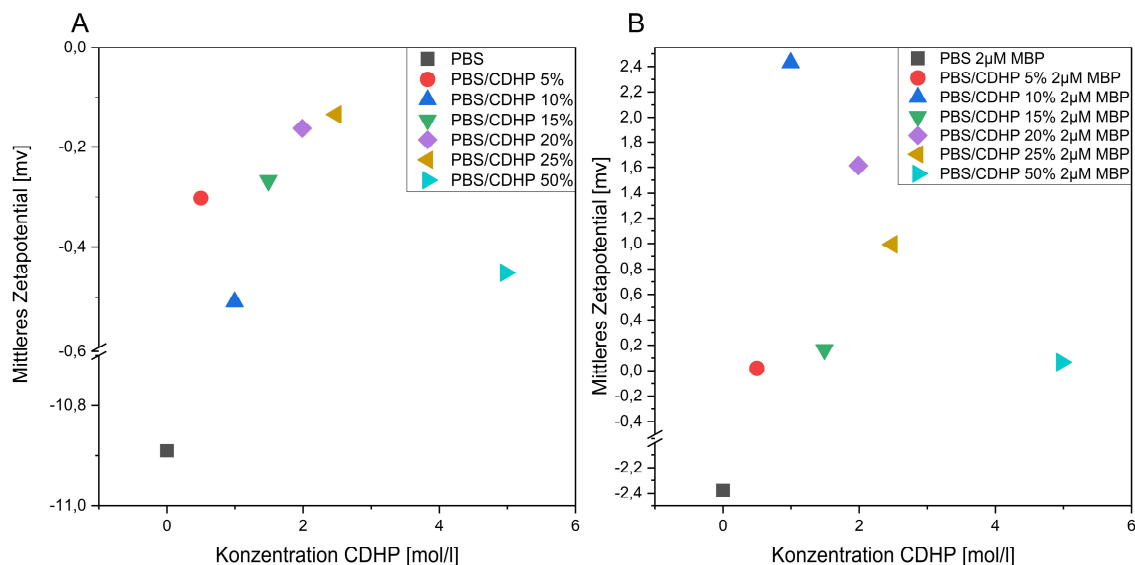


Abbildung 25 A: Mittleres Zetapotential gegen Konzentration CDHP B: Mittleres Zetapotential gegen Konzentration CDHP mit 2 µM MBP

Betrachtet man zuerst das Zetapotential von reinem PBS-Puffer fällt auf, dass es bei ca. -10,9 mV liegt, durch die Zugabe von CDHP verschiebt es sich in Richtung positiverer Werte. Dies kommt eventuell davon, dass es sich bei Cholin-dihydrogenphosphat um eine ionische Flüssigkeit handelt. Durch die Zugabe zusätzlicher Ionen erhöht sich die Gesamtleitfähigkeit der Lösung, was vermutlich zu einer homogenen Verteilung der

Ladungen innerhalb der Probe führt. Interessanterweise ist dieser Effekt nicht konzentrationsabhängig, was zu erwarten wäre. Analysiert man nun die Zetapotentiale mit Protein, führt schon die Zugabe von geringen Mengen Protein zu einer deutlichen Veränderung, da alle Proben die CDHP enthalten ein positives Zetapotential aufweisen. Dies ist vor allem auf die Ladung von MBP zurückzuführen, die mengenmäßig häufigste Variante hat eine Nettoladung von +19. Das positive Zetapotential kommt durch den Ausgleich der vorhandenen negativen Ladung zustande. Allerdings ist kein Muster erkennbar und die Positivierung des Zetapotentials scheint nicht von der Konzentration des CDHP abzuhängen. Die Werte des Zetapotentials sind in diesem Zusammenhang mit Vorsicht zu beurteilen, da sich durch Zugabe des MBP mindestens eine bimodale, wenn nicht sogar multimodale Partikelgrößenverteilung bildet. Des Weiteren sind die Unterschiede zwischen den Zetapotentialen nicht signifikant genug, um eine genaue Aussage zu treffen, man kann höchstens einen Trend ablesen.

Mittels der Elektrophoretischen Lichtstreuung wurde nicht nur das Zetapotential bestimmt, sondern auch die elektrophoretische Mobilität. Dabei handelt es sich um eine stoffspezifische Größe, die die Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld beschreibt. Sie ist abhängig von der Nettoladung des Partikels, seiner Größe, der Ionenstärke, Viskosität, pH-Milieu des Mediums und der Temperatur. Für amphiphile Moleküle wie Proteine ist es interessant, diesen Parameter zu kennen, um z.B. den isoelektrischen Punkt zu bestimmen. In Abb. 26 sind die elektrophoretischen Mobilitäten in Abhängigkeit zur Konzentration der IL dargestellt.

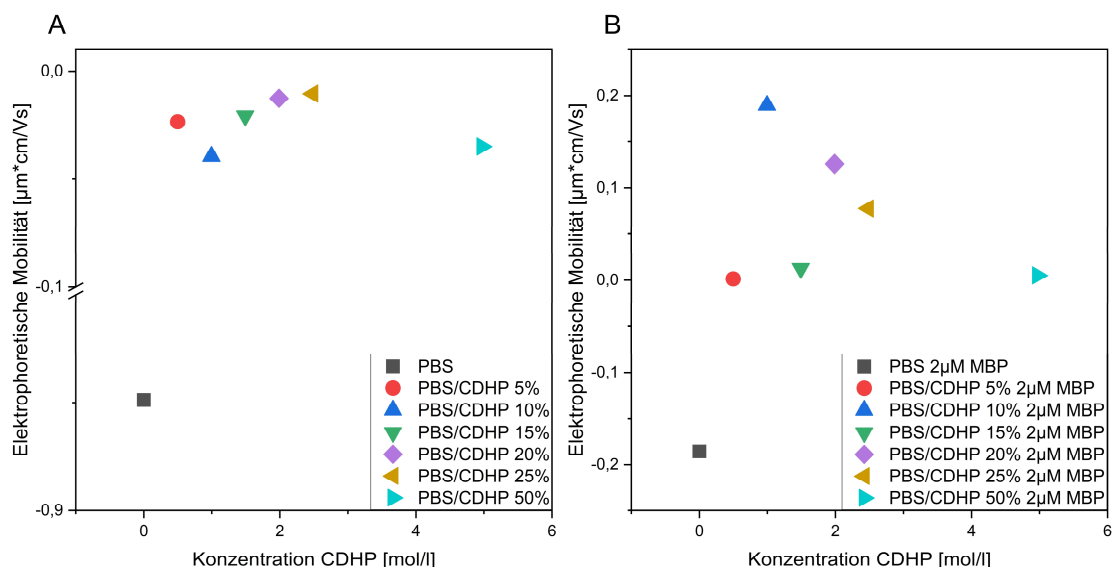


Abbildung 26 A: Elektrophoretische Mobilität gegen Konzentration CDHP B: Elektrophoretische Mobilität gegen Konzentration CDHP mit 2 μM MBP

In Abb. 26 A sieht man, dass die elektrophoretische Mobilität im niedrigen negativen Bereich liegt und mit steigender CDHP-Konzentration annähernd linear bleibt. Betrachtet man Abb. 26 B fällt auf, dass sich die elektrophoretische Mobilität in Richtung positiverer

Werte verschiebt, außerdem geht der lineare Zusammenhang der reinen PBS/CDHP Mischungen verloren. Dies kann zum ersten dadurch erklärt werden, dass die Zugabe von positiven Ladungen in Form von Proteinen die elektrophoretische Mobilität erhöht. Zweitens kommt es durch die Zugabe des Proteins zu einer Veränderung von einer monomodalen zu einer bi- oder multimodalen Verteilung. Dies spricht dafür, dass in der Probe unterschiedlich große Aggregate vorliegen. Da die elektrophoretische Mobilität auch von der Größe der Partikel abhängig ist, erklärt das möglicherweise die Unterschiede in Abhängigkeit von der CDHP-Konzentration. Auch hier sind die Unterschiede nicht signifikant genug, um eindeutige Aussagen zu treffen und man sollte es wie beim Zetapotential nur als einen Trend sehen.

3.1.2 Ergebnisse Cholin-dihydrogenphosphat (CDHP) in HEPES-Puffer

Dieser Abschnitt der Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von Mischungen aus HEPES Puffer mit Cholin-dihydrogenphosphat auf MBP. Die Vorgehensweise bei den Experimenten folgt der gleichen Reihenfolge wie in 3.1.1 beschrieben.

3.1.2.1 Ergebnisse Brechungsindex und Viskosität

Wie in Kapitel 3.1.1 wurden auch hier zuerst die Viskosität und der Brechungsindex der Mischungen bestimmt, da diese für die Berechnung der Partikelgrößen im DLS benötigt werden. Die Probenvorbereitung erfolgte, wie in Kapitel 4.1.2 und 4.2.3 beschrieben. In Tabelle 3 finden sich die gemessene Brechungsindizes.¹²⁷

Tabelle 3 Brechungsindex HEPES/CDHP

T [°C]	HEPES	CDHP 5%	CDHP 10%	CDHP 15%	CDHP 20%	CDHP 25%	CDHP 50%
20	1,33388	1,34156	1,34915	1,35723	1,36426	1,37267	1,40438
25	1,33336	1,34099	1,34851	1,35655	1,36355	1,37192	1,40355
30	1,33277	1,34035	1,34783	1,35584	1,36281	1,37116	1,40285
35	1,33212	1,33964	1,3471	1,35513	1,36209	1,37043	1,40199
37	1,33183	1,33936	1,34686	1,35493	1,36187	1,37024	1,4017

Als nächstes wurde die dynamische Viskosität mittels Rheologie bestimmt, bei den angegebenen Werten handelt es sich um einen Mittelwert über 40 Messpunkte.

Tabelle 4 Dynamischen Viskosität der HEPES/CDHP Messungen

T	HEPES	CDHP	CDHP	CDHP	CDHP	CDHP	CDHP
		5%	10%	15%	20%	25%	50%
[°C]	[PA*S]	[PA*S]	[PA*S]	[PA*S]	[PA*S]	[PA*S]	[PA*S]
20	0,00102	0,00108	0,00134	0,00187	0,00222	0,00264	0,00905
25	0,000958	0,000916	0,00111	0,00168	0,00208	0,00222	0,00984
30	0,000668	0,000838	0,00102	0,00143	0,00189	0,00199	0,01117
35	0,000512	0,000777	0,000931	0,00134	0,00181	0,00185	0,01208
37	0,000493	0,000709	0,000801	0,00131	0,00176	0,00181	0,01385

Die Viskositätswerte ähneln denen mit PBS-Puffer, kleinere Unterschiede können durch die unterschiedlichen Konzentrationen der Puffer erklärt werden. Was auffällt ist, dass die HEPES/CDHP 50% Mischung einen proportionalen Anstieg zwischen Temperatur und Viskosität zeigt und dieses Verhalten untypisch für Newton'sche Fluide ist, da normalerweise mit steigender Temperatur die Viskosität abnimmt. Ein ähnliches Verhalten konnte schon bei Mischungen mit PBS-Puffer beobachtet werden. Da dieses Verhalten bei zwei voneinander unabhängigen Messreihen, aufgetreten ist, handelt es sich möglicherweise um eine Eigenschaft der Ionischen Flüssigkeit.^{137,138}

3.1.2.2 Ergebnisse Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Nach den Brechungsindex- und Viskositäts-Messungen folgten die DLS-Messungen. Wie bereits in Kapitel 3.1.1.2 erwähnt, lassen DLS-Messungen keine Aussage über Zusammensetzung oder Beschaffenheit der Partikel zu, sondern nur Partikelgrößen bzw. Partikelgrößenverteilung des hydrodynamischen Radius. Da sich bei den PBS/CDHP Mischungen gezeigt hat, dass bereits geringe Protein-Konzentrationen von 2 µM MBP-Aggregate bilden und zusätzlich die Korrelations-Zeit-Funktionen sehr niedrig ausgefallen sind, wurde für die Messreihe mit HEPES-Puffer zusätzlich noch die Proteinkonzentration variiert, um detailliertere Aussagen über das Verhalten von MBP, in Mischungen von unterschiedlichen CDHP-Konzentrationen, treffen zu können.

Wie zuvor wurden Temperaturserien von 25°-37° C in Seitwärts- und Rückwärtsstreuung aufgenommen. In Abb. 27 sind exemplarisch einige Autokorrelationsfunktionen mit ihren zugehörigen Partikelgrößenverteilungen abgebildet. Um die Vergleichbarkeit zu 3.1.1.2 zu wahren, handelt es sich um die Messungen bei 37° in der Rückwärtsstreuung, weitere Ergebnisse befinden sich im Anhang.

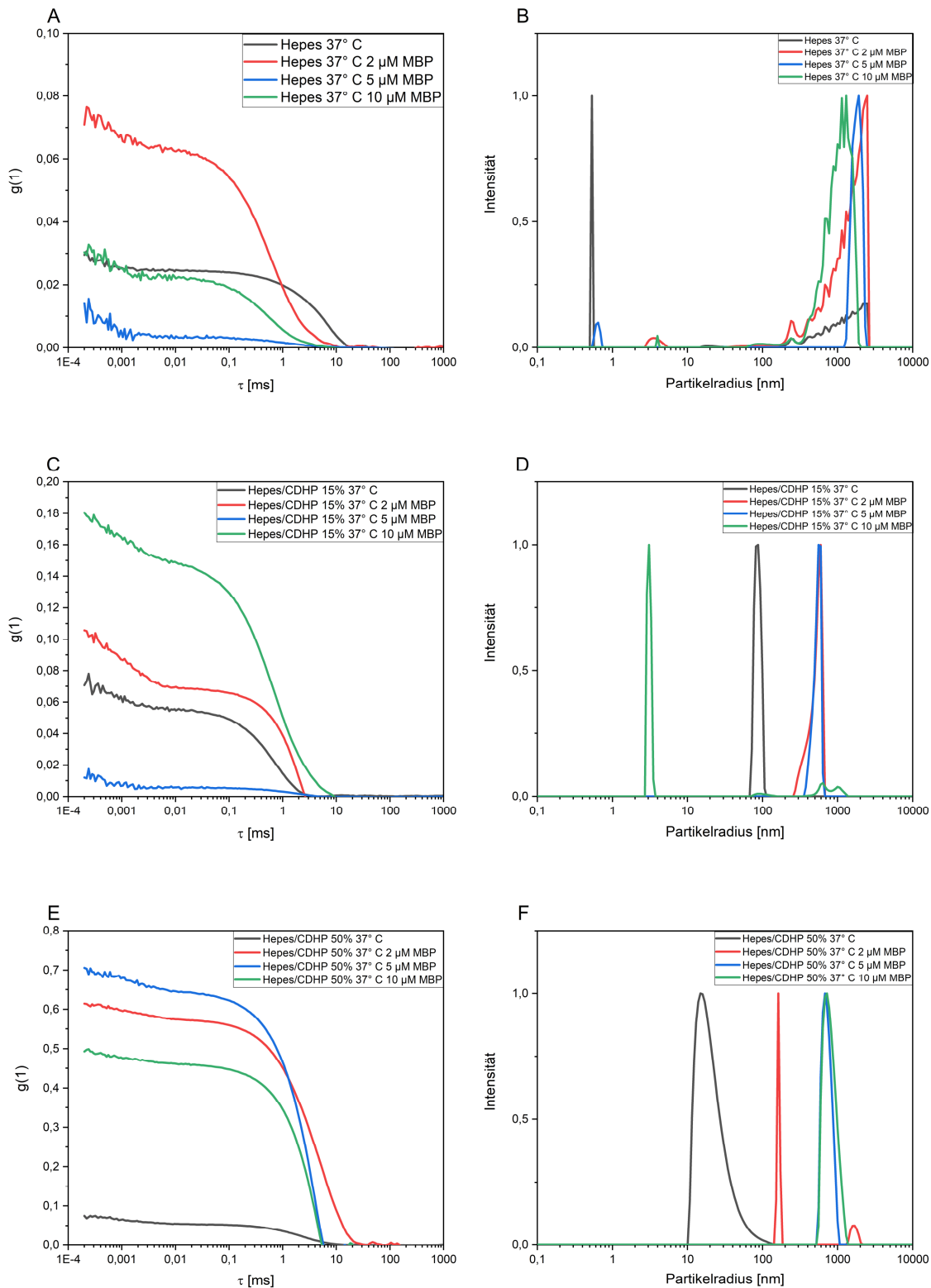


Abbildung 27 A: Autokorrelationsfunktion für 0-10 μM MBP in HEPES Puffer B: Partikelgrößenverteilung 0-10 μM MBP in HEPES Puffer C: Autokorrelationsfunktion für 0-10 μM MBP in HEPES/CDHP 15% D: Partikelgrößenverteilung 0-10 μM MBP in HEPES/CDHP 15% E: Autokorrelationsfunktion für 0-10 μM MBP in HEPES/CDHP 50% F: Partikelgrößenverteilung 0-10 μM MBP in HEPES/CDHP 50%

Wie schon in Kapitel 3.1.1.2 fällt auf, dass die Autokorrelationsfunktionen sehr niedrig sind, allerdings steigen sie mit höheren Konzentrationen CDHP an (Vgl. Abb. 26 A und

E). Des Weiteren fällt auf, dass sich die Höhe der Autokorrelation mit steigender Proteinkonzentration verändert. Trotzdem bleiben die Höhen der Korrelationsfunktionen unter dem Signifikanzwert von 0,3. Mit Ausnahme der Mischung von HEPES/CDHP 50%, kann man die berechneten Partikelgrößenverteilungen ähnlich wie in Kapitel 3.1.1.2 nur als einen Trend ansehen. Bezieht man hier zusätzlich die Autokorrelationsfunktionen der Seitwärtsstreuung mit ein (Abb. 58, 59 und 60 im Anhang), bestätigt sich dieser Trend, da nun die Autokorrelationsfunktionen oberhalb des Signifikanzwertes von 0,3 liegen und die dazugehörigen Partikelgrößenverteilungen zu denen der Rückwärtsstreuung passen.

Als nächstes sollte man die Form der Korrelationsfunktionen betrachten. Man erkennt die typische Form, die man auch schon in Kapitel 3.1.1.2 gesehen hat, es fängt mit einem flachen Abfall an, gefolgt von einem starken Abfall bei ca. 1 ms. Diese Form spricht wieder dafür, dass man von einer mindestens bimodalen Partikelgrößenverteilung ausgehen muss. Schaut man sich in diesem Zusammenhang die Partikelgrößenverteilung des hydrodynamischen Radius an, fällt auf, dass sich mindestens zwei Arten von streuenden Partikeln in der Probe befinden müssen. Einige haben einen sehr kleinen hydrodynamischen Radius zwischen 1-10 nm, hierbei handelt es sich vermutlich um das Cholin-dihydrogenphosphat mit seiner Hydrathülle, das singuläre Protein mit seiner Hydrathülle oder eine Kombination aus Protein und ionischer Flüssigkeit. Bei der zweiten Spezies von ca. 100-1000 nm handelt es sich vermutlich um Proteinaggregate.

3.1.2.3 Ergebnisse Elektrophoretische Lichtstreuung (ELS)

Auch hier wurden zusätzlich ELS-Messungen durchgeführt, wie schon in Kapitel 3.1.1.3 beschrieben werden hier mittels cmPALS-Methode das Zetapotential und die elektrophoretische Mobilität bestimmt. Um eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von Kapitel 3.1.1.3 zu gewährleisten, wurden die gleichen Parameter bei der Messung verwendet.

Die Partikelgrößenverteilungen der HEPES/CDHP Mischungen konnten wieder als annähernd monomodal angesehen werden, was zur Folge hat, dass Veränderungen des Zetapotentials und der elektrophoretischen Mobilität nur von der Konzentration des Proteins und der Größe der ausgebildeten Strukturen abhängig ist.

In Abb. 28 A ist das Zetapotential gegen die Konzentration CDHP aufgetragen, in 28 B die elektrophoretische Mobilität gegen die Konzentration CDHP.

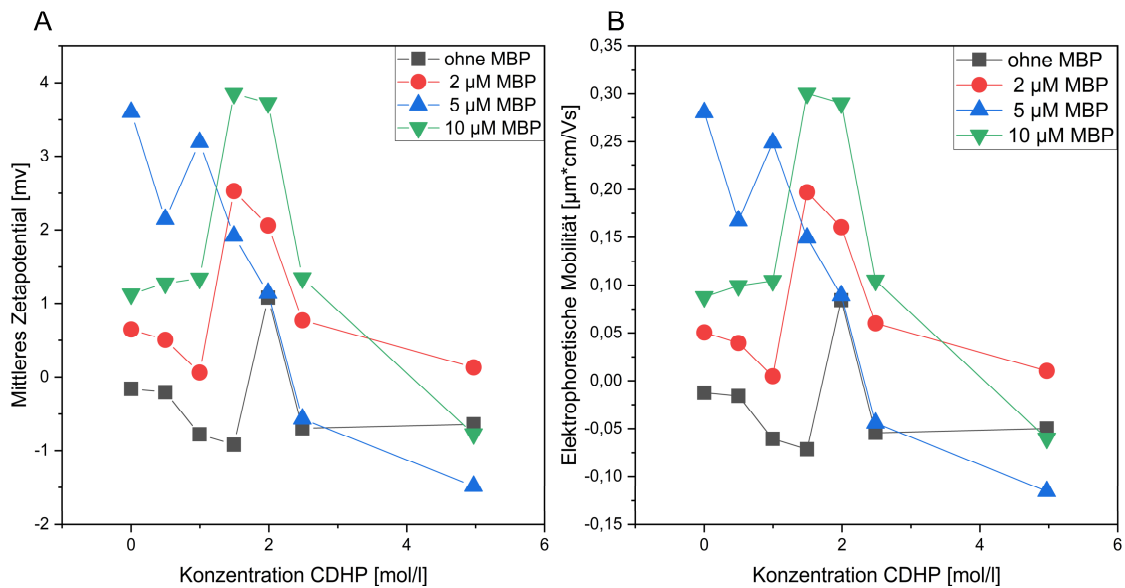


Abbildung 28 A: Mittleres Zetapotential gegen die Konzentration CDHP mit 0, 2, 5 und 10 µM MBP B: elektrophoretische Mobilität gegen Konzentration CDHP mit 0, 2, 5 und 10 µM MBP

Zunächst fällt auf, dass durch die Zugabe von MBP sowohl das Zetapotential als auch die elektrophoretische Mobilität vom leicht negativen in den positiven Bereich verschoben werden. Das lässt sich einfach durch die Nettoladung des Proteins von +19 erklären, welche die negativen Ladungen des CDHP ausgleicht.

Als nächstes fällt die Form der Kurven von 0, 2, 10 µM auf, sie haben alle ein lokales Maximum bei einer Konzentration von ca. 2 M sowohl für die elektrophoretische Mobilität als auch das Zetapotential. Eine Erhöhung des Zetapotentials, ausgelöst durch eine Verstärkung der interpartikulären Abstoßungskräfte, könnte ein Zeichen für verringerte Aggregation sein; allerdings gibt es in den Partikelgrößenverteilungen der DLS keine Beweise für diese Annahme.

Bei der Kurve von 5 µM MBP fällt auf, dass sie ganz anders verläuft als die übrigen Kurven. Sie hat den höchsten Ausgangswert vom Zetapotential und der elektrophoretischen Mobilität und fällt proportional zum Anstieg der CDHP-Konzentration ab. Eine mögliche Erklärung findet sich in den Autokorrelationsfunktionen der Rückwärtsstreuung. Bei einer Konzentration von 5 µM MBP fallen diese deutlich niedriger aus als die Korrelationsfunktionen der Proben, die kein MBP enthalten. Allgemein sind die Ergebnisse der Rückwärtsstreuung und deswegen auch die ELS-Messungen mit Vorsicht zu bewerten, da die Autokorrelationsfunktionen sehr niedrig und unter dem Signifikanzwert von 0,3 liegen. Deswegen können die berechneten Werte höchstens als Trend und nicht absolut angesehen werden.

3.1.3 Diskussion

Ziel dieses Projekts war es, den Einfluss von Cholin-dihydrogenphosphat (CDHP), einer ionischen Flüssigkeit, in Mischung mit PBS- und HEPES-Puffer, auf das Basische Myelinprotein (MBP) zu untersuchen. Frühere Studien legen nahe, dass CDHP die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen globulärer Proteine unterstützt.⁶ In diesem Zusammenhang wurde erstmals ein intrinsisch ungeordnetes Protein (IDP) verwendet, in der Hoffnung, dass CDHP einen Übergang von Unordnung zu Ordnung auslösen kann und man so in der Lage gewesen wäre, das Protein in wässriger Lösung zu untersuchen. Deswegen wurden die Dynamische und die Elektrophoretische Lichtstreuung ausgewählt, um etwaiges Aggregationsverhalten zu untersuchen. Zusätzlich sollte der Einfluss des Puffers auf die unterschiedlichen CDHP/Puffer Mischungen untersucht werden. Hierfür wurden PBS, ein biochemischer Standardpuffer, der aufgrund seiner Zusammensetzung dem osmotischen Druck im menschlichen Körper entspricht, und HEPES, ein weiterer biochemischer Puffer, der wenig Wechselwirkungen mit Proteinen besitzt und eher den Pufferverhältnissen im Gehirn entspricht.

Zuerst wurden jeweils der Brechungsindex und die Viskosität beider Puffer sowie die CDHP/Puffer Mischungen bestimmt. Zum einen handelt es sich bei Brechungsindex und Viskosität um stoffspezifische Größen zur Charakterisierung eines Systems, zum anderen werden sie benötigt, um in der DLS die Partikelgrößenverteilungen aus der Autokorrelationsfunktion zu bestimmen. Die Ergebnisse waren eher unspektakulär und wie zu erwarten, mit einer Ausnahme: Bei den beiden Puffer/CDHP Mischungen von 50 % steigt die Viskosität mit steigender Temperatur an, was nicht dem typischen Verhalten eines Newton'schen Fluids entspricht.

Danach wurden DLS-Experimente in Temperaturreihen von 20-37° C durchgeführt, zusätzlich wurden Seitwärts- und Rückwärtsstreuung von den Proben gemessen. Bei den Proben mit PBS-Puffer fiel auf, dass bereits geringste Konzentrationen von 2 µM MBP zur Aggregation führten, weshalb von Experimenten mit höheren MBP-Konzentrationen abgesehen wurde. Außerdem führten die niedrigen Autokorrelationsfunktionen der Rückwärtsstreuung dazu, dass auch die darauffolgenden ELS-Messungen nicht besonders aussagekräftig sind und höchstens als Trend angesehen werden können. Auch die durchgeführten Seitwärtsstreuungs-Experimente zeigen, dass sich bei MPB in PBS/CDHP Mischungen eine multimodale Partikelgrößenverteilung ausbildet und sich vermutlich nur Aggregate von unterschiedlicher Größe in der Probe bilden. Dies könnte auf den Phosphatpuffer zurück zu führen sein, denn schon in früheren Arbeiten (Cerajewski *et al.*)¹³⁹ stellte sich PBS als eher ungeeignet heraus, da er die Bildung von Proteinclustern eher noch fördert.

Bei den DLS-Messungen mit HEPES Puffer wurden zusätzlich noch Messungen mit 5 μM und 10 μM MBP durchgeführt, um eventuelle konzentrationsabhängige Änderungen zu sehen und um eine bessere Datenausgangslage zu haben. Auch bei diesen Ergebnissen fällt auf, dass die Autokorrelationsfunktionen sehr niedrig sind und man sie eher als Trend sehen sollte. Aber im Gegensatz zu den Messungen mit PBS-Puffer fällt auf, dass die Partikelgrößenverteilung mit steigender CDHP-Konzentration verändert und die Peaks eine viel definiere Form haben. Außerdem wird der Trend aus der Rückwärtsstreuung deutlicher, wenn man die Ergebnisse mit der Seitwärtsstreuung vergleicht. Hierbei sieht man eine deutlichere bimodale Verteilung, in der Probe liegen mindestens zwei Spezies von streuenden Partikeln vor. Bei den großen hydrodynamischen Radien von 100-1000 nm handelt es sich, wie schon beim PBS-Puffer, um Aggregate unterschiedlicher Form und Größe die MBP üblicherweise in wässrigen Lösungen bildet. Bei den kleineren Partikeln handelt es sich eventuell um eine Kombination aus Protein und IL, mit oder ohne Hydrathülle. Eine interessante Erkenntnis stammt aus den ELS-Messungen, sie zeigen ein lokales Maximum der elektrophoretischen Mobilität und des Zetapotentials zwischen einer CDHP-Konzentration von 1,5-2 M. Wie auch zuvor sind die Messung mit Vorsicht zu beurteilen, da sie in Rückwärtsstreuung gemessen wurde. Die hier gezeigten Ergebnisse legen folgende Schlüsse nahe: Mischungen aus PBS und CDHP sind ungeeignet, um das Protein zu lösen, da bereits geringe Mengen MBP zur Aggregation führen, vermutlich verstärkt durch die elektrostatischen Wechselwirkungen der Phosphat Ionen aus IL und Puffer. Die Verwendung von HEPES Puffer und CDHP erzielte etwas bessere Ergebnisse, man erhielt eine bimodale Partikelgrößenverteilung und man konnte bis zu einer Konzentration von 10 μM MBP-Messungen durchführen, in denen immerhin noch ein gewisser Anteil monomeres Protein vorlag. Außerdem wurde eine gewisse Anomalie in den ELS-Daten entdeckt, die eventuell auf einen Einfluss der IL auf das Lösungsverhalten und die Dynamik von MBP zurückzuführen ist. Alles in allem ist das System nicht dazu geeignet, Basisches Myelinprotein (MBP) zu lösen, ohne dass sich Aggregate bilden. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass es nicht möglich ist, das monomere Protein in seiner natürlichen Faltung wie es in der Myelinscheide vorliegt, zu untersuchen.

3.2 Rekombinante Herstellung von MBP

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, besteht handelsübliches MBP aus einer Mischung aller seiner Isoformen. In den theoretischen Grundlagen wurde erläutert, dass je nach Alter, Umwelteinfluss oder Krankheitsbild unterschiedliche Isoformen vom Körper gebildet werden. Die mengenmäßig häufigste Isoform ist die 18,5 kDa-Variante, mit einer Ladung von +19, von nun an bezeichnet als C1WT. Des Weiteren handelt es sich bei handelsüblichem MBP um bovines MBP (bMBP), das rekombinant hergestellte rmMBP stammt von Nagern und ähnelt in seiner Aminosäuresequenz eher dem menschlichen MBP.

Die Expression war nötig, um die reine Isoform des Proteins studieren zu können. Wobei der Hauptfokus auf zwei Varianten gelegt wurde, einmal C1WT und C1S17CH85C. Die Doppelcysteinmutante wurde für spezielle Puls-EPR-Experimente benötigt, um einen detaillierten Einblick in die Lösungsstruktur, mit und ohne Ionenische Flüssigkeit zu erhalten. Die Vektoren für die rekombinante Herstellung wurden von Harauz Lab in Kanada zur Verfügung gestellt.

3.2.1 Ergebnisse der Expressionsexperimente und Optimierung der Ausbeute

Die Vektoren wurden von Harauz *et al.* aus Kanada zur Verfügung gestellt. Erste Expressionsexperimente wurden streng nach Protokoll durchgeführt. Da es sich um pET22b (+) Vektoren handelt, die für den *E. coli* Stamm BL 21 optimiert sind, wurde zuerst nur diese Zelllinie verwendet. Allerdings viel bei früheren expressions Experimenten auf, dass die Ausbeuten im Vergleich zu denen aus Kanada viel geringer ausfielen.³³ Deswegen musste der gesamte Prozess von Anfang an überprüft und falls nötig überarbeitet werden. Als Ausgangsposition diente das Harauz Lab Manual, durch Unterteilen des Gesamtprozesses in sechs Schritte wurde der Prozess durch ein Trial-and-Error Verfahren stetig optimiert, bis die finale Durchführung entstand, die in Kapitel 4.10 beschrieben ist.³³

Zuerst musste überprüft werden, ob BL 21 Zellen, die am besten geeigneten Zellen für das Konstrukt waren. Deshalb wurden Expressionsexperimente mit vier unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt: BL 21, BL 21 pUBS, Rosetta und C43. Bei allen Zelllinien handelt es sich um unterschiedliche *E. coli*-Stämme. Um eine Vergleichbarkeit der Expressionsexperimente zu gewährleisten, wurden sie alle unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurden die jeweiligen Zellen bis zu einer OD von 0,8 inkubiert und dann wurde die MBP-Expression mittels IPTG induziert und stündlich eine Probe für die SDS-Page genommen.³³ Auf die Gele wurde immer ein Proteinmarker mit definierten

Größen aufgetragen. Dabei handelt es sich um den Rotimark Standard (New England Biolabs). Die Ergebnisse sind in Abb. 29-32 zu sehen.

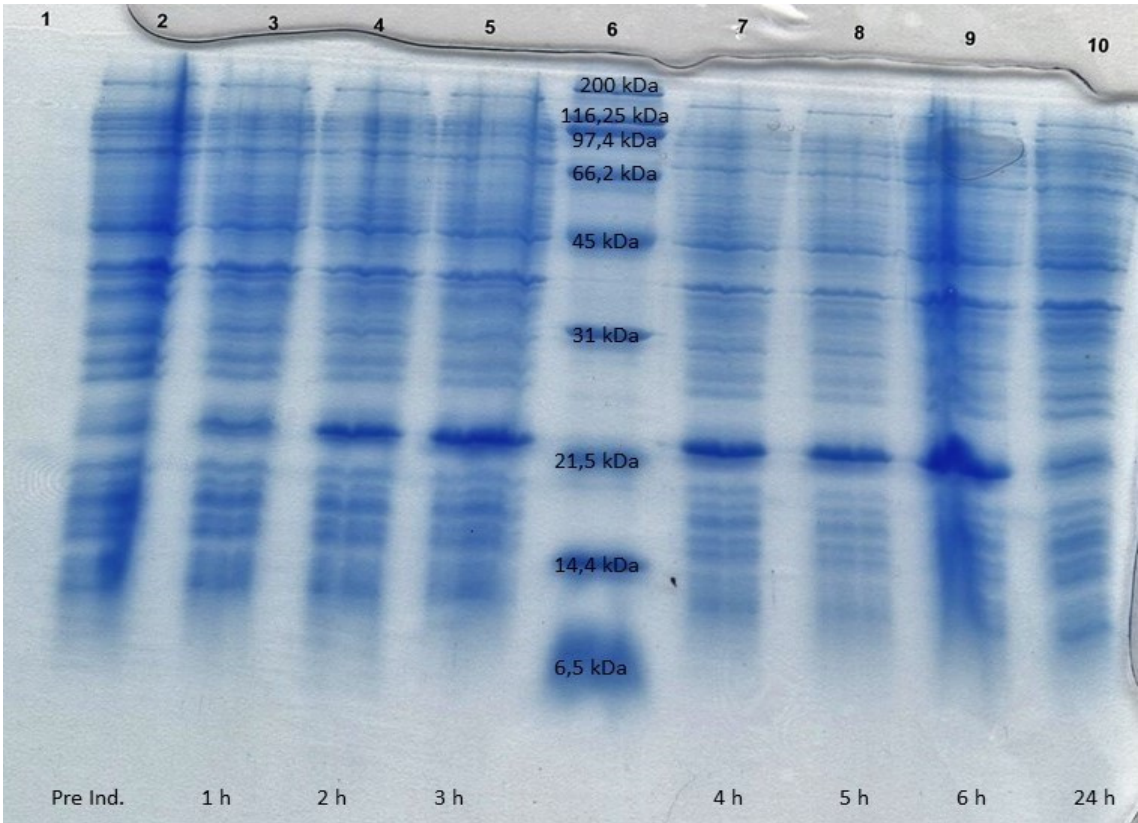


Abbildung 29 Expressionsexperimente von MBP für BL 21 Zellen nach 24 h

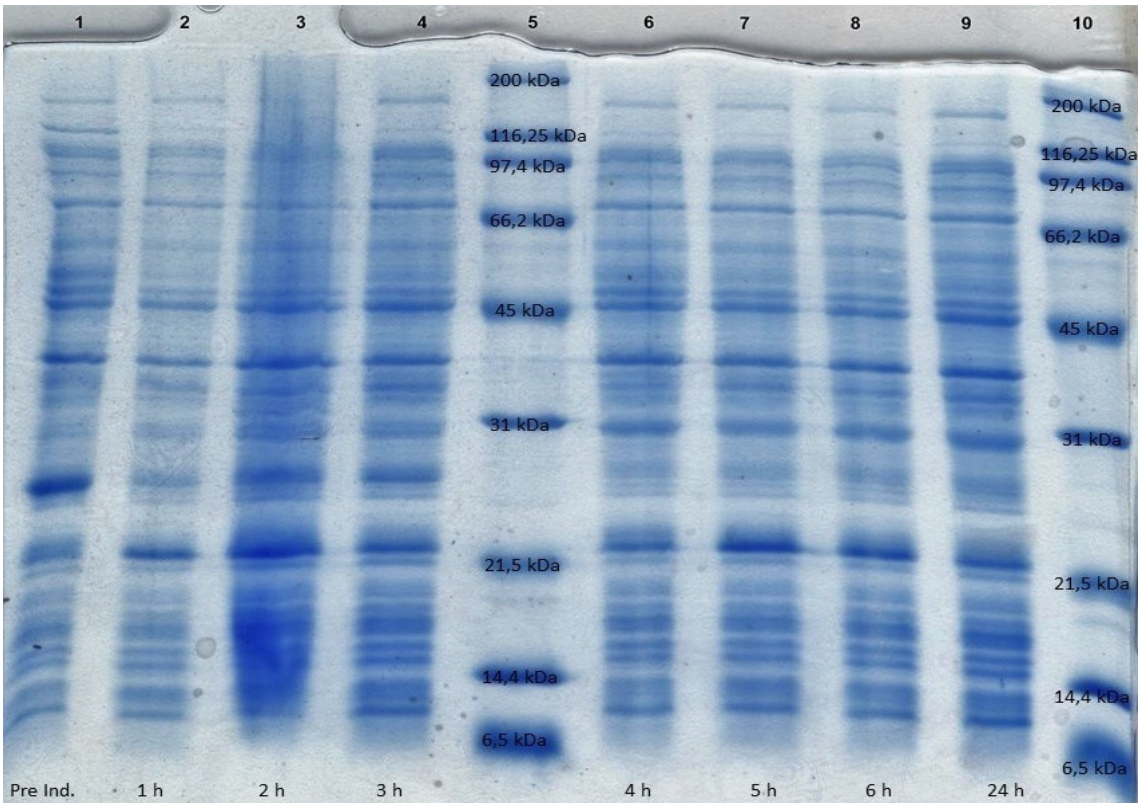


Abbildung 30 Expressionsexperimente von MBP für BL 21 pUBS-Zellen nach 24 h

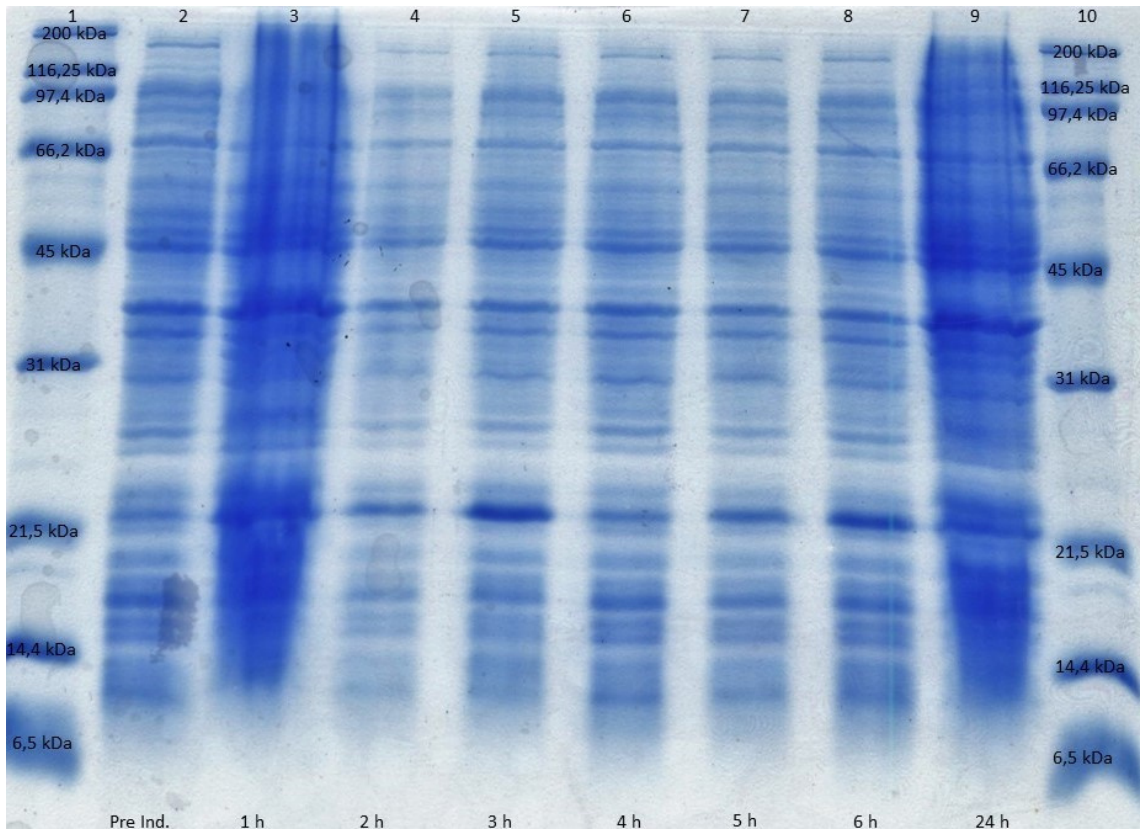


Abbildung 31 Expressionsexperimente von MBP für Rosetta Zellen nach 24 h

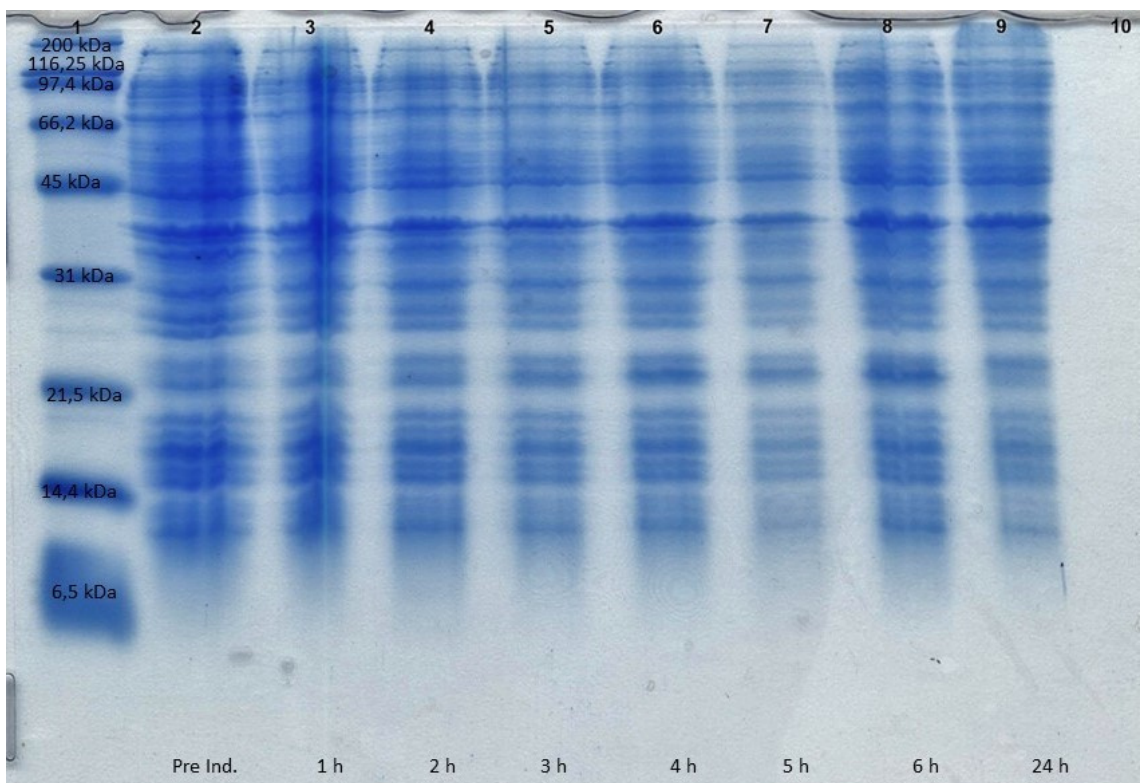


Abbildung 32 Expressionsexperimente von MBP für C 43 Zellen nach 24 h

Aus den Ergebnissen ist eindeutig zu erkennen, dass C43 Zellen nicht für die Expression von MBP geeignet sind. Anhand der Dicke der Banden lässt sich abschätzen, wie viel Protein in der Probe enthalten ist. Was bei den drei Zelllinien, die funktioniert haben zu

erkennen ist, dass die Bande nach 24 Stunden die schwächste ist, was ein Indiz dafür sein könnte, dass die Zellen das Protein nach einer Zeit wieder abbauen, was zu einer Verminderung der Ausbeute führt. Außerdem zeigen Rosetta und BL 21 Zellen nach drei Stunden eine vergrößerte Bande, was dafür spricht, dass dort ein Optimum erreicht ist. Deshalb kommen für die weiteren Expressionen hauptsächlich Rosetta und BL 21 Zellen infrage. Da die Vektoren ursprünglich für BL 21 optimiert wurden, fiel die finale Entscheidung auf BL 21. Trotzdem konnte aus diesen Expressionsexperimenten eine wichtige Information gewonnen werden, nämlich, dass die optimale Inkubationszeit nach der Induktion ca. 3 Stunden beträgt, um einen Abbau des Proteins zu mindern.

Nachdem die passende Zelllinie und die optimale Inkubationszeit ermittelt wurde, war als nächstes der Reinigungsprozess an der Reihe überprüft zu werden.³³ Auch hier diente das Harauz Lab Manual als Grundlage für die Durchführung. Die größten Herausforderungen stellten die großen Volumina und die Viskosität des Lösemittels dar, da die Basis des Fließmittels 6 bzw. 8 mol/l Harnstoff war. Nach dem Zellaufschluss wurden die Suspensionen mindesten 50:50 mit Fließmittel verdünnt, da sie so viskos waren, dass sie eventuell das Säulenmaterial beschädigen.³³ In Abb. 33 ist ein Chromatogramm eines vollständigen Chromatographierlaufes mittels einer Nickelaffinitätsäule (HisTrap) abgebildet.

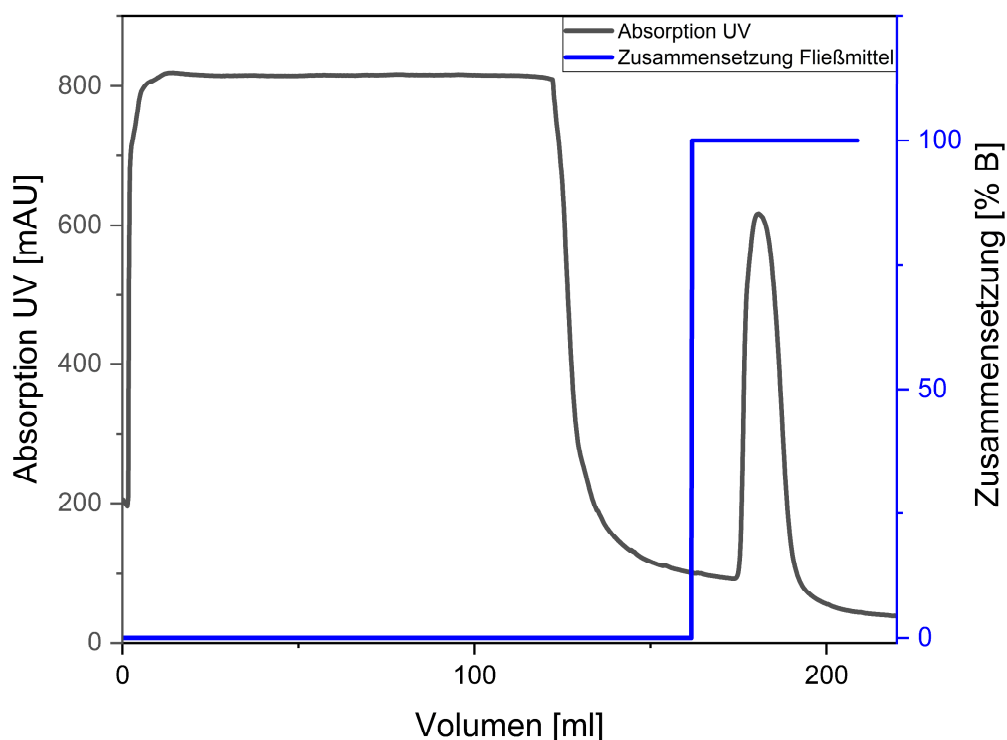


Abbildung 33 Nickelaffinitätschromatographie Absorptionsspektrum UV und Zusammensetzung des Fließmittels gegen das Volumen

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem Peak um das Zielprotein MBP handelt, wurden unterschiedliche Fraktionen aus dem Lauf entnommen und mittels SDS-Page überprüft. In Abb. 34 ist die SDS-Page nach der Nickelaffinitätschromatographie zu sehen.

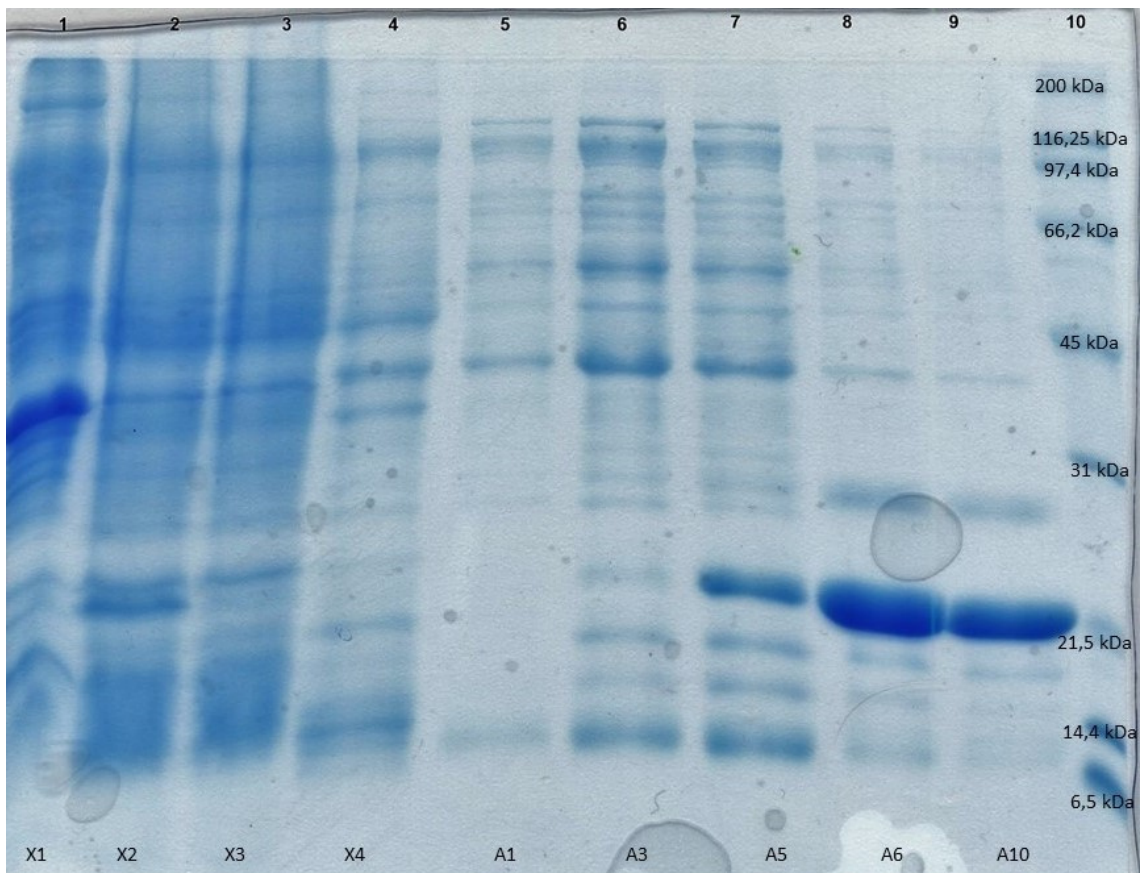


Abbildung 34 SDS-Page der unterschiedlichen Fraktionen der Nickelaffinitätschromatographie am unteren Bildrand sind die jeweilige entnommene Fraktion X1-X4 Auftrag, A1-A3 Waschen, A5-A10 Eluieren

Für die Nickelaffinitätschromatographie war eigentlich eine HisTrap FF Säule vorgesehen, aber da das Säulenbett in einigen Durchläufen, aufgrund der hohen Viskosität der Proben, irreversibel komprimiert wurde, wurden für alle weiteren Durchläufe His-Trap FF crude Säulen verwendet.³³ Crude Säulen sind nicht so dicht gepackt wie andere vergleichbare Säulen, dafür ist ihre Bindekapazität verringert. Aufgrund ihrer losereren Packung sind sie weniger anfällig für Schäden am Säulenbett durch hoch viskose Proben. Der Hersteller verspricht sogar, dass die direkte Aufgabe von Zellysate möglich sei. Nach der Nickelaffinitätschromatographie erfolgt ein Dialyseschritt bei dem die Harnstoffkonzentration von 8 mol/l auf 6 mol/l gesenkt wird. Danach wurde eine Ionenaustauschchromatographie (IEX) durchgeführt.³³ In Abb. 35 ist das Chromatogramm des IEX-Laufs zu sehen.

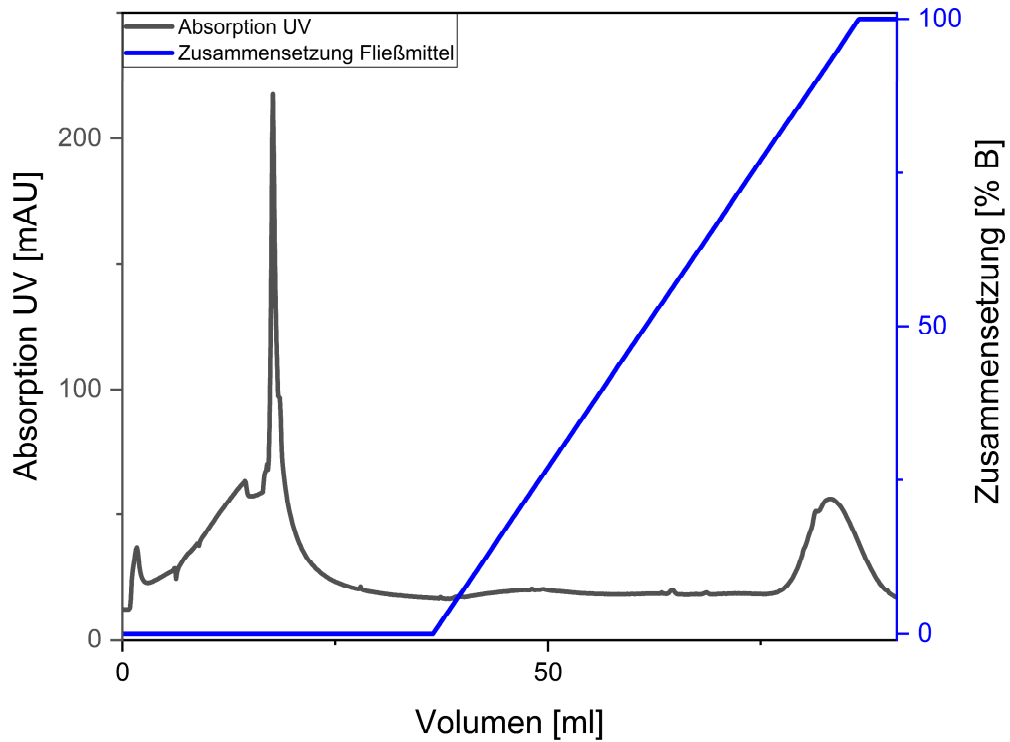


Abbildung 35 IEX-Absorption und Laufmittelzusammensetzung gegen das Volumen

Auch hier wurde wieder eine SDS-Page zur Überprüfung der Reinheit und Identität durchgeführt, zu sehen in Abb. 36.

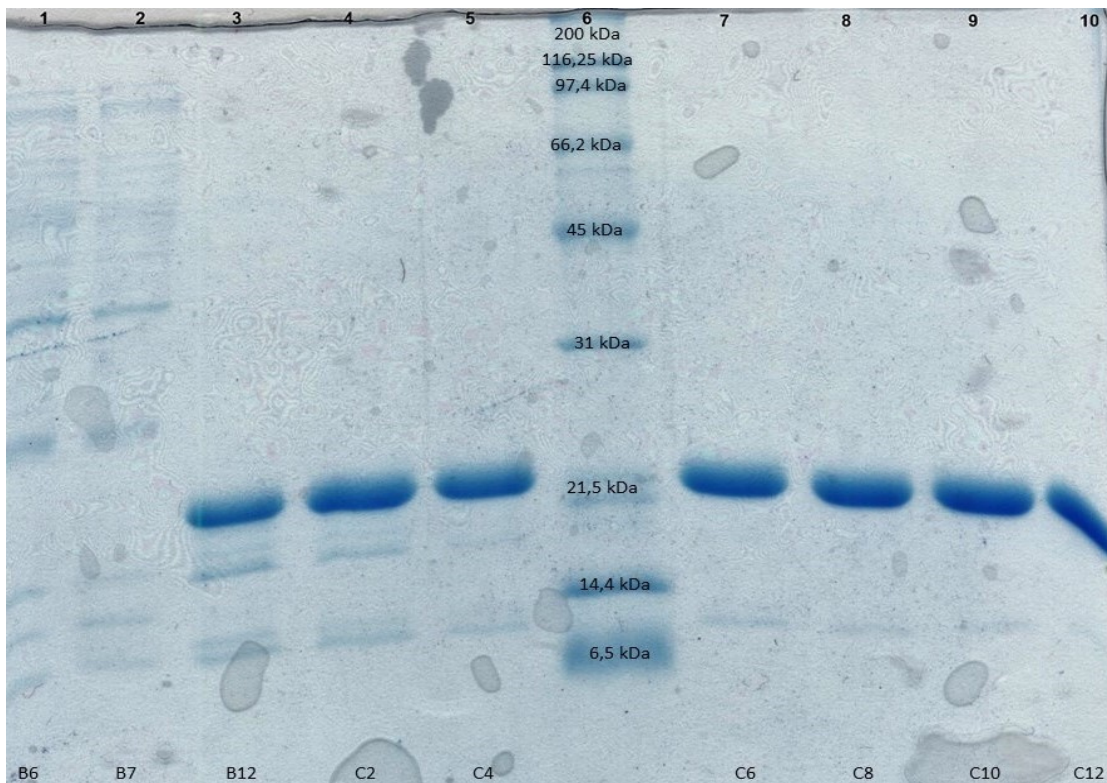


Abbildung 36 SDS-Page der unterschiedlichen Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie am unteren Bildrand sind die jeweilige entnommene Fraktion

Für die Ionenaustauschchromatographie wurde eine HiTrap CM FF Säule, ein schwacher Kationenaustauscher, im Originalprotokoll verwendet. Allerdings stellte sich nach mehreren Durchgängen heraus, dass diese Art des Ionenaustauschers nicht besonders gut für die Cysteinmutanten geeignet war.³³ Deshalb wurde zu einer HiTrap SP FF Säule gewechselt, dabei handelt es sich um einen mittelstarken Kationenaustauscher. Dieser wäre vermutlich auch besser geeignet für unterschiedliche Ladungsvarianten wie z.B. C8 welche nur noch eine Nettoladung von +13 enthält.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass schon durch die geringen Änderungen an der Ursprungsmethode wie das Verwenden von BL 21 Zellen, das Einhalten der idealen Inkubationszeit und die Verwendung von HisTrap FF crude bzw. HiTrap SP FF Säulen, eine Erhöhung der Ausbeute erzielt werden konnte. So lag die Ausbeute von rmMBP C1 WT bei ca. 2 mg/l und die der Doppel-Cysteinmutante rmMBP C1 S17CH85C sogar bei ca. 6,5 mg/l.

Im letzten Schritt mussten nun noch die Proteingelbanden identifiziert werden, hierzu wurde auf die Massenspektrometrie zurückgegriffen. Die Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und hydrolysiert. Kurz gesagt, wurden die Proteine mit 10 mM Dithiothreitol reduziert, mit 55 mM Iodacetamid alkyliert und mit Trypsin hydrolysiert.¹⁴⁰ Die extrahierten Peptide wurden in 2 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure gelöst und in einem DionexUltiMate 3000 RSLCano-Systems (Thermo Fischer Scientific) getrennt. Zuerst wurden sie auf eine Umkehrphasen C18 Vorsäule (μ -Precolumn C18 PepMap 100, C18, 300 μ m I.D., Partikelgröße 5 μ m Porengröße; Thermo Fisher Scientific) geladen. Als Laufmittel A wurde 0,1 %ige Ameisensäure und als Laufmittel B 80 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure verwendet. Als nächstes wurden die Peptide auf einer analytischen C18- Säule (HPLC-Säule Acclaim® PepMap 100, 75 μ m ID, 50 cm, 3 μ m Porengröße; Thermo Fisher Scientific) in Umkehrphase getrennt. Der Gradient betrug 4-90 % Fließmittel B, über 70 min bei einer Flussrate von 300 nl/min. Die Peptide wurden direkt in ein Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) eluiert. Die Datenerfassung erfolgte im positiven Ionenmodus. Die massenspektrometrischen Parameter waren eine Kappilarspannung von 2,8 kV, eine Kapillartemperatur von 275° C und eine normalisierte Kollisionsenergie von 30 %. Der MS-Scanbereich der Orbitrap betrug 350-1600 m/z, mit einer Auflösung von 7000 und einer automatischen Verstärkungssteuerung (AGC) von 3e6. Die 20 intensivsten Peaks wurden für Fragmentierung in der HCD-Zelle bei einem AGC von 1e5 ausgewählt, mit einer MS/MS-Auflösung von 17500. Zuvor ausgewählte Ionen wurden dynamisch für 30 s ausgeschlossen und einfach geladene Ionen und Ionen mit unerkannten Ladungszuständen wurden ebenfalls ausgeschlossen. Die interne Kalibrierung wurde mit der Schleusenmasse 445,120025 m/z durchgeführt. Die Rohdaten wurden in mgf-Dateien

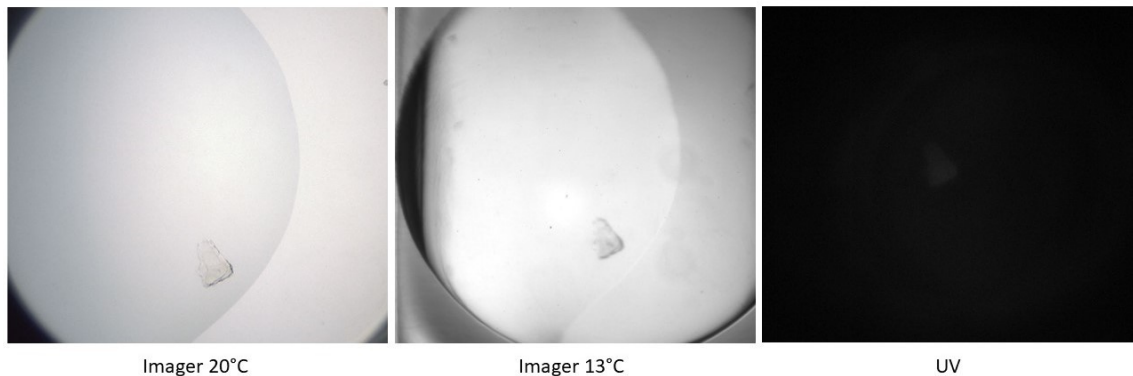
umgewandelt und wurden in der SwissProt Datenbank mittels Mascot-Suchmaschine (Vers. 2.5.1 Matrix Science) gesucht.¹⁴¹ Zusätzlich wurden die Rohdaten in der MaxQuant (Vers. 1.6.3.4) Suchmaschine gegen die Sequenz von MBP und seine Cysteinmutanten gesucht. Die Massenspektrometrie und die Proteinidentifikation wurden von AG Jun. Prof. Schmidt durchgeführt.¹⁴² Bei der Sequenzanalyse mit MaxQuant ergaben eine Sequenz Übereinstimmung von 88 % für rmMBP C1WT und eine 74,9 % Übereinstimmung mit rmMBP C1S17CH85C. Die Ergebnisse der MascotSearch ergaben eine Übereinstimmung von 75 % für rmMBP C1WT und 63 % für rmMBP C1S17CH85C. Die gefundenen Sequenzen aus der Massenspektrometrie befinden sich im Anhang in Tabelle 22 und 23. Durch die Identifizierung lässt sich eindeutig feststellen, dass es sich bei den exprimierten Proteinen, um MBP und seine Doppelcysteinmutante handelt. Dies zeigt, dass die Optimierung der rekombinanten MBP-Herstellung ein voller Erfolg war.

3.2.2 Exkursion: Kristallisationsexperimente

Um den räumlichen Aufbau von Proteinen besser verstehen zu können, wird in der Biochemie oft auf die Röntgenkristallographie zurückgegriffen. Dabei handelt es sich um eine Form der Kristallstrukturanalyse, bei der Beugungsmuster geeigneter Strahlung interpretiert werden. Hierfür wird meistens monochromatische Röntgenstrahlung, Neutronenstrahlung oder Synchrotronstrahlung verwendet. Bei Röntgenstreuungs- oder Röntgendiffraktions-Experimenten wird Strahlung an einem Proteinkristall gebeugt bzw. gestreut. Die gestreuten Strahlen werden an einem Detektor aufgefangen und die Positionen entsprechen, den Elektronendichteverteilungen der einzelnen Atome. Durch Redundanz der Signale und Drehung des Kristalls wird ein Streu- bzw. Beugungsmuster aufgenommen. Die Intensität des aufgenommenen Streumusters wird mittels Fouriertransformation in Elektronendichten und Atompositionen umgerechnet.^{143,144}

Bei den verwendeten Kristallen sollte es sich um Einkristalle handeln, da dort alle Moleküle exakt gleich angeordnet sind. Um Einkristalle zu erhalten, müssen bestimmte Bedingungen erfüllt sein. Das Protein sollte gut löslich sein, da für die Kristallisation Proteinkonzentrationen von > 5 mg/ml benötigt werden. Die Proteinlösung sollte nur eine Spezies enthalten, da sonst Mischkristalle aus mehreren Spezies entstehen können. Außerdem sollten die Pufferkonzentrationen < 50 mM und die Gesamtsalzkonzentration < 300 mM gehalten werden. Phosphatpuffer sollten ganz vermieden werden, da sie oft Salzkristalle bilden. Weitere Anforderungen für das Protein sind, es sollte keine Aggregate bilden da Aggregationskeime zum vollständigen Ausfallen des Proteins führen können. Des Weiteren sollte das Protein langzeitstabil sein, da Kristallisationsansätze teilweise Wochen oder Monate lang zum Wachsen benötigen.^{145,146}

Für die Kristallisationsexperimente wurde eine rmMBP C1WT Lösung von 10 mg/ml hergestellt, um Aggregation zu vermeiden, wurden 50 vol% 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat zugesetzt (vgl. Kapitel 3.3). Es wurden 96 Well-Platten mit folgenden acht Screening Kits angesetzt: HR Crystal, HR-Index, JBS Classic 1-4, JBS Classic 5-8, JBS Classic 9-10, JCSG++, Midas plus und Wizardcryo.¹⁴⁷ Pro Platte wurden ca. 50 µl Probe verwendet, insgesamt wurden 768 unterschiedliche Bedingungen getestet.^{143-146,148} Bereits nach zwei Tagen bildeten sich erste Kristalle, die vielversprechendsten Bedingungen sind in Abb. 37 und 38 zu sehen.



Kristallisationsbedingung:

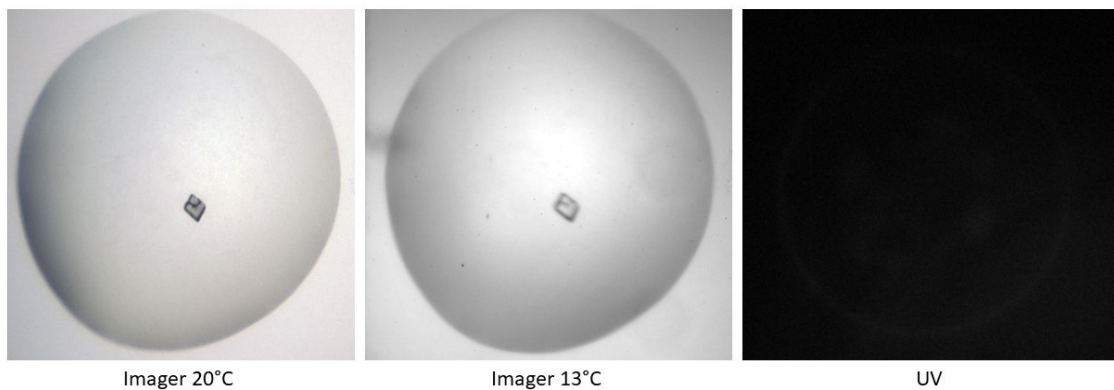
HR Index F2 Well 1

0,2 M Trimethylamin N-oxid

0,1 M Tris pH 8,5

20% Poly-(ethylenglykol)-methylether 2000

Abbildung 37 Proteinkristall bei 20° C bzw. 13° C mit UV-Bild und Kristallisationsbedingung



Kristallisationsbedingung:

JBS Classic 1-4 D4 Well1

0,2 M CaCl₂

0,1 M Tris pH 8,5

25% Polyethylenglykol 4000

Abbildung 38 Proteinkristall bei 20° C bzw. 13° C mit UV-Bild und Kristallisationsbedingung

Dass es sich hier um Proteinkristalle und keine Salzkristalle handelt kann man am schwachen Umriss im UV-Bild erkennen, der mit der Position des Kristalls übereinstimmt. Leider zerfiel der Kristall der JBS Classic Bedingung, bevor er mit

Röntgenstreuung untersucht werden konnte. Der Kristall der HR Index Bedingung war stabil genug, um gemessen werden zu können, allerdings war die Röntgenstreuung zu schwach, dass keine Beugungsmuster aufgenommen werden konnten. Mit den funktionierenden Kristallisationsbedingungen als Ausgangspunkt, wurden erneut 15-Well-Platten für weitere Kristallisationsexperimente nach dem Schema in Abb. 39 beschrieben angesetzt.¹⁴⁵ Die Variation der Bedingungen dient dazu den Aufbau der Kristalle zu verbessern. Außerdem ändert man die Größe der Verwendeten Tropfen, um im Idealfall mehr und größere Kristalle zu erhalten.

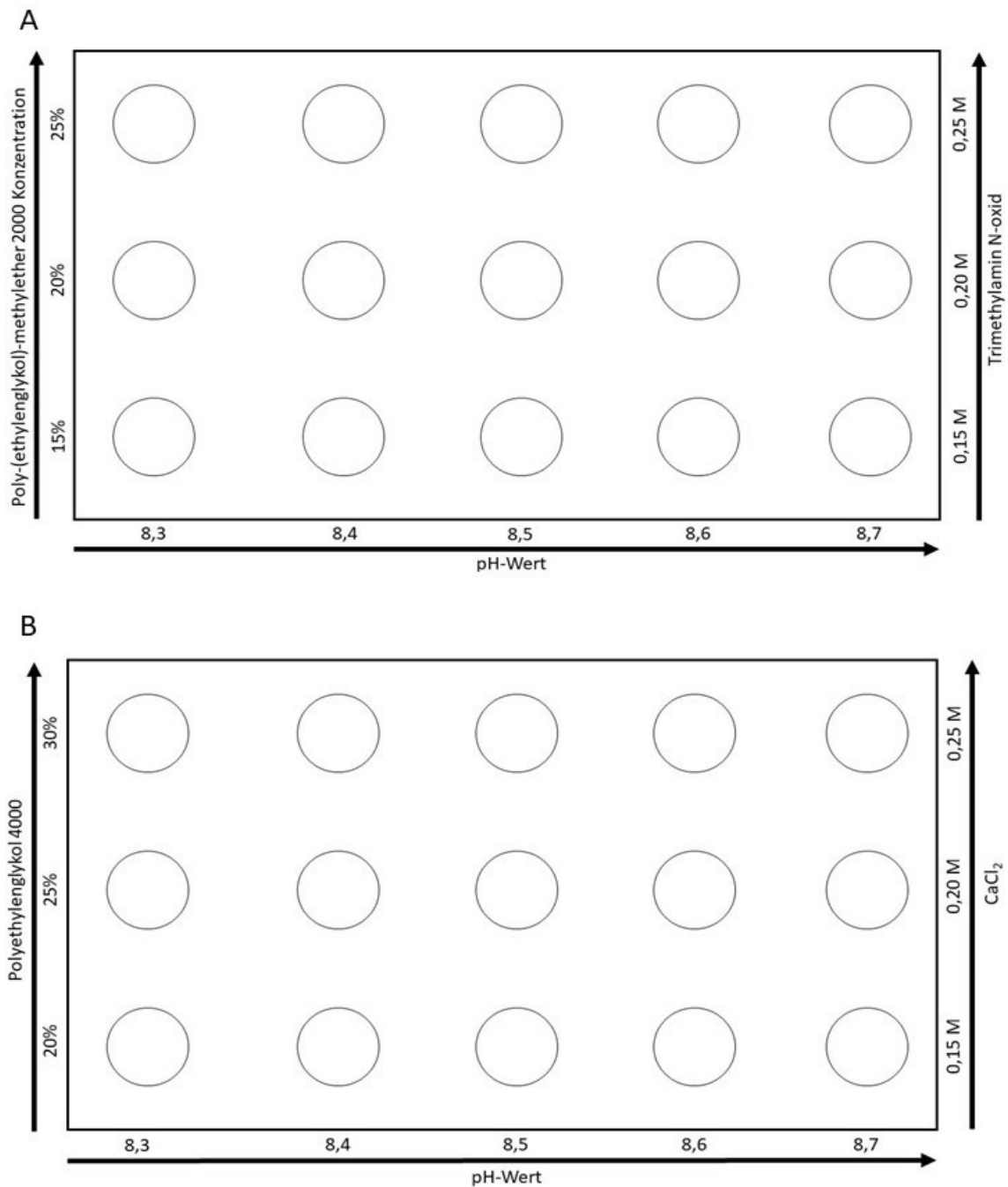


Abbildung 39 A: Kristallisationsbedingung nach HR Index B: Kristallisationsbedingung nach JBS Classic 1-4

Bei den neuen Ansätzen wurde, wie in Abb. 39 A zu sehen, nicht nur der pH-Wert, sondern auch die Poly-(ethylenglykol)-methylether 2000 Konzentration und die Trimethylamin-N-oxid Konzentration variiert, um eventuell stabile messbare Kristalle zu erhalten. In Abb. 39 B sind ebenfalls die Konzentrationen von Polyethylenglykol 4000 und CaCl_2 variiert worden, um bessere Kristalle zu erhalten. Allerdings bildeten sich diesmal nur Mikrokristalle, die nicht in der Röntgenstreuung gemessen werden konnten.

3.2.3 Diskussion

Rekapituliert man nochmal die Zielsetzung dieses Teilprojekts: Ziel war es, rekombinant MBP in den Ausführungen rmMBP C1WT und rmMBP C1S17CH85C zur weiteren Verwendung im Projekt „Wasser/Ionische Flüssigkeitgemische als Minimalmodell für Lipiddoppelschichtmembranen“, beschrieben in Kapitel 3.3, herzustellen. Begonnen hat alles mit Vektoren und einer Anleitung, die von Harauz *et al.* zur Verfügung gestellt wurden. Die Expression und Reinigung gestaltete sich schwieriger als gedacht und im Zuge dessen musste der gesamte Herstellungsprozess überarbeitet werden, um genügend Protein für zukünftige Projekte zu generieren.

Dazu wurde der Herstellungsprozess zuerst in sechs einfache Schritte unterteilt und durch das geschickte Eingreifen in bestimmte Teilprozesse konnte durch Optimierung die Ausbeute maximiert werden. Zuerst wurde der ideale Zielorganismus für die Vektoren ermittelt, ein positiver Nebeneffekt dieser Expressionsexperimente war gleichzeitig die Gewinnung der Informationen über die optimale Inkubationszeit der Zellen nach der Induktion. Als nächstes wurde der Reinigungsprozess überprüft, auch hier konnte durch geringfügige Änderungen, wie den Austausch der Chromatographie-Säulen, das bestmögliche Ergebnis erzielt werden und allein deshalb war dieses Teilprojekt ein voller Erfolg.

Zusätzlich konnten durch das überschüssig generierte Protein Kristallisationsexperimente durchgeführt werden. Obwohl es sich bei MBP um eines der entscheidenden Proteine für demyelinisierende Krankheiten handelt, gibt es aufgrund seines IDP-Charakters, bisher keine Kristallstruktur lediglich, NMR-Teilstrukturen bzw. mit AlphaFold Strukturen, die auf Berechnung einer KI zurückzuführen sind. Leider waren diese Experimente nicht von Erfolg gekrönt, aber es konnten wichtige Grundlagen auf diesem Gebiet gewonnen werden und wenn dieses Projekt in Zukunft übernommen wird, sollten diese Experimente auf jeden Fall weiter betrieben werden.

3.3 Wasser/Ionische Flüssigkeitgemische als Minimalmodell für Lipiddoppelschichtmembranen

Das letzte Projekt dieser Arbeit ist eine Kombination aus den vorausgegangenen Kapiteln. Dabei geht es darum, aus dem richtigen Verhältnis von Puffer zu Ionischer Flüssigkeit pseudo-Membran-Systeme zu kreieren, in die sich MBP falten kann.

Es wurde 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat (BMIm) verwendet, eine Ionische Flüssigkeit, die bei Raumtemperatur flüssig und in jedem Verhältnis mischbar mit Wasser ist. Als Puffer wurde HEPES verwendet, dabei handelt es sich um eine Puffersubstanz, die gut löslich ist, nicht durch Biomembranen diffundiert, möglichst wenig mit dem Protein wechselwirkt und einen pH-Wert ähnlich dem menschlichen Gehirn aufweist. PBS-Puffer wurde nicht verwendet, da es sich in früheren Arbeiten und Projekten gezeigt hat, dass er mit dem Protein wechselwirkt und eher zur Aggregation führt, vgl. Kapitel 3.1.

Bei dem Projekt wurde systematisch vorgegangen, zuerst wurden Mischungen von IL und Puffer ohne Protein von 0-100 vol% in 5 % Schritten erstellt und charakteristische Kenngrößen wie Brechungsindex und Viskosität gemessen. Anschließend wurden DLS durchgeführt, um das optimale Mischungsverhältnis zu finden. Aus früheren Arbeiten gab es Anhaltspunkte, wo dieses ungefähr zu finden sei.^{139,149} Nachdem das optimale Mischungsverhältnis gefunden war, wurden die Messungen mit Protein wiederholt, erst mit niedrigen Konzentrationen und dann mit Höheren, um ein genaues Bild von dem Einfluss der IL/Puffer Gemische auf das Protein zu erhalten.

3.3.1 Ergebnisse Brechungsindex und Viskosität

Beim Brechnungsindex und der Viskosität handelt es sich um stoffspezifische Kenngrößen, die einen Reinstoff oder ein Stoffgemisch charakterisieren können. Da beide Größen temperaturabhängig sind, wurden Temperaturreihen durchgeführt, wie in Kapitel 4.7 bzw. 4.8 beschrieben, die Probenvorbereitung erfolgte wie in Kapitel 4.2.3. In Tabelle 5 finden sich die Ergebnisse für ausgewählte HEPES/BMIm Mischungen, die weiteren Ergebnisse für die anderen Mischungen befinden sich im Anhang. Bei den Ergebnissen der HEPES/BMIm Mischungen zeigen sich keine Auffälligkeiten, mit steigendem IL-Gehalt steigt auch der Brechungsindex.¹²⁷

Tabelle 5 Brechungsindex HEPES, BMIm 45 und 50

TEMPERATUR [°C]	HEPES	BMIM 45	BMIM 50
20	1,33388	1,36907	1,37477
25	1,33336	1,36794	1,37368
30	1,33277	1,3669	1,37246
35	1,33212	1,36571	1,37124
37	1,33183	1,3654	1,37084

Nach dem Brechungsindex erfolgte die Messung der Viskosität, wie zuvor in Kapitel 3.1.1.1 handelt es sich dabei um den Mittelwert der dynamischen Viskosität, gebildet aus 40 Messpunkten. Aus den Werten ist ersichtlich, dass es sich bei diesen Mischungen um Newton'sche Fluide handelt. Die Ergebnisse für eine Auswahl an Mischungen sind in Tabelle 6 abgebildet.¹³⁷

Tabelle 6 Viskosität von HEPES, BMIm 45 und 50

TEMPERATUR [°C]	HEPES [PA*S]	BMIM 45 [PA*S]	BMIM 50 [PA*S]
20	0,001020	0,001672	0,001851
25	0,000958	0,001460	0,001557
30	0,000668	0,001324	0,001443
35	0,000512	0,001198	0,001343
37	0,000493	0,001166	0,001242

Die weiteren Ergebnisse für die restlichen Mischungen finden sich im Anhang.

3.3.2 DLS-Ergebnisse

Dieser Teil der Arbeit befasst sich mit den DLS-Messungen und ihrer Ergebnisse und bilden die Grundlage des gesamten Teilprojekts. In früheren Projekten von Cerajewski *et al*¹³⁹ wurde herausgefunden, dass BMIm und Puffer im richtigen Mischungsverhältnis Mizelläre Strukturen ausbilden und dass das bei MBP einen Selbstanordnungsprozess auslöst und es sich in die vorhandene Struktur faltet. Um ein noch detaillierteres Bild dieser Strukturen zu erhalten, wurden die Experimente zuerst wiederholt und dann verfeinert. In besagter früherer Arbeit stellte sich eine 1:1 Mischung aus BMIm und HEPES als optimal heraus, mit diesem Wert als Ausgangspunkt wurden zuerst umfangreiche Mischungsexperimente durchgeführt.

Die Probenvorbereitung erfolgte, wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben. Am Anfang galt es, die perfekte Mischung zu finden, dafür wurden Mischungen von 0-100 vol% in 5 vol% Schritten hergestellt und systematisch im DLS gemessen. Anhand der Autokorrelationsfunktionen in Rückwärtsstreuung und Seitwärtsstreuung und der dazugehörigen Partikelgrößenverteilung wurde entschieden, ob ein Mischungsverhältnis geeignet war oder nicht. In Abb. 40 sind ausgewählte Autokorrelationen zu sehen, alle Weiteren befinden sich im Anhang.

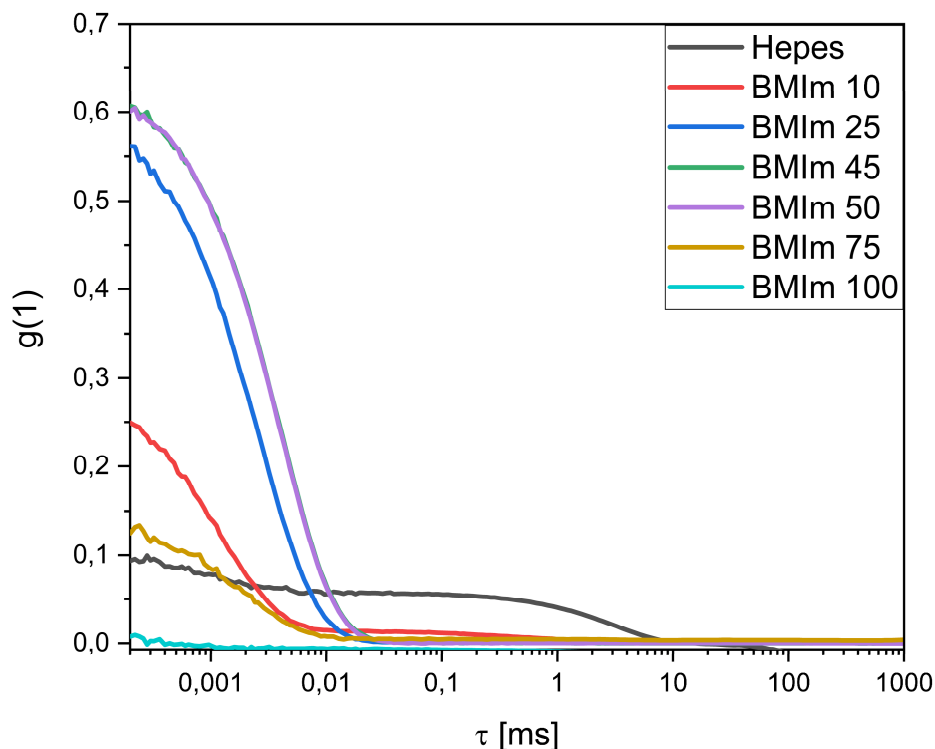


Abbildung 40 Ergebnisse Rückwärtsstreuung Autokorrelationsfunktionen von HEPES, BMIm 10, BMIm 25, BMIm 45, BMIm 50, BMIm 75 und BMIm 100

Betrachtet man ausschließlich die Autokorrelationsfunktionen, kommen mehrere Mischungen infrage. Es ist auffällig, dass die Korrelations-Zeit-Funktion mit steigender Konzentration größer wird bis bei BMIm 45 und 50 ein maximum erreicht wird, danach führt eine weitere Erhöhung des BMIm Anteiles zu einem Absinken der Autokorrelation. Wird zusätzlich noch die Partikelgrößenverteilung in diesen Prozess mit einbezogen, stechen die beiden Mischungsverhältnisse besonders hervor.

In Abb. 41 sind die Autokorrelationsfunktionen und Partikelgrößenverteilung für BMIm 45 und 50 dargestellt.

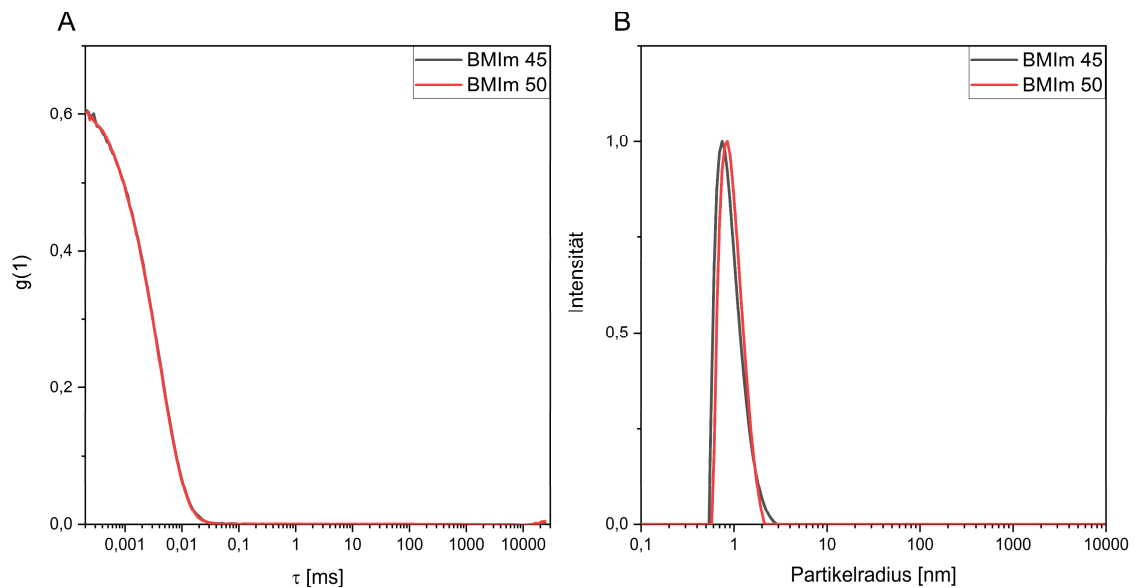


Abbildung 41 A: Autokorrelation Rückwärtsstreuung für BmIm 45 und 50 B: Partikelgrößenverteilung von BmIm 45 und 50

Aus den Daten lässt sich schließen, dass es sich bei diesen Mischungsverhältnissen um ein Optimum handelt. Deswegen wurden für alle weiteren Messungen diese beiden Mischungsverhältnisse verwendet.

Als nächstes wurden die DLS-Messungen mit bMBP wiederholt, es wurden erst kleine Mengen von 2-10 μM eingesetzt, wie bei Cerajewski *et al.*¹³⁹ Da die Messungen aber mit anderen Methoden verglichen werden sollten, für die Proteinkonzentrationen von mindestens 100 μM benötigt werden, wurden Messreihen mit Konzentrationen von 100-285,5 μM durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit zu wahren, werden nur die Ergebnisse der hohen Konzentrationen in die Diskussion mit einbezogen. Um zusätzliche Informationen über das Protein zu erhalten, wurden für bMBP und zwei weitere Varianten wieder Temperaturreihen von 20-37° C gemessen. In Abb. 42 sind die Partikelgrößen gegen die Temperatur aufgetragen für bMBP, C1WT und C1S17CH85C. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um eine mittlere Konzentration von 150 μM , da alle Konzentrationen ähnliche Ergebnisse zeigen dient dieses Beispiel zur vereinfachten Visualisierung. Die Detaillierten Messreihen und ihre Auswertung befinden sich im Anhang.

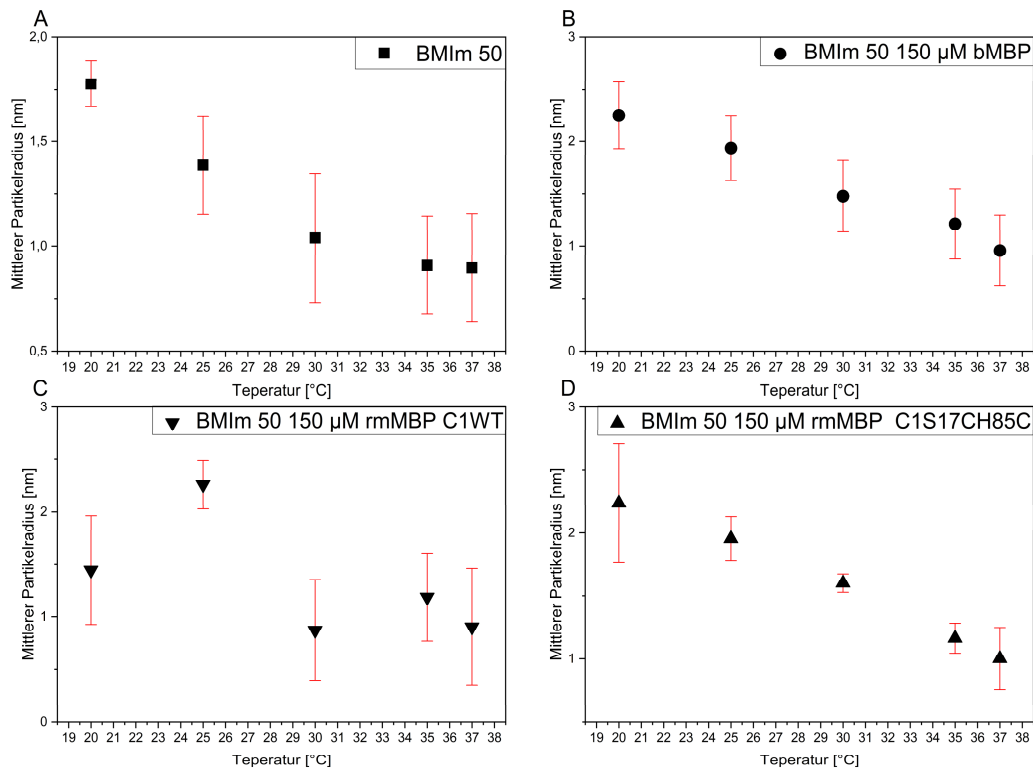


Abbildung 42 Temperaturreihe für BMIIm 50 A: BMIIm 50 B: BMIIm 50 150 µM bMBP C: BMIIm 50 150µM C1WT D: BMIIm 50 150 µM C1S17CH85C

In Abb. 42 ist der mittlere Partikelradius der Rückwärtsstreuung gegen die Temperatur aufgetragen, die eingezeichneten Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Peakbreite auf halber Höhe. Abb. 42 A zeigt, dass sich in einer 50 %igen wässrigen BMIIm Lösung Strukturen ausbilden, die mittels DLS gemessen werden können. Anhand der Temperaturreihe zeigt sich, dass sich die Größe dieser Strukturen mit zunehmender Temperatur zu kleineren Partikelradien verschiebt. Dieser Effekt kann auch nach Zugabe des MBPs beobachtet werden, in Abb. 42 B-D sind die mittleren Partikelradien für unterschiedliche MBP-Varianten aufgetragen. Es zeigt sich, dass die Partikelradien mit steigender Temperatur abnehmen. Generell sind nur Partikelradien zwischen 3 und 0,9 nm zu sehen. Im Vergleich zeigen MBP-Varianten in reinem Puffer riesige Aggregate (vgl. Abb. 62-65 im Anhang). Daraus lässt sich schließen, dass die ermittelten Mischungsverhältnisse und ihre vorhandenen Nanostrukturen das Lösen von Proteinaggregaten ermöglichen. Im weiteren Verlauf muss festgestellt werden ob, diese Nanostrukturen pseudo-Membranstrukturen nachahmen und so eventuell als Membranmodell für MBP eingesetzt werden können.

Wie zuvor erwähnt, erlauben DLS-Messungen keine Aussagen über Form und Beschaffenheit der Probe. Allerdings lässt sich mittels Seitwärts- und Rückwärtsstreuung ein Formfaktor berechnen, wie bereits angewendet von Eisermann *et al.*¹⁵⁰ Dies erlaubt Aussagen über Form und Größe der einzelnen Partikel. In Abb. 43 ist der mittlere Partikelradius der Seitwärtsstreuung gegen den mittleren Partikelradius der

Rückwärtsstreuung aufgetragen, die Fehlerbalken in x- und y-Richtung sind wieder die mittleren Peakbreiten auf halber Höhe.

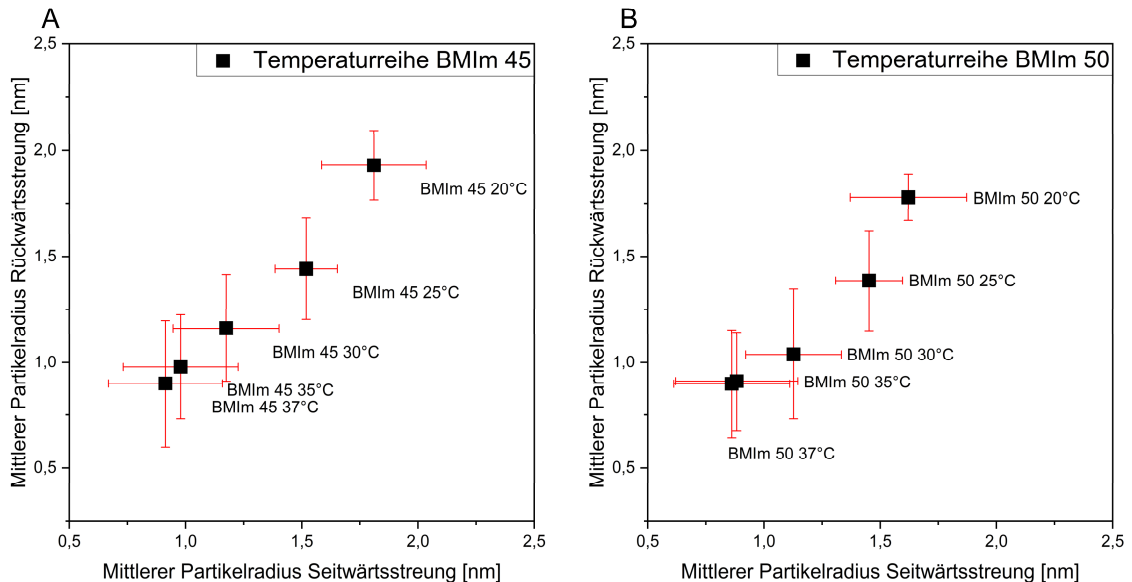


Abbildung 43 Mittlere Partikelradien der Seitwärts- gegen die Rückwärtsstreuung A: Temperaturreihe von BMIm 45 B: Temperaturreihe von BMIm 50

Auf den ersten Blick ist der eindeutige Trend zu erkennen, dass mit steigender Temperatur die Partikelradien abnehmen. Als nächstes fällt auf, dass mit zunehmender Temperatur ein Umwandlungsprozess von elliptischen zu runden Formen stattfindet. Vermutlich ist dieser thermodynamisch getriebene Prozess ebenfalls für das „Schrumpfen“ der vorhandenen Strukturen verantwortlich. Die dynamische Lichtstreuung liefert einen Einblick in die Partikelgrößenverteilung von unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von IL und Puffer. Die dadurch ermittelte optimale Mischung, wurde als Grundlage für weitere Experimente mit MBP als Modell-Membranprotein verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass wässrige BMIm-Mischungen im Verhältnis von 45-50 vol% dazu in der Lage sind die Proteinaggregate, die MBP in wässrigen Lösungen bildet, zu lösen. Es ist davon auszugehen, dass die Struktur der Mischungen auf lokale Konzentrationsunterschiede, aufgrund des Amphiphilen Charakters des BMIm, zurückzuführen ist. Die so entstehenden mizellaren Strukturen könnten mit MBP in Wechselwirkung treten und so eine Pseudomembran anbieten, in die sich MBP falten kann, ähnlich seinem nativen Zustand. Um diese Theorie zu unterstützen, müssen weitere Experimente mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden.

3.3.3 ELS-Ergebnisse

Eine dieser Methoden zur Charakterisierung des Einflusses von BMIm/Wasser Mischungen auf die Struktur und Dynamik von MBP ist die elektroforetische Lichtstreuung. Hierbei werden das Zetapotential und die elektroforetische Mobilität zuerst in Puffer und dann mit unterschiedlichen Konzentrationen BMIm gemessen, um durch die Veränderung Rückschlüsse auf die Interaktion von IL und Protein ziehen zu können. Auch hier wurden die optimalen Mischungsverhältnisse von 45 und 50 vol% verwendet, es wurden Temperaturreihen von 20-37° C mit Konzentrationen von 100-285,5 µM aufgenommen. Um die bestmögliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die MBP-Varianten C1WT und C1S17CH85C verwendet, bei beiden handelt es sich um reine Ladungsvarianten und kein Gemisch wie bei bMBP, ihre Oberflächenladung beträgt +19. Das Zetapotential für die unterschiedlichen Konzentrationen von MBP wurde durch Messung der elektroforetischen Mobilität mittels Laser-Doppler-Velocimetrie (LDV) und durch Einsetzen der hydrodynamischen Radien aus den DLS-Messungen in die Henry-Funktion berechnet. Alle Messungen wurden bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 durchgeführt.

Wie zu erwarten, liegt das mittlere Zetapotential von C1WT und C1S17CH85C im positiven bei ca. 20 mV, mit steigender Temperatur erfolgt über 30° C ein steiler Abfall (vgl. Abb. 44 A und B). Dies könnte mit dem Aggregationsverhalten von MBP zusammenhängen, denn wie die DLS-Ergebnisse in Kapitel 3.3.2 gezeigt haben, fördern höhere Temperaturen die Aggregation von MBP in Puffer. Des Weiteren kann ein Konzentrationseffekt beobachtet werden. Betrachtet man die Ergebnisse für 285,5 µM von beiden Varianten, so zeigt sich, dass sie bereits bei niedrigen Temperaturen ein wesentlich geringeres Zetapotential aufweisen. Nun ist über MBP bekannt, dass die Aggregation ebenfalls konzentrationsabhängig ist. Deswegen ist die Theorie, dass das Zetapotential abhängig von der Größe und Menge der Aggregate ist, gar nicht so abwegig.

Betrachtet man nun die Zetapotentiale für die BMIm-Mischungen 45 und 50 vol%, befinden diese sich im schwach positiven Bereich zwischen 0 und 0,8 mV, was man bei einem Salz, das nach außen Neutral geladen ist, durchaus erwarten kann (vgl. Abb. 44 C-F). Bezieht man zusätzlich noch die Messungen mit den unterschiedlichen Proteinkonzentrationen mit ein, fällt auf, dass die mittleren Zetapotentiale nur noch ca. 1/10 des ursprünglichen Wertes von 0-2 mV erreichen.

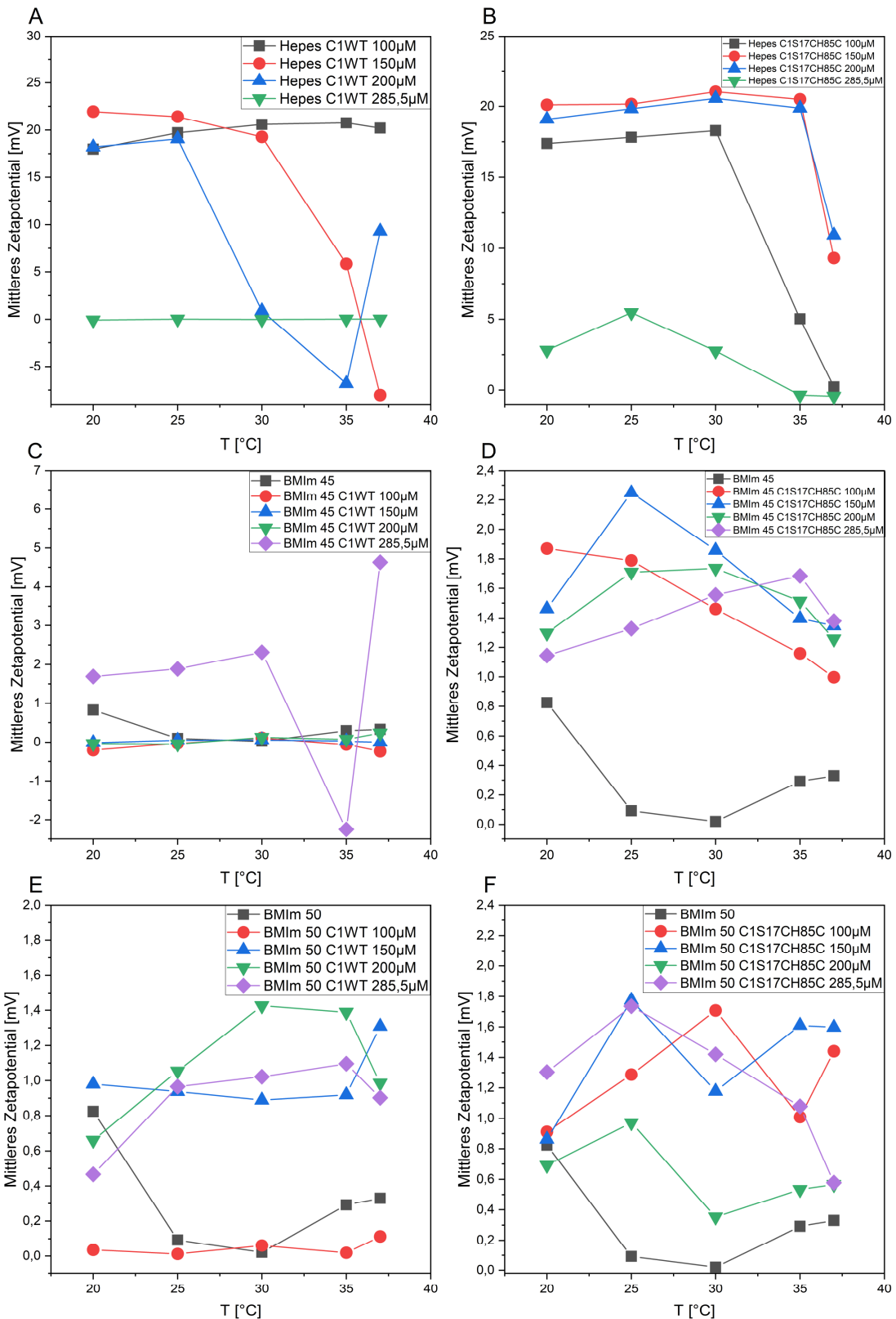


Abbildung 44 A: Temperaturserie Mittleres Zetapotential von C1WT in HEPES-Puffer B: Temperaturserie Mittleres Zetapotential von C1S17CH85C in HEPES-Puffer C: Temperaturserie Mittleres Zetapotential von C1WT in BMIm 45 D: Temperaturserie Mittleres Zetapotential von C1S17CH85C in BMIm 45 E: Temperaturserie Mittleres Zetapotential von C1WT in BMIm 50 F: Temperaturserie Mittleres Zetapotential von C1S17CH85C in BMIm 50

Ein ähnliches Verhalten kann auch bei den elektroforetischen Mobilitäten beobachtet werden (vgl. Abb. 65 im Anhang). Wie lässt sich diese Verringerung des Zetapotentials

erklären? MBP ist ein stark geladenes Protein und bei den Ionischen Flüssigkeiten handelt es sich um flüssige Salze. Aus den DLS-Messungen geht hervor, dass IL/Wasser-Mischungen Strukturen ausbilden. Deshalb liegt die Vermutung nah, dass MBP mit diesen Strukturen interagiert und so ein Teil der Oberflächenladung durch die negativen Ladungen des Gegenions der IL ausgeglichen wird, was zu einer Verringerung der elektrophoretischen Mobilität und somit auch zum Absinken des Zetapotentials führt.

3.3.4 EPR-Ergebnisse

Die EPR-Spektroskopie kann in zwei große Bereiche unterteilt werden, einmal die continuous wave (cw) EPR-Spektroskopie und die Puls-EPR-Spektroskopie. Dabei unterscheiden sich diese beiden Methoden im Wesentlichen darin, wie die freien Elektronen angeregt werden. Bei der cw-EPR werden die Elektronen mit einer kontinuierlichen Mikrowelle angeregt, wohingegen bei der Puls EPR die Anregung durch mehrere Mikrowellenpulse erfolgt, was eine zeitaufgelöste Detektion ermöglicht.

3.3.4.1 cw-EPR Ergebnisse

Da für die EPR-Spektroskopie immer freie Elektronen oder ein paramagnetisches Zentrum, wie z.B. Metallionen, benötigt wird, mussten den Proben stabile Radikale wie, z.B. Nitroxide zugesetzt werden, um sie überhaupt vermessen zu können. Dies geschah auf zwei unterschiedliche Arten. Zuerst wurden stabile Radikale in Form von 16-DSA und TEMPO zugesetzt, bei dieser Methode spricht man von Spinprobing. Hierbei werden nicht die einzelnen Komponenten wie IL und MBP direkt gemessen, sondern es wird die Interaktion der Spinsonde mit ihrer Umgebung beobachtet, weshalb hier Messungen mit und ohne MBP von großer Bedeutung sind, da jeweils nur die Veränderung der Umgebung gemessen werden kann, um so Rückschlüsse auf die Interaktion von Protein mit IL ziehen zu können.

Die Auswertung erfolgte durch eine Simulation im Programm Matlab (R2017a) mit der Toolbox EasySpin.¹⁵¹ Aus den Simulationen wurden die Parameter für die Hyperfeinaufspaltung und die Rotationskorrelationszeit ausgelesen und analysiert. Die Hyperfeinaufspaltungskonstante ermöglicht Aussagen über die Polarität der Umgebung, denn je größer die Konstante desto polarer ist die Umgebung. Die Rotationskorrelationszeit gibt Aufschluss über die Geschwindigkeit mit der die Spinsonde rotieren kann. Für die Messungen mit MBP wurde die C1WT-Mutante verwendet.

EPR Spektren 16-DSA

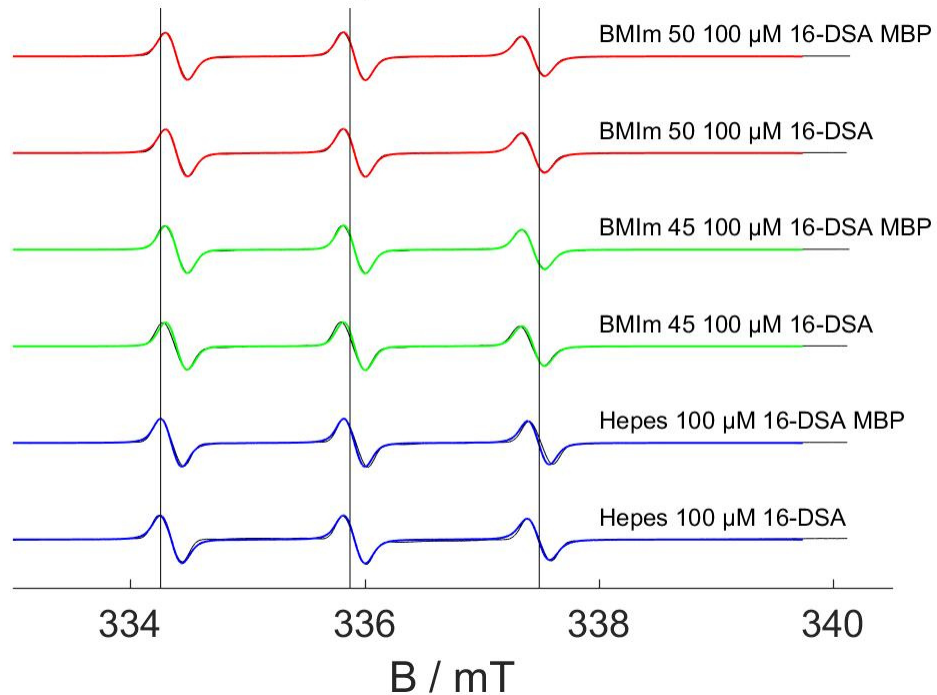


Abbildung 45 Normierte EPR-Spektren (schwarz) und Simulation (HEPES, BMIm 45 und BMIm 50) der Messungen von 16-DSA bei 37° C mit und ohne MBP

In Tabelle 7 befinden sich die Ergebnisse der Simulation:

Tabelle 7 Simulationsergebnisse der Parameter der EPR-Spektroskopie für 16-DSA

PROBENNAME	HYPERFEIN AUFSPALTUNG (A_{iso}) [MHZ]	ROTATIONSKORRELATIONSZEIT [PS]
HEPES	44,00	77,00
HEPES + MBP	44,00	53,60
BMIM 45	42,75	477,00
BMIM 45 +MBP	42,75	477,00
BMIM 50	42,75	477,00
BMIM 50 +MBP	42,75	477,00

Aus den Ergebnissen der Simulationen ist eine deutliche Änderung zu erkennen, wie sich zeigt nimmt die Hyperfeinaufspaltung ab, dies spricht dafür, dass sich die Polarität der Umgebung der Spinsonde verringert hat. Dies kann durch die Struktur der IL erklärt werden, sie besitzt einen amphiphilen Charakter und somit hydrophobe Teile, die mit der Spinsonde in Wechselwirkung treten können. Zusätzlich sieht man eine deutliche Verlangsamung der Rotation, die Rotationskorrelationszeit der Proben die BMIm enthalten, ist 6mal größer als in Proben ohne BMIm. Dies kann durch die höhere Viskosität von BMIm und BMIm/Wasser-Gemischen erklärt werden (vgl. Tabelle 6). Als nächstes fällt auf, dass bei den Messungen mit Protein nur ein Unterschied der

Rotationskorrelationszeit im Vergleich mit Puffer zu sehen ist, was dafür spricht, dass in Mischungen mit BMIm das Protein nicht mit der Spinsonde interagiert. Bei 16-DSA handelt es sich um eine Fettsäure und bei MBP um ein Membranprotein, weshalb man eine gewisse Affinität erwarten würde.

Um auszuschließen, dass die Spinsonde ungeeignet für das System war, wurden die Messungen mit TEMPO wiederholt.

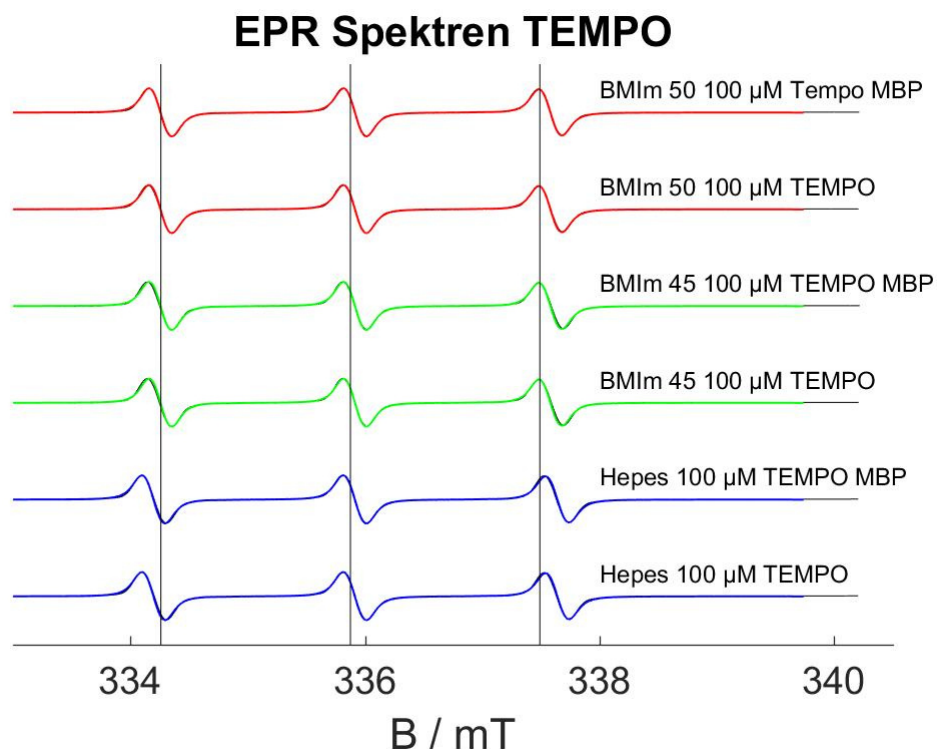


Abbildung 46 Normierte EPR-Spektren (schwarz) und Simulation (HEPES, BMIm 45 und BMIm 50) der Messungen von TEMPO bei 37° C mit und ohne MBP

Tabelle 8 Simulationsergebnisse der Parameter der EPR-Spektroskopie für TEMPO

PROBENNAME	HYPERFEIN AUFSPALTUNG (A_{iso}) [MHZ]	ROTATIONSKORRELATIONS-ZEIT [PS]
HEPES	48,33	16,66
HEPES + MBP	48,33	16,66
BMIM 45	46,66	16,66
BMIM 45 +MBP	46,66	16,66
BMIM 50	46,66	16,66
BMIM 50 +MBP	46,66	16,66

Was sofort ins Auge fällt, ist, dass die Rotationskorrelationszeiten alle gleich sind obwohl die Proben die BMIm enthalten eine wesentlich höhere Viskosität haben. Das lässt darauf schließen, dass die Rotationskorrelationszeit nicht nur von der Viskositätsänderung, sondern auch von der Interaktion mit der gebildeten Struktur abhängig ist. Weiter ist zu

sehen, dass die Polarität der Umgebung mit der Zugabe von BMIm abnimmt, aber immer noch größer ist als bei der Verwendung von 16-DSA. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich TEMPO in einem anderen Milieu aufhalten muss als 16-DSA. Aber auch hier sieht man keine Veränderung durch die Zugabe von MBP, deshalb blieb nichts anderes übrig, als gelabeltes C1S17CH85C zu verwenden, um die Interaktion des Proteins mit der Nanostruktur zu untersuchen.

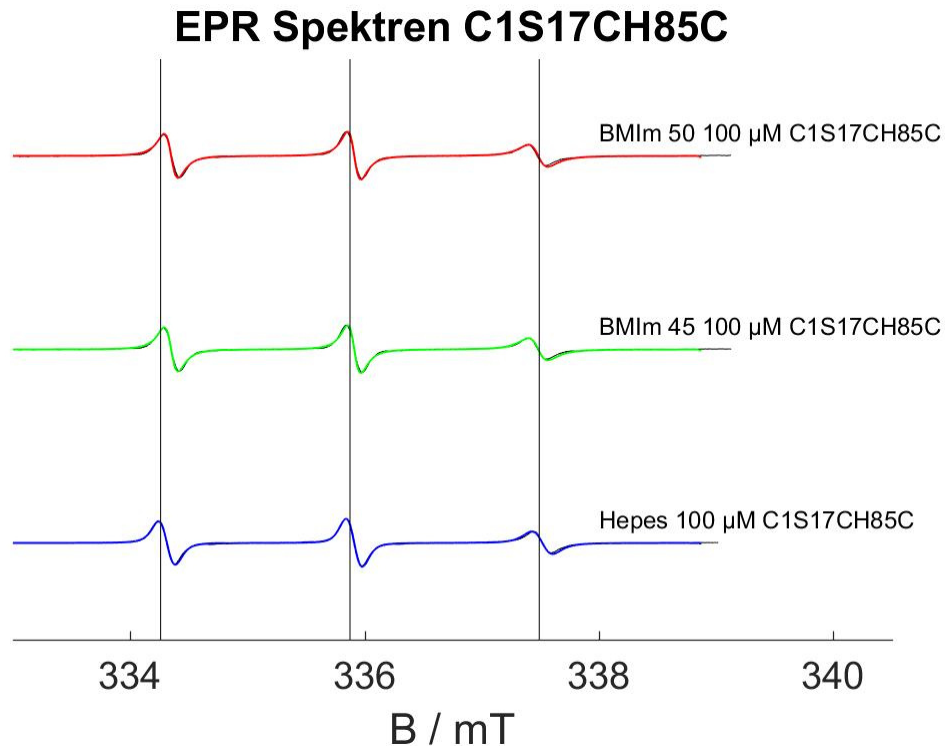


Abbildung 47 Normierte EPR-Spektren (schwarz) und Simulation (HEPES, BMIm 45 und BMIm 50) der Messungen von C1S17CH85C bei 37° C

Was bei den Spektren der gelabelten Proteine sofort auffällt, ist, dass sich die Form grundlegend verändert hat. Der Highfield-Peak ist nur halb so groß wie Center- und Low-field-Peak. Dies zeugt davon, dass die Rotation um die z-Achse eingeschränkt ist. In Tabelle 9 finden sich die Werte der Simulationen.

Tabelle 9 Simulationsergebnisse der Parameter der EPR-Spektroskopie für C1S17CH85C

PROBENNAME	HYPERFEIN AUFSPALTUNG (A_{iso}) [MHZ]	ROTATIONSKORRELATIONS-ZEIT [PS]
HEPES	45,00	366,00
BMIM 45	44,33	209,00
BMIM 50	44,33	209,00

Es ist zu sehen, dass Proben die BMIm enthalten, eine geringere Hyperfein Aufspaltung aufweisen, dies kommt von der verringerten Polarität der Umgebung. Zusätzlich wird die Rotationskorrelationszeit geringer. Vergleicht man dies mit den vorangegangenen

Messungen fällt auf, dass die Rotationskorrelationszeit bei der Zugabe von BMIm entweder gleichgeblieben oder gestiegen ist. Eine mögliche Erklärung liefern die Ergebnisse der DLS-Messungen, es war zu sehen, dass die Zugabe von BMIm MBP Aggregate auflöst. Dies würde erklären, warum sich die Rotationskorrelationszeit verringert, obwohl sich die Viskosität der Probe erhöht. Durch das Auflösen der Aggregate kann sich das Protein viel freier bewegen und so könnte die verringerte Rotationskorrelationszeit erklärt werden. Da alle Proben bei derselben Temperatur gemessen wurden, können thermodynamische Effekte ausgeschlossen werden, auch Konzentrations Effekte sind zu vernachlässigen, da Konzentration von Spinsonde und Protein bei allen Messungen nahezu identisch sind.

3.3.4.2 DEER-Ergebnisse

Mittels Double Electron Electron Resonance (DEER) Messungen sollte der intramolekulare Abstand zwischen den beiden Label-Positionen bzw. seine Veränderung gemessen werden. Aus den DLS-Daten und den EPR-Daten konnte bis jetzt nur eindeutig bestimmt werden, dass wässrige BMIm Mischungen im optimalen Verhältnis dazu in der Lage sind, MBP-Aggregate aufzulösen. Um nachzuweisen, dass MBP strukturiert in der Lösung vorliegt, ähnlich seiner Konformation in der Myelinscheide, wurden DEER-Messungen durchgeführt. Aus der Literatur ist bekannt, dass MBP drei α -helikale Strukturen bildet, eine dieser Helices befindet sich bei der Aminosäuresequenz 80-90. Deshalb wurde für die Experimente die Doppelcysteinmutante C1S17CH85C gewählt, da ein Cystein sich innerhalb dieser Helix befindet. Da nur der Abstand zwischen zwei Labeln bestimmt werden kann, wurden an die Cysteinreste MTSSL-Spinlabel gebunden, der Mechanismus dieser Reaktion ist in Kapitel 4.2.4.2 einzusehen. Um also eine Änderung der intramolekularen Abstände zu messen, wurden die Proben wie in Kapitel 4.2.4.2 vorbereitet und wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben gemessen. Alle Messungen wurden bei 50 K durchgeführt, es wurde immer Protein in HEPES, BMIm 45 und BMIm 50 bei unterschiedlichen Abklingzeiten gemessen.

Die erhaltenen Zeitspur-Daten wurden mittels der Software DeerAnalysis 2019 (G.Jeschke) ausgewertet.¹³⁹ (detaillierte Durchführung der siehe Kapitel 4.5.2). In Abb. 48 sind die Zeitspuren für die Proben bei unterschiedlich langen Messzeiten und die dazugehörigen Spin-Abstandsverteilungen gezeigt.

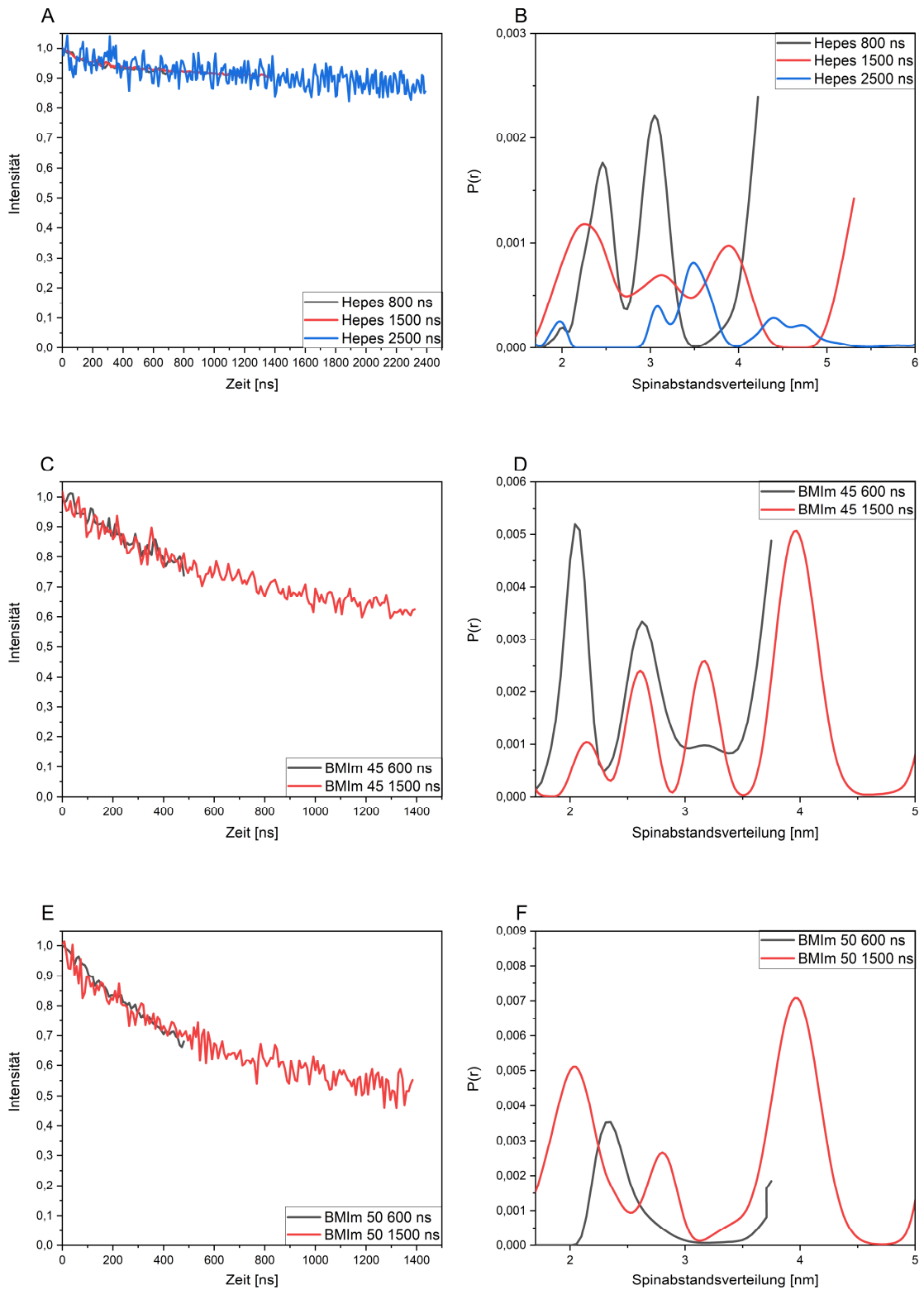


Abbildung 48 Ergebnisse DEER-Messungen A: Zeitspur von 100 mM C1S17CH85C in HEPES-Puffer für verschiedene Zeiten B: Spin-Abstandsverteilung von C1S17CH85C in HEPES-Puffer für unterschiedliche Messzeiten C: Zeitspur von 100 mM C1S17CH85C in BMIm45 für verschiedene Zeiten D: Spin-Abstandsverteilung von C1S17CH85C in BMIm45 für unterschiedliche Messzeiten E: Zeitspur von 100 mM C1S17CH85C in BMIm50 für verschiedene Zeiten F: Spin-Abstandsverteilung von C1S17CH85C in BMIm50 für unterschiedliche Messzeiten

In Abb. 48 A sind die Zeitspuren von C1S17CH85C in HEPES-Puffer zu sehen, in Abb. 48 B sind die dazugehörigen Spin-Abstandsverteilungen (validierte Ergebnisse siehe Anhang). Was auffällt, ist, dass die Zeitspuren sehr flach abfallen, ihr Abfall liegt zwischen 1 und 0,9. Zusätzlich ist das Signal-Rausch-Verhältnis sehr schlecht und wird mit steigender Messdauer schlechter. Aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses und des schwachen Abfalls der Zeitspur, kann man die Ergebnisse der Spin-Abstandsverteilung höchstens als Trend ansehen und nicht als absolute Werte.

Da bekannt ist, dass MBP in wässriger Lösung Aggregate bildet, könnten die gemessenen Abstände auch intermolekularer und nicht intramolekularer Natur sein. Bei Abstandsverteilungen unter 1,8 nm wird die Protonen-Kopplung mit dem Kern gemessen, deswegen können alle Verteilungen unter 1,8 nm ignoriert werden.^{117,152} Ähnlich verhält es sich mit Verteilungen über 5 nm, um zuverlässige Daten zu erhalten, müssten Messungen von mehr als 3 μ s durchgeführt werden. Außerdem ist davon auszugehen, dass man sich im Bereich von intermolekularen Abständen befindet.¹¹⁷

Durch den Vergleich von Abb. 48 A mit C und E fällt auf, dass diese Zeitspuren einen deutlichen Abfall zeigen, der Abfall entspricht der Modulationstiefe. Dementsprechend sind die Peaks für 1500 ns auch Basislinien getrennt. Generell befinden sich die Peaks von 600 ns und 1500 ns an der gleichen Position, was dafür spricht, dass es sich hier um reale Distanzen der Spin-Abstandsverteilung handelt.

Die recht drastische Veränderung der Zeitspuren lässt darauf schließen, dass MBP mit Strukturen der BMIm/Wasser Mischungen interagiert und es zu einer Konformationsänderung des Proteins kommt. Da es sich um ein gelabeltes Protein handelt, kann man die Veränderung anhand der Spin-Abstandsverteilung nachverfolgen. Unter Einbeziehung der Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung und der Kleinwinkel-Röntgenstreuung, die für den Radius der entstanden Strukturen eine Größe von ca. 1,5 nm bzw. 1,7 nm annehmen, sind die Längen der Spin-Abstandsverteilung durchaus realistisch. Da sich die Spinlabel am Anfang und in der Mitte der Aminosäuresequenz befinden, Position 85 erwiesenermaßen in einer α -helikalen Struktur liegt, würde eine Konformationsänderung des MBPs auch eine Veränderung des Abstands zur Folge haben.

Um einen Schritt weiterzugehen kann die Hintergrundkorrektur des DeerAnalysis Programms mit einbezogen werden. Sie gibt für die fraktale Dimension einen Wert zwischen 2 und 3 an, welcher üblich ist für Proteine mit einer Sekundärstruktur. Dies könnte bedeuten, dass das in HEPES ungeordnet vorliegende MBP in BMIm/Wasser Mischungen Sekundärstrukturen ausbilden kann.

3.3.5 IR-Ergebnisse

IR-Messungen wurden aus zwei Gründen durchgeführt. Erstens ist die IR-Spektroskopie eine schnelle und kostengünstige Methode zur Identifikation eines Stoffes. Zweitens sollte mit ihr der Einfluss von BMI_m/Wasser Mischungen auf MBP untersucht werden. Als erstes wurde die IR-Spektroskopie zur Identifizierung der MBP-Varianten C1WT und C1S17CH85C verwendet, indem die Spektren der jeweiligen Variante mit handelsüblichem bMBP verglichen wurde.

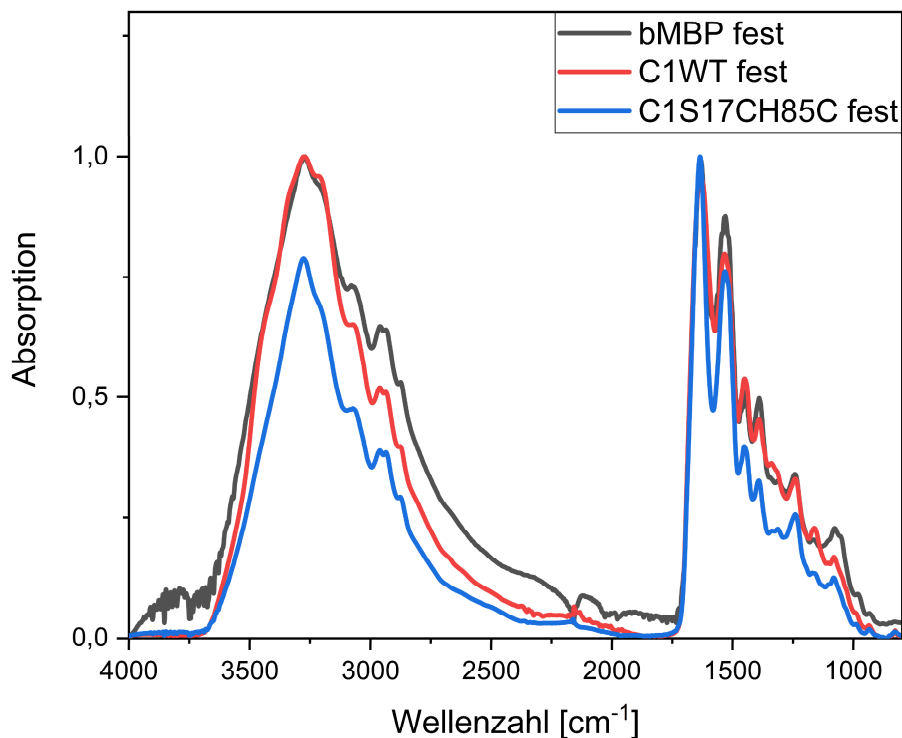


Abbildung 49 Vergleichsspektrum von festem bMBP, C1WT und C1S17CH85C

Es sind die typischen Proteinbanden zu sehen, die Amid A-Bande im Bereich von 3000-3500 cm⁻¹, Amid B bei ca. 3100 cm⁻¹, Amid 1 bei 1600-1700 cm⁻¹ und die Amid 2-Bande bei 1550 cm⁻¹ und noch die Amid 3-Bande bei 1300-1400 cm⁻¹. Allerdings ist die Interpretation im Fingerprintbereich (<1500 cm⁻¹) äußerst kompliziert, da die Banden von der Art der Seitenkette und der Wasserstoffbrückenbindung abhängig sind.^{51,81,153-156} Deshalb sind diese Banden zur Interpretation von Strukturmerkmalen nicht geeignet. Durch den Vergleich der Banden fällt auf, dass sie sich lediglich in ihrer Intensität unterscheiden. Sie befinden sich an derselben Stelle, deshalb kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den beiden untersuchten Proteinen um die Varianten des MBP handeln muss. Als nächstes wurden die BMI_m/Puffer Gemische gemessen, um herauszufinden, ob etwaige Banden von Puffer oder BMI_m die Proteinbanden überlagern könnten.

Abb. 49 zeigt das IR-Spektrum von reinem BMIm sowie 45 und 50%ige BMIm Mischungen:

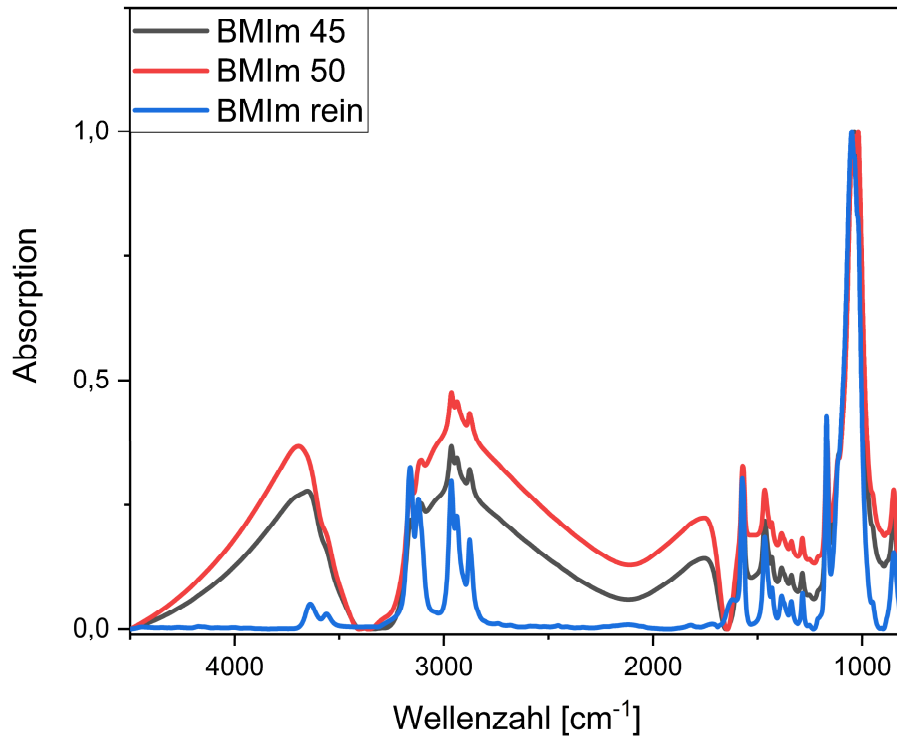


Abbildung 50 IR-Spektrum von reinem BMIm und den Mischungen BMIm 45 und BMIm 50

Es sind deutliche Banden bei $3000\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ und $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen, hierbei handelt es sich vermutlich um CH_3 und CH_2 Valenzschwingungen.⁸¹ Welche Banden bei der Auswertung der Spektren mit Protein stören könnten sind die beiden mittleren Banden bei 1600 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} welche typisch für Benzole, Pyridine oder Imidazole sind. Die Banden bei 3500 cm^{-1} , und 1750 cm^{-1} kommen durch eine Überkompensation von OH-Schwingungen beim Abziehen des Hintergrundes zustande.

Da die IR-Spektroskopie gewählt wurde, um eventuelle sekundäre Strukturmerkmale zu erkennen, werden Vergleiche mit festem MBP, MBP in Puffer und in den BMIm Mischungen 45 und 50 angestellt. Die hierbei interessanten Banden sind die Amid I und Amid II Banden, um präziser zu sein, die Banden der α -Helix bei $1648\text{-}1657\text{ cm}^{-1}$, β -Faltblatt bei $1623\text{-}1641\text{ cm}^{-1}$ sowie $1674\text{-}1695\text{ cm}^{-1}$, β -Turns bei $1662\text{-}1686\text{ cm}^{-1}$ und Random Coils bei $1642\text{-}1657\text{ cm}^{-1}$.^{81,154,157-159}

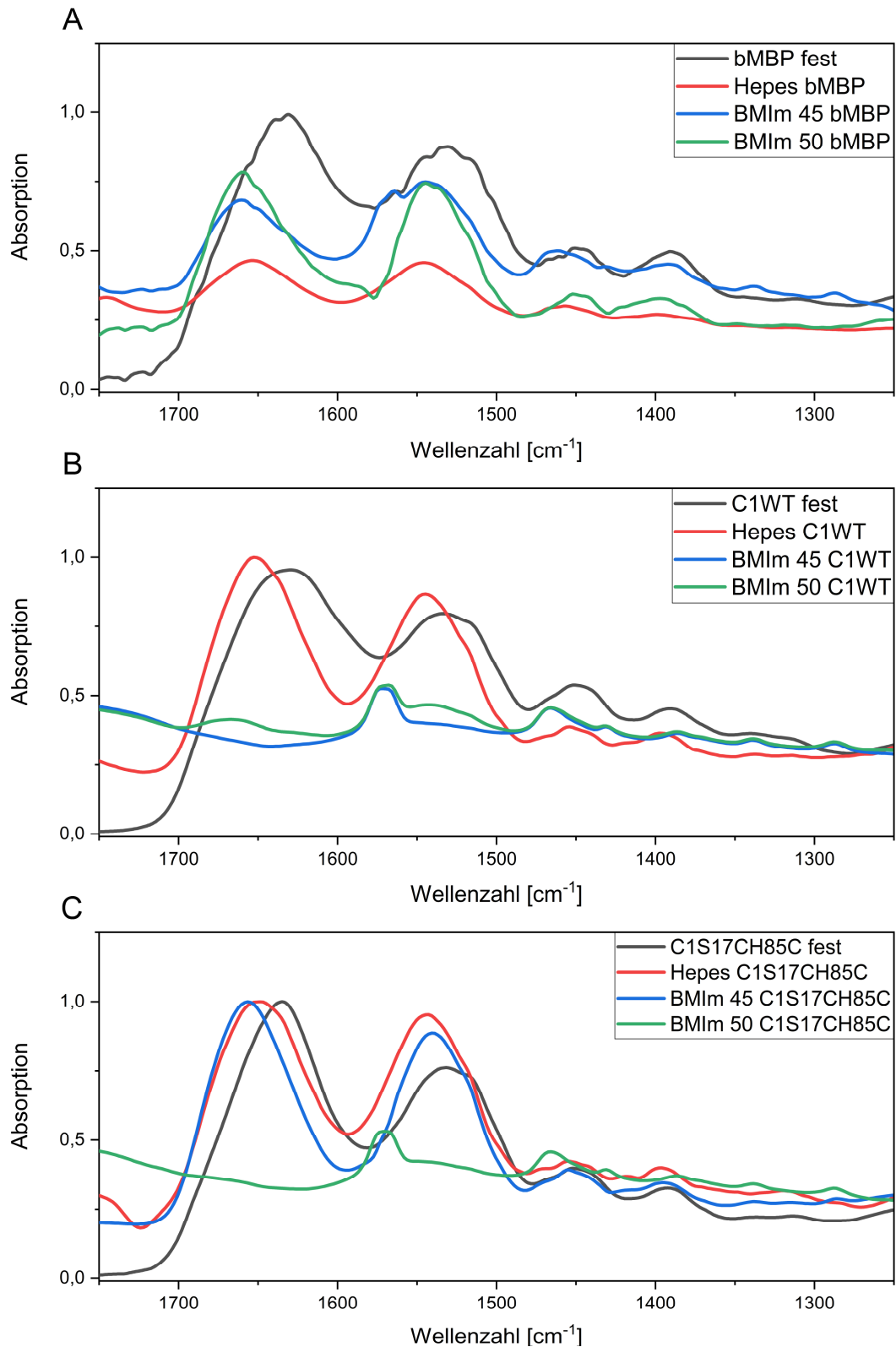


Abbildung 51 IR-Spektren von unterschiedlichen MBP Varianten A: bMBP fest in HEPES BMIm 45 und 50 B: C1WT fest in HEPES BMIm 45 und 50 C: C1S17CH85C fest in HEPES BMIm 45 und 50

Beginnt man die Interpretation der Banden in Abb. 50 A fällt als erstes auf, dass sich die Amid I und Amid II Banden zu höheren Wellenzahlen verschieben, dies ist auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit dem Lösemittel zurückzuführen. In den Spektren der

Proben die BMIm enthalten befinden sich die Maxima bei ca. 1650 cm^{-1} , dies liegt im Bereich von α -Helices, aber auch von Random Coils, deswegen kann keine finale Aussage getroffen werden, lediglich ein Trend ist zu erkennen. Auch in Abb. B und C sieht man ein ähnliches Spektrum, nur das hier die Proben, die BMIm enthalten, Banden bei 1570 cm^{-1} und 1470 cm^{-1} zeigen die, wie zuvor erörtert, vermutlich vom Imidazol stammen und hier zu einer Überlagerung der Amid-Banden führen, weshalb eine Interpretation nicht möglich ist.

Durch die IR-Spektroskopie ließen sich die Subvarianten C1WT und C1S17CH85C eindeutig identifizieren. Leider konnten Merkmale von Sekundärstrukturelementen hier nicht eindeutig identifiziert werden, da in zwei von drei Spektren eine Überlagerung der spezifischen Banden durch BMIm beobachtet werden konnte. Allerdings ist ein Trend zur Verschiebung der Amid-Bande in Richtung α -helikaler Strukturen zu erkennen.

3.3.6 SAXS-Ergebnisse

Kleinwinkelröntgenstreuung wurde durchgeführt, um die Form der Nanostrukturen zu bestimmen, die von den wässrigen IL-Mischungen gebildet wird und welchen Einfluss sie auf MBP hat. Die Auswertung der gemessenen Röntgenstreuung ist stark abhängig von den angewendeten mathematischen Modellen. Deshalb müssen die Modelle zur Auswertung sorgfältig gewählt werden. Am Anfang werden einfache Modelle wie Sphären, Zylinder oder Ellipsen eingesetzt, um eine Idee von Form und Beschaffenheit der Struktur zu erhalten. Danach müssen komplexere Modelle gewählt werden, um die Art von Ordnung zu bestimmen, die das System am besten beschreibt. Für die Auswertung wurde zuerst ein Modell für sphärische Strukturen ausprobiert, da die Ergebnisse aus der dynamischen Lichtstreuung auf sphärische, beziehungsweise ellipsoide Strukturen hinwiesen. Im Nachhinein stellten sich diese Modelle allerdings als untauglich heraus, da sie für die Komplexität der Daten nicht geeignet waren. Als finales Modell wurde Fraktal mit polydispersen Zylindern gewählt, es stellt die Streuung eines fraktalen Massenobjekts unter Verwendung des Modells von Teixeira mit einem starren Zylinder (polydisperser Radius) als Baustein dar.^{160,161} Der Radius im Fraktal $S(q)$ ist R_g des Zylinders. Dieses Konstrukt ist gültig, so lange die fraktale Längenskala (Korrelationslänge) und R_g unterschiedlich sind, also das Fraktal keine Details der Zylinderstruktur kennt. Das Modell kombiniert die Streuung des Zylindermodells mit der, der fraktalen Modelle. Der Blockradius des Fraktalmodells entspricht nun dem Trägheitsradius des Zylinders:^{160,161}

$$R_g^2 = \frac{R^2}{2} + \frac{L^2}{12} \quad (60)$$

Für die Auswertungen wurden Temperaturreihen von 25-70 °C mit und ohne Protein in BMIm 50 verwendet, da BMIm 45 keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu BMIm 50 zeigte.

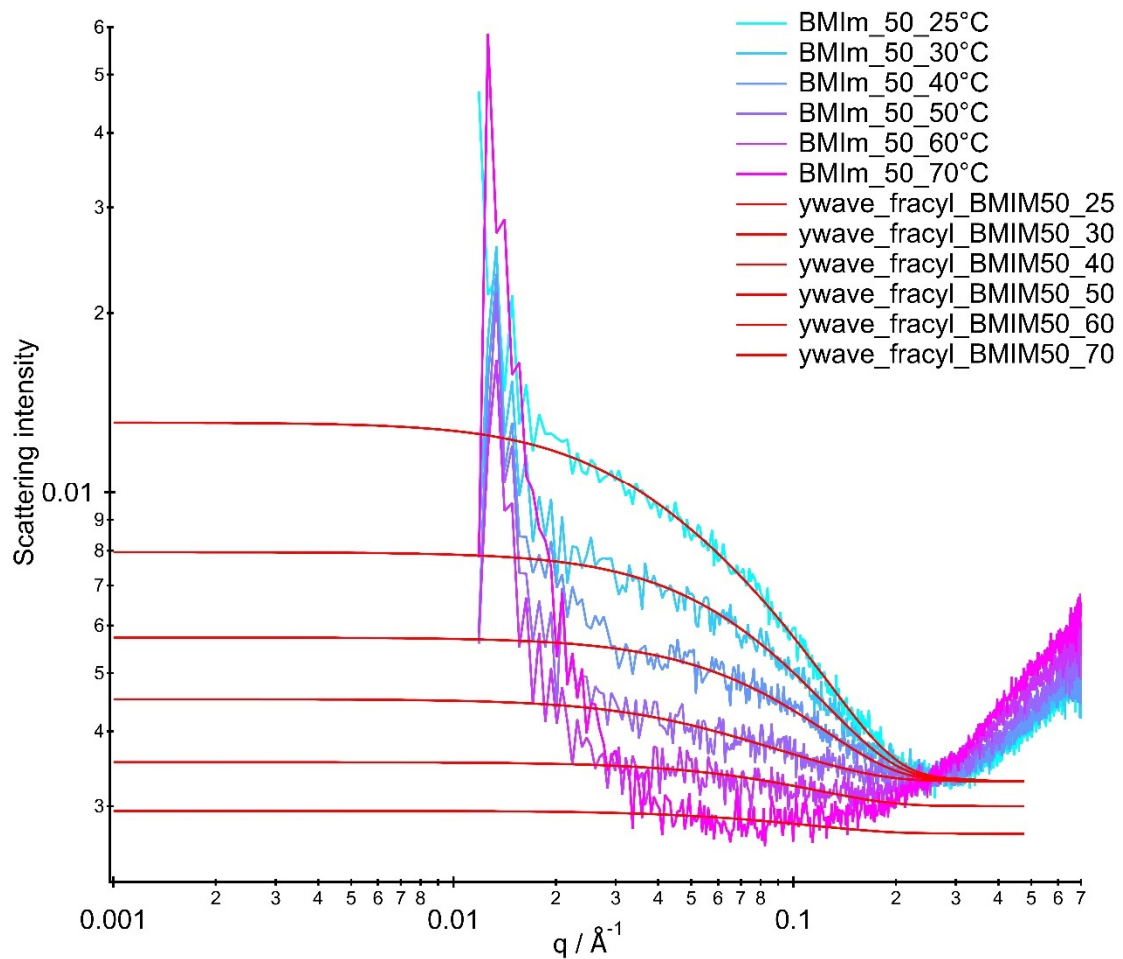


Abbildung 52 Röntgenstreuung Temperaturserie BMIm 50 & dazugehöriger Fit

In Tabelle 10 befinden sich die berechneten Werte der mathematischen Anpassung.

Tabelle 10 Fit Röntgenstreuung BMIm 50

T [°C]	VOLUMEN FRAKTION	FRAKTAL DI- MENSION	KORRELATI- ONS LÄNGE [Å]	ZYLINDER RADIUS [Å]	ZYLINDER LÄNGE [Å]
25	0,00007216	1,01025	56,8202	16,77	17,084
30	0,00005291	1,01025	29,4027	16,77	17,084
40	0,00003428	1,01025	19,1638	16,77	17,084
50	0,00001075	1,00266	49,8851	16,77	17,084
60	0,00003034	1,00217	10,6951	16,77	17,084
70	0,00002943	1,00217	6,92783	16,77	17,084

Zuerst fällt auf, dass die Streuintensität abnimmt, dadurch verringert sich in der mathematischen Anpassung vor allem die Korrelationslänge und die Fraktal Dimension. Die

Korrelationslänge gibt an, wie lang die fraktale Struktur ist und ergibt sich aus der Länge der zylindrischen Kompartimente. Die fraktale Dimension gibt Aufschluss über den Verzweigungsgrad des fraktalen Massenobjekts. Dies lässt folgende Schlüsse zu. Erstens: Die entstandene Nanostruktur aus der Mischung von BMIm und Wasser hat eine zylindrische Grundstruktur. Zweitens, durch Zuführen von Wärme verschwinden diese Strukturen vollkommen. Dies kommt vermutlich davon, dass sich durch Konvektion in der Probe lokale Inhomogenitäten vermischen und nur noch eine Phase vorliegt. Betrachtet man nun in Abb. 52 die Ergebnisse mit Protein, erkennt man folgende Unterschiede.

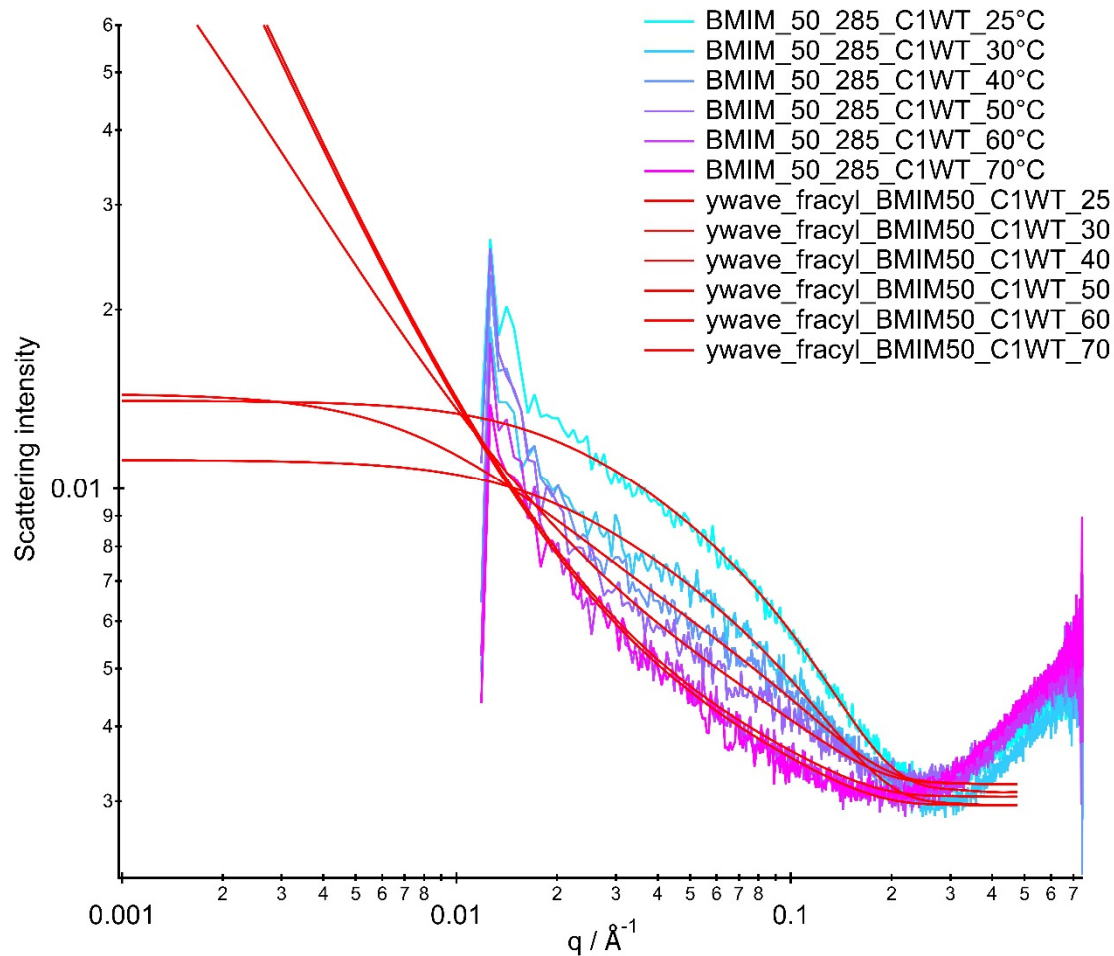


Abbildung 53 Röntgenstreuung Temperaturserie BMIm 50 mit 285,5 $\mu\text{mol/l}$ C1WT & dazugehöriger Fit

In der nachfolgenden Tabelle 11 stehen die dazugehörigen Ergebnisse:

Tabelle 11 Fit Röntgenstreuung BMIm 50 C1WT

T [°C]	VOLUMEN FRAKTION	FRAKTAL DIMENSION	KORRELATI- ONS LÄNGE [Å]	ZYLIN- DER RA- DIUS [Å]	ZYLINDER LÄNGE [Å]
25	0,00007894	1,00009	49,6143	16,77	17,084

T [°C]	VOLUMEN FRAKTION	FRAKTAL DIMENSION	KORRELATI- ONS LÄNGE [Å]	ZYLIN- DER RA- DIUS [Å]	ZYLINDER LÄNGE [Å]
30	0,00005954	1,00020	76,7687	15,72	15,862
40	0,00003766	1,00251	78,796	16,77	17,084
50	0,00002482	1.06033	2306,91	16,77	17,084
60	0,00001602	1,26824	6,166*10 ¹⁰	16,77	17,084
70	0,00001601	1,26824	6,167*10 ¹⁰	16,77	17,084

Erstens fällt auf, dass die Fraktale Dimension nicht mehr ab- sondern zunimmt, zweitens nimmt auch die Korrelationslänge des fraktalen Massenobjekts zu. Es ergibt sich folgendes Modell: Die Ionischen Flüssigkeiten bilden aufgrund ihres amphiphilen Charakters Mizellare Strukturen, dieses wurde bereits in der dynamischen Lichtstreuung beobachtet. Die Form entspricht dabei eher Zylindern mit einer Länge gleich ihrem Radius. Der Radius dieser Strukturen ist polydispenser Natur und sie sind in der Lage mit MBP zu interagieren und Proteinaggregate zu lösen. Aus den Ergebnissen der Röntgenstreuung lässt sich nun ein Modell berechnen, wie diese Interaktion aussehen könnte. Zuerst bildet die IL einen Zylinder, der dem Protein eine Oberfläche bietet, mit dem es Interagieren kann, ähnlich einer Lipid Mono- oder Doppelschicht. Nun kann das Protein nicht nur mit einem, sondern mit mehreren solcher Zylinder interagieren, was einen Anstieg der Korrelationslänge zur Folge hat. Bei 25 °C entspricht die Korrelationslänge ca. drei dieser Zylinder, durch das Erhöhen der Temperatur kommt es zu weiteren Verbrückungen, was zu einem Anstieg sowohl der Korrelationslänge als auch der fraktalen Dimension führt. Bei den Proben ohne Protein kam es zu einer Vermischung der Phasen, sodass am Ende nur noch eine vorlag. Bei den Proben mit MBP bleiben die Phasen getrennt und die Nanostrukturen werden verknüpft, ähnlich dem Auffädeln einer Perlenkette, bis eine maximale Größe erreicht ist. Anhand der mathematischen Anpassungen kann man erkennen, wie die Kurvenverläufe weiter gehen müssten, um diese Theorie zu bestätigen. Allerdings ist dieser Messbereich mit dem vorhandenen Geräteaufbau nicht zu erreichen, weshalb Synchrotron-Messungen durchgeführt werden müssten, um eine detaillierte Auflösung zu erhalten.

3.3.7 Diskussion

Um einzuordnen, was die Ergebnisse der einzelnen Methoden zu bedeuten haben, sollte das übergeordnete Ziel dieses Teilprojekts in Betracht gezogen werden. Das Ziel war

es, erstens den Einfluss von wässrigen BMIm Mischungen auf Membranproteine am Beispiel von MBP zu untersuchen und zweitens zu prüfen, ob daraus ein einfaches und kostengünstiges minimal Modell Membran System entwickelt werden kann, dass die Erforschung von MBP in wässrigen Lösungen ohne die Anwesenheit von Lipiden ermöglicht. Durch Rekapitulation der Ergebnisse der einzelnen Messungen kann ein theoretisches Modell erarbeitet werden, wie ein mögliches Modellsystem aussehen könnte.

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass ionische Flüssigkeiten in wässrigen Lösungen mizellare oder lamellare Strukturen bilden, deswegen wurde zuerst die dynamische Lichtstreuung angewendet, um eventuelle Makrostrukturen nachzuweisen und unter welchen Bedingungen sie sich bilden. Aus der Arbeit von Cerajewski *et al.*¹³⁹ geht hervor, dass das Optimum bei einer 1:1 Mischung von Wasser und BMIm zu finden ist. Diese Ergebnisse sollte durch Wiederholungsmessungen bestätigt werden. Deshalb wurden umfangreiche Messungen von 0-100 vol% in 5 vol% Schritten durchgeführt, um das optimale Mischungsverhältnis zu finden. Es stellte sich heraus, dass mehrere Mischungsverhältnisse in Frage kämen, am besten geeignet waren BMIm 45 und 50 vol%.

Nachdem die optimalen Mischungen ermittelt waren, wurde die DLS weiterverwendet, um Größe und Form der entstandenen Strukturen zu bestimmen. Dazu wurden Temperaturreihen von 20-37° C in Seitwärts- und Rückwärtsstreuung durchgeführt. Daraus ergaben sich Partikelgrößenverteilungen des hydrodynamischen Radius von 0,5-2,5 nm. Es viel auf, dass sie Strukturen mit zunehmender Temperatur kleiner wurden. Durch den Vergleich der Seitwärtsstreuung mit der Rückwärtsstreuung konnte ein Formfaktor bestimmt werden; es zeigte sich, dass die Strukturen von Ellipsoiden zu Kugeln werden. Um zu verstehen, wie BMIm und Wasser diese Strukturen ausbilden können, muss die IL auf molekularer Ebene betrachtet werden. 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat ist ein amphiphiles Molekül, das aus einem geladenen Imidazol-Ring und einer kurzen hydrophobe Butylkette besteht. BMIm ist in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar, trotzdem bildet es aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen energetisch günstigere Lösungsstrukturen, um seine unpolaren Seitenketten vor der polaren Umgebung abzusichern. Ideale Strukturen wären kugelförmige Mizellen, da sie das perfekte Verhältnis von Volumen zu Oberfläche haben. Offene Zylinder wären auch denkbar, da so die Grenzflächenspannung minimiert werden könnte.

Durch Einbeziehung der Ergebnisse der Messungen mit MBP und seinen Varianten gewinnt man zwei Erkenntnisse. Erstens bildet MBP Aggregate und Kluster, die im DLS beobachtet werden, können und zweitens, lösen sich diese Aggregate bei Zugabe von 45-50 vol% BMIm vollständig. Es ist eine Veränderung des mittleren hydrodynamischen Radius in den DLS-Messungen zu erkennen, dies spricht für eine Interaktion auf molekularer Ebene des Proteins mit den BMIm/Wasser Mischungen. In der Myelinscheide

spielt MBP eine entscheidende Rolle beim Membranstacking und sorgt dafür, dass die gesamte multilamellare Membran zusammengehalten wird. Eventuell findet in der Lösungsstruktur ein ähnlicher Prozess statt und MBP interagiert mit einer oder mehreren dieser Mizellen.

Weitere Anhaltspunkte für diese Theorie liefert die elektrophoretische Lichtstreuung, sie wurde dazu genutzt, das Zetapotential des Proteins in Puffer und in BMIm/Wasser zu bestimmen. Es wurden die Mutanten C1WT und C1S17CH85C verwendet, da es sich hierbei um reine Ladungsvarianten mit einer Oberflächenladung von +19 handelt. Dies zeigt auch die Zetapotential Messung in Puffer, dass mittlere Zetapotential für beide Mutanten beträgt ca. 20 mV. Nach der Zugabe von 45 bzw. 50 vol% BMIm beträgt das mittlere Zetapotential nur noch ca. 1 mV. Dies spricht für eine Interaktion mit den entstandenen Strukturen, da die Oberflächenladung abgeschirmt und so das Zetapotential verringert wird.

Um sicherzustellen dass die Proteinidentifikation aus Kapitel 3.2 korrekt war, wurden ATR-IR Messungen durchgeführt, zum einen als zusätzliche Identifikation der beiden Varianten C1WT und C1S17CH85C und zum anderen um herauszufinden ob eventuell Sekundär-Strukturmerkmale vorhanden sind. Die Identifikation des Proteins lief problemlos, es konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei den beiden Varianten um Mutanten des MBP handelt. Hierzu wurden Vergleichsmessungen mit handelsüblichem bMBP gemacht. Durch Auswertung der spezifischen Proteinbanden konnte eine Übereinstimmung festgestellt werden. Die Erfüllung der zweiten Aufgabe erwies sich als deutlich schwieriger. Zuerst wurden Messungen von reinem BMIm gemacht und dann jeweils mit 45 und 50 vol% in Wasser. Bereits hier fiel auf, dass es zu einer Überkompensation der Wasserbanden kommt, wenn der Hintergrund automatisch abgezogen wird. Wie schon in Kapitel 3.3.5 erläutert, hat sich die Zuordnung der Proteinbanden Amid I und Amid II als äußerst schwierig erwiesen, da es teilweise zur Überlagerung der Banden von Wasser oder BMIm kam. Außerdem ist die Zuordnung von α -Helices, β -Sheets und Random Coils nicht eindeutig möglich, da ihre Banden stark von der chemischen Umgebung abhängig sind und sich teilweise selbst überlagern.^{139,154,158,159,162}

Deshalb können die Ergebnisse nur als Trend und nicht als absolut angesehen werden. Als nächstes sollte mittels EPR die Moleküldynamik auf molekularer Ebene betrachtet werden. Hierzu wurden zuerst cw-EPR Messungen mit Spinsonden und der Variante C1WT durchgeführt. Als Spinsonden wurden TEMPO und 16-DSA verwendet, als Auswertungsparameter wurde die Rotationskorrelationszeit τ_{corr} und die Hyperfeinkonstante verwendet. Die Hyperfeinkonstante gibt Aufschluss über die Polarität der Umgebung der Spinsonde; je größer, desto hydrophiler die Umgebung. Bei beiden Spinsonden sieht man eine Verschiebung zu kleineren Werten, was im Umkehrschluss bedeutet, dass die

Umgebung der Spinsonde hydrophober wird. Eine zu erwartende Reaktion, wenn man sich nochmal den Aufbau des BMIm-Moleküls vor Augen führt. Der zweite Parameter τ_{corr} lässt Aussagen über die Rotationsdynamik zu. Für beide Spinsonden ist ein isotropes Spektrum zu sehen. Die Proben die BMIm 45 bzw. 50 vol% enthalten, zeigen für 16-DSA eine deutlich verlangsamte Gesamttotation, was vermutlich auf die Viskositätszunahme (vgl. Tabelle 6) zurückzuführen ist, da sich 16-DSA aufgrund seiner Struktur vermutlich eher in IL-reichen Regionen aufhalten wird. Bei TEMPO fällt auf, dass τ_{corr} konstant bleibt. Dies spricht dafür, dass es sich eher in den wasserreichen Regionen der Mischung aufhält. Die Messungen mit und ohne Protein zeigen keine Unterschiede, was dafür spricht, dass die Spinsonde keine Interaktion mit MBP eingeht. Auch wenn in diesen Experimenten keine Interaktion mit dem Protein beobachtet werden konnte, wurde eine wichtige Frage beantwortet, und zwar, dass bei der Mischung von Wasser und BMIm zwei Domänen entstehen: eine Wasserreiche und eine IL-reiche. Um die Interaktion dieser Domänen mit dem Protein im EPR messen zu können, wurde die Variante C1S17CH85C mit MTSSL gelabelt, dadurch wird sie Spinsonde direkt am MBP befestigt. Aus den Spektren ist zu erkennen, dass sie anisotrop sind, da die Rotation um die z-Achse eingeschränkt ist. Dies kommt wahrscheinlich davon, wie die Spinsonde an das Molekül gebunden ist. Es fällt auf, dass die Hyperfeinkonstante mit BMIm kleiner ist als die ohne, auch hier zurückzuführen auf die Struktur des BMIm-Moleküls. Viel interessanter ist die Tatsache, dass sich die Rotationskorrelationszeit trotz Zunahme der Viskosität verringert. Wie die DLS-Messungen zeigten, werden Proteinaggregate aufgelöst. Das bedeutet, durch die Auflösung der Aggregate kann die Spinsonde am Protein viel schneller rotieren, was zu einer verringerten Rotationskorrelationszeit führt. Daraus lässt sich vermuten, dass sich das MBP an die Grenzflächen der Domänen anlagert und soweit stabilisiert, dass Aggregation verhindert werden kann.

Um detailliertere Einblicke in die mikroskopische Struktur der BMIm/Wasser Mischungen zu erhalten wurden DEER-Messungen mit einem Puls-EPR durchgeführt. Dabei spielt hier vor allem die Interaktion mit der Struktur, die von BMIm/Wasser Mischungen zur Verfügung gestellt wird, eine große Rolle. Die DEER-Methode verwendet zwei getrennte Mikrowellenfrequenzen, um die dipolare Kopplung zwischen zwei Elektron-Spin-Paketten ungleicher Resonanzfrequenz zu untersuchen. Unter idealen Bedingungen sind Distanzen von 1,5-8 nm messbar. Aus der Literatur für einfach gelabelte C1-Varianten wurde $\tau_2=1,5 \mu\text{s}$ und eine Temperatur von 50 K für die Messungen verwendet, dadurch verkürzt sich die maximale Distanz auf ca. 5 nm. Betrachtet man unter diesen Gegebenheiten die Zeitspuren und die Spinabstandsverteilung der Proben in HEPES-Puffer, fällt auf, dass der Abfall der Zeitspuren sehr schwach und das Signal-Rausch-Verhältnis schlecht ist.^{117,118,152}

Die Proben zeigen eine geringe Modulationstiefe und eine geringe Spinkonzentration für das beobachtete Messfenster. Daraus lässt sich schließen, dass die Anzahl an gekoppelten Spins sehr klein ist. Vermutlich liegt eine homogene Verteilung des MBPs in Lösung vor, sodass sich die Spins niemals so nahe kommen, dass sie koppeln könnten. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass keine Sekundär-Strukturmerkmale vorhanden sind, wie bei IDPs üblich.

Durch Einbeziehung der Ergebnisse der Messungen mit BMIm fällt auf, dass hier in den Zeitspuren deutliche Abfälle der Modulationstiefe zu beobachten sind. Dies hat zur Folge, dass die Spinkonzentration in der beobachteten Distanz von 1,5-5 nm zugenommen hat. Aus der Modulationstiefe lässt sich die Anzahl der gekoppelten Spins bestimmen; in diesem Fall mindestens zwei da es sich um Doppel-Cystein-Mutanten handelt. Allerdings kann die Kopplung zu benachbarten MBP-Molekülen nicht ausgeschlossen werden, da die genaue dreidimensionale Anordnung nicht bestimmt werden kann. Im Vergleich zu den Messungen in Puffer ist die Spinabstandsverteilung wesentlich definierter und es ist eine trimodale Abstandsverteilung zu erkennen. Ähnliche Ergebnisse von DEER-Messungen sind in der Literatur bei Kattinig *et al.*¹⁵² zu finden, dort wurden unterschiedliche Einfach-Cysteinmutanten mit myelinartigen LUVs gemessen.^{117,118,152} Vergleicht man die Ergebnisse von damals mit den Messungen von heute, zeigt sich ein interessantes Bild. Durch Vergleich der Zeitspuren erhält man ähnliche Modulationstiefen wie bei den einfachen Cysteinmutanten und auch ihre Spinabstandsverteilung entspricht einer Kombination aus S17 und H85. Aus der Literatur ist bekannt, dass MBP geordnet an myelinartige LUVs bindet. Die Messungen der Proben, die 45 bzw. 50 vol% BMIm enthalten, zeigen ähnliche Ergebnisse der DEER-Messungen. Dies spricht dafür dass die Strukturen, die in wässrigen Lösungen von BMIm zur Verfügung gestellt werden, mit MBP interagieren können, ähnlich einer Membran. Vermutlich ordnet sich MBP an der Grenzfläche zwischen BMIm und dem Lösemittel an. Ausgehend von der Größe der Strukturen aus den DLS-Messungen besteht auch die Möglichkeit, dass MBP zwei oder mehr dieser mizellaren Objekte verbindet, ähnlich seiner Funktion in der Myelinscheide. Aus den Ergebnissen ist zu erkennen, dass ein Großteil des MBPs selbstorganisiert sein muss.¹⁵²

Um noch detailliertere Einblicke in die Mikrostruktur zu erhalten und eventuelle Nahordnungen besser zu verstehen und ein verlässliches Modell zu entwickeln, wurden SAXS-Experimente durchgeführt. Um den Einfluss des Proteins auf das System Wasser/BMIm zu ergründen, wurden Messungen mit und ohne Protein durchgeführt. Zuerst wurden Messungen von BMIm 45 und 50 durchgeführt; da die Messungen keinen signifikanten Unterschied zeigten, wurde für spätere Messungen nur noch BMIm 50 verwendet, um die Datensätze zu reduzieren. Um die SAXS-Messungen auszuwerten, musste ein

geeignetes mathematisches Modell gefunden werden. Im Trial-and-Error-Verfahren wurden unterschiedlichste mathematische Modelle ausprobiert. Unter Einbeziehung der bekannten Eigenschaften von MBP und der bisherigen Ergebnisse aus DLS-, cw-EPR- und DEER-Messungen wurde die Modelle mit Daten gefüttert, bis sich Fraktale Zylinder als am besten geeignetes Modell herausgestellt haben. Für das Modell der Fraktalen Zylinder werden mehrere Parameter benötigt z.B. Höhe und Radius des Zylinders, Polydispersität, Kontrast zwischen Lösemittel und Zylinder und Hintergrund. Für Radius und Höhe der Zylinder wurden die mittleren Partikelradien aus der dynamischen Lichtstreuung als Startwert eingesetzt. Die Polydispersität des Radius wurde sehr klein angesetzt. Der Hintergrund wurde aus den SAXS-Messungen entnommen, genauso wie der Kontrast zwischen Lösemittel und den Zylindern. Mittels der eingesetzten Parameter wurden die fraktale Dimension und die Korrelationslänge bestimmt.

Die fraktale Dimension gibt den Verzweigungsgrad der Strukturen an und die Korrelationslänge beschreibt, wie lang die Gesamtstruktur ist, mithilfe der Höhe und des Radius des Objekts kann so auch bestimmt werden aus wie vielen Einzelobjekten die Gesamtstruktur besteht. Aus den vorherigen Ergebnissen geht hervor, dass die Strukturen von BMIm in Wasser auf lokale Konzentrationsunterschiede zurückzuführen sind. Um hydrophobe Bestandteile des BMIm Moleküls von der polaren Umgebung abzuschirmen, bilden sich zylindrische Strukturen. Um Korrelationslänge und Fraktale Dimension zu bestimmen, wurden die gemessenen Werte in die Funktion eingesetzt und konstant gehalten, sodass die Funktion nur noch von diesen beiden Parametern abhängig war. Durch mathematische Anpassungen wurden die beiden Parameter berechnet.

Wie aus der Temperaturreihe ohne Protein zu erkennen ist, nehmen Korrelationslänge und fraktale Dimension mit steigender Temperatur ab. Die Erklärung hierfür ist einfach: Durch zuführen thermischer Energie kommt es zur Mischung der Phasen, bis eine homogene Verteilung von BMIm in Wasser vorliegt. Bei den Proben die MBP enthalten, ist ein anderes Verhalten beobachtet worden. Die Korrelationslänge und die fraktale Dimension nehmen mit steigender Temperatur zu, dies spricht dafür, dass durch zuführen von Energie ein selbstorganisierter Prozess stattfindet. Aus den vorliegenden Daten und dem gewählten Modell kann man sich den selbstorganisierten Prozess wie das Auffädeln einer Perlenkette vorstellen. Bei 25° C liegt eine Korrelationslänge von 49,6 Å vor, bei einer Zylinderhöhe von 17,1 Å entspricht das ca. drei Zylindern, die miteinander korrelieren, bei einer fraktalen Dimension von ca. 1 gibt es keinerlei Verzweigungen der Kette. Zu den Eigenschaften von MBP zählt, dass es durch Ausbildung von Sekundärstrukturelementen, die Membranen der Myelinscheide stapeln und sie so stabilisieren kann.⁶⁶ Vermutlich interagiert MBP auf eine ähnliche Art und Weise mit den Strukturen, die die ionische Flüssigkeit bereitstellt. Ein MBP-Molekül verbindet dabei wahrscheinlich

jeweils zwei, eventuell auch drei dieser Zylinder, was infolge von Energiezufuhr zu einer Verlängerung dieser Kette führt und bei höheren Temperaturen zu einer höheren fraktalen Dimension, dementsprechend zu Verzweigungen innerhalb der Kette.

Um die Ergebnisse dieses Teilprojekts erneut zusammen zu fassen: Aus der dynamischen Lichtstreuung wurde die optimale Mischung ermittelt und die Form und Größe, der vom BMIm zur Verfügung gestellten Strukturen bestimmt. Durch die cw- und Puls-EPR wurden die Interaktionen von MBP mit der Struktur auf molekularer Ebene untersucht, dabei wurde herausgefunden, dass sich MBP in BMIm ähnlich verhält wie in myelinartigen LUVs. Die IR-Spektroskopie ergab Hinweise auf vorhandene Sekundärstrukturen die allerdings nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Durch die Kleinwinkel-Röntgenstreuung konnten die mikroskopische Struktur und ihre makroskopische Ordnung bestimmt werden. Daraus konnte ein mögliches Minimalmodell für Mischungen aus Wasser und BMIm ermittelt werden. In Abb. 54 ist dargestellt, wie dieses Modell aussehen könnte.

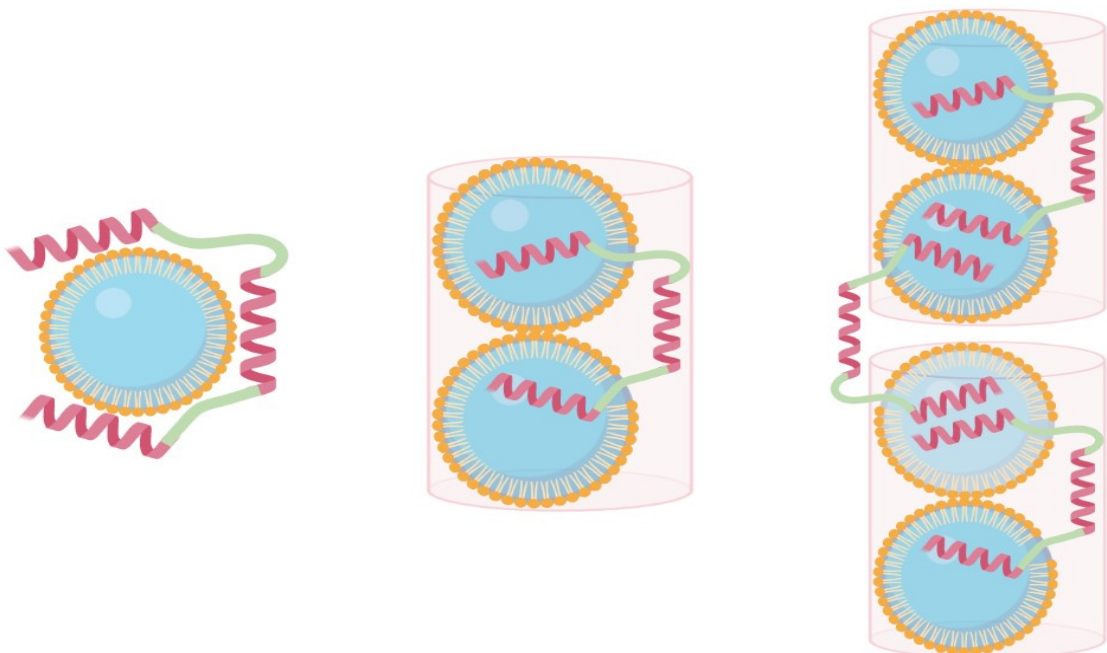


Abbildung 54 Schematische Darstellung eines Membranmodells aus IL/Wasser Mischungen inklusive der Interaktion mit einem Membranprotein am Beispiel von MBP erstellt mit Biorender.com

4 Material und Methoden

4.1 Material

Tabelle 12 Chemikalienliste

NR.	BEZEICHNUNG	HERSTELLER	CAS-NUMMER
1	Acrylamid	Roth	79-06-1
2	Ampicillin	Applichem	69-52-3
3	Basisches Myelin Protein	Sigma Aldrich	
4	β -Mercapthoethanol	Roth	60-24-2
5	1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat	Sigma Aldrich	174501-65-6
6	Cholin-dihydrogenphosphat	Roth	83846-92-8
7	Glukose	Roth	50-99-7
8	Glycin	Applichem	56-40-6
9	Harnstoff	Roth	57-13-6
10	Hefeextrakt	Applichem	8013-01-2
11	HEPES	Roth	7365-45-9
12	Imidazol	Merck	288-32-4
13	IPTG	Applichem	367-93-1
14	Kaliumchlorid	Roth	7447-40-7
15	Magnesiumchlorid	Roth	7786-30-3
16	Magnesiumsulfat	Roth	22189-08-8
17	Natriumchlorid	Roth	7647-14-5
18	Natriumdihydrogenphosphat	Merck	13472-35-0
19	Natriumhydroxid	Roth	1310-73-2
20	TEMED	Roth	110-18-9
21	Tris ultrapur	Applichem	77-86-1
22	Trypton	Applichem	91079-40-2
23	Tween 20	Roth	9005-64-5

4.2 Probenvorbereitung

Dieser Abschnitt befasst sich mit der Probenvorbereitung, Einwaagen und Pipettierschemen der durchgeführten Experimente.

4.2.1 HEPES Puffer

Da es sich bei HEPES-Puffer um einen eher instabilen Puffer handelt, wurde er vor jeder Messreihe frisch angesetzt. Die Konzentration betrug $c(\text{HEPES}) = 0,02 \text{ mol/l}$ und $c(\text{NaCl}) = 0,01 \text{ mol/l}$, hierfür wurden $m(\text{HEPES}) = 1,1915 \text{ g}$ und $m(\text{NaCl}) = 0,1461 \text{ g}$ eingewogen und in einem 250 ml Maßkolben aufgefüllt. Der pH-Wert von 7,40 wurde mittels Natronlauge $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ eingestellt.

4.2.2 Phosphat Puffer PBS

Für den PBS-Puffer wurden $m(\text{NaCl}) = 2,0 \text{ g}$, $m(\text{KCl}) = 0,05 \text{ g}$, $m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,355 \text{ g}$ und $m(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,0675 \text{ g}$ eingewogen und in einem 250 ml Maßkolben gelöst. Der pH-Wert wurde mit Natronlauge $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ auf 7,40 eingestellt.

4.2.3 DLS- und ELS-Proben

Für die ersten DLS- Messungen zur Findung der idealen Mischung wurden Mischungen aus HEPES und BMIm in 5 vol% Schritten von 0-100% verwendet. Es wurden jeweils 1 ml Lösung angesetzt, da daraus nicht nur DLS, sondern auch Viskosität und Brechungsindex bestimmt wurden.

Tabelle 13 BMIm/HEPES Mischungen

PROBENNAME	V BMIM [μL]	V PUFFER [μL]
HEPES	0	1000
BMIM 5	50	950
BMIM 10	100	900
BMIM 15	150	850
BMIM 20	200	800
BMIM 25	250	750
BMIM 30	300	700
BMIM 35	350	650
BMIM 40	400	600
BMIM 45	450	550
BMIM 50	500	500
BMIM 55	550	450
BMIM 60	600	400
BMIM 65	650	350

BMIM 70	700	300
BMIM 75	750	250
BMIM 80	800	200
BMIM 85	850	150
BMIM 90	900	100
BMIM 95	950	50
BMIM 100	1000	0

Da es sich bei Cholin-dihydrogenphosphat (CDHP) um einen Feststoff handelt, wurde erst eine Stammlösung mit einem Massenanteil von $w = 50\%$ hergestellt und nach folgendem Pipettierschema verdünnt.

Tabelle 14 Pipettierschema DLS CDHP/HEPES Mischungen

PROBENNAME	V CDHP [μL]	V PUFFER [μL]
HEPES	0	1000
CDHP 5	100	900
CDHP 10	200	800
CDHP 15	300	700
CDHP 20	400	600
CDHP 25	500	500
CDHP 50	1000	0

Für die DLS-Messungen mit Protein wurde eine Proteinstammlösung mit einer Massenkonzentration von $\beta = 10\text{ mg/ml}$, dies entspricht einer Konzentration von $c = 571\text{ }\mu\text{mol/l}$, angesetzt. Für die kleineren Konzentrationen von $2 - 10\text{ }\mu\text{M}$ wurde ein zusätzlicher Verdünnungsschritt auf $100\text{ }\mu\text{mol/l}$ vorgenommen. Die Proben für alle Varianten bMBP, C1 WT und C1 S17CH85 wurden nach folgendem Schema pipettiert. Um Material zu sparen, wurden jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$ Probenlösung hergestellt.

Tabelle 15 Pipettierschema DLS-Messungen aus $100\text{ }\mu\text{M}$ Proteinstammlösung für BMIm

PROBENNAME	KONZ. MBP [μM]	V MBP [μL]	V BMIM [μL]	V HEPES [μL]
HEPES	2	2	0	98
HEPES	5	5	0	95
HEPES	10	10	0	90
BMIM 45%	2	2	45	53
BMIM 45%	5	5	45	50
BMIM 45%	10	10	45	45
BMIM 50%	2	2	50	48

PROBENNAME	KONZ. MBP [μM]	V MBP [μL]	V BMIM [μL]	V HEPES [μL]
BMIM 50%	5	5	50	45
BMIM 50%	10	10	50	40

Tabelle 16 Pipettierschema DLS/ELS-Messungen 571 μM Stammlösung für BMIM

PROBEN- NAME	KONZENTRATION [μM]	V STAMMLÖSUNG [μL]	V BMIM [μL]	V PUFFER [μL]
HEPES	100	17,5	0	82,5
HEPES	150	26,3	0	73,7
HEPES	200	35	0	65
HEPES	285,5	50	0	50
BMIM 45%	100	17,5	45	37,5
BMIM 45%	150	26,3	45	23,7
BMIM 45%	200	35	45	20
BMIM 45%	285,5	50	45	5
BMIM 50%	100	17,5	50	32,5
BMIM 50%	150	26,3	50	23,7
BMIM 50%	200	35	50	15
BMIM 50%	285,5	50	50	0

Tabelle 17 Pipettierschema DLS/ELS-Messungen aus 100 μM Proteinammlösung für CDHP

PROBENNAME	KONZ. MBP [μM]	V MBP[μL]	V CDHP [μL]	V PUFFER [μL]
HEPES	2	2	0	98
HEPES	5	5	0	95
HEPES	10	10	0	90
CDHP 5%	2	2	10	88
CDHP 5%	5	5	10	85
CDHP 5%	10	10	10	80
CDHP 10%	2	2	20	78
CDHP 10%	5	5	20	75
CDHP 10%	10	10	20	70
CDHP 15%	2	2	30	68
CDHP 15%	5	5	30	65
CDHP 15%	10	10	30	60
CDHP 20%	2	2	40	58
CDHP 20%	5	5	40	55
CDHP 20%	10	10	40	50

PROBENNAME	KONZ. MBP [μ M]	V MBP [μ L]	V CDHP [μ L]	V PUFFER [μ L]
CDHP 25%	2	2	50	48
CDHP 25%	5	5	50	45
CDHP 25%	10	10	50	40
CDHP 50%	2	2	98	0
CDHP 50%	5	5	95	0
CDHP 50%	10	10	90	0

4.2.4 EPR-Proben

Um EPR messen zu können, braucht es ein freies Elektron, deshalb gibt es zwei Möglichkeiten der Probenvorbereitung. Beim Spinprobing wird ein stabiles Nitroxid Radikal, eine sogenannte Spinsonde, der Probelösung zugesetzt und die Interaktion von Sonde und Probe gemessen. Bei der zweiten Möglichkeit, das sogenannte Spinlabeln, wird das Protein selbst mit einem stabilen Nitroxid-Radikal markiert. Bei dieser Technik kann die Interaktion des Proteins mit seiner Umgebung beobachtet werden.

4.2.4.1 Spinprobing

Für das Spinprobing wurden zwei Stammlösungen aus unterschiedlichen Spinsonden erstens 16-DSA $c = 1$ mmol/l und zweitens TEMPO $c = 1$ mmol/l, zusätzlich wurde eine MBP-Stammlösung $c = 10$ mg/ml hergestellt und mit IL wie in nachfolgendem Pipettierschema zusammengegeben.

Tabelle 18 Pipettierschema EPR-Proben mi 16-DSA

PROBE	C MBP [μ M]	V BMIM [μ L]	V HEPES [μ L]	V MBP [μ L]	V 16DSA [μ L]
HEPES	0	0	90	0	10
HEPES	100	0	72,5	17,5	10
BMIM 45	0	45	45	0	10
BMIM 45	100	45	27,5	17,5	10
BMIM 50	0	50	40	0	10
BMIM 50	100	50	22,5	17,5	10

Tabelle 19 Pipettierschema EPR-Proben mit TEMPO

PROBE	C MBP [μM]	V BMIM [μL]	V HEPES [μL]	V MBP [μL]	V 16DSA [μL]
HEPES	0	0	90	0	10
HEPES	100	0	72,5	17,5	10
BMIM 45	0	45	45	0	10
BMIM 45	100	45	27,5	17,5	10
BMIM 50	0	50	40	0	10
BMIM 50	100	50	22,5	17,5	10

4.2.4.2 Spinlabeln

Beim Spinlabeln von MBP C1 S17CH85C wurde eine Proteinstammlösung mit einer Konzentration von $c = 571 \mu\text{mol/l}$ angesetzt und mit einer MTSSL-Stammlösung $c = 5 \text{ mmol/l}$ für 24 h in einem Probenschüttler inkubiert.^{163,164}

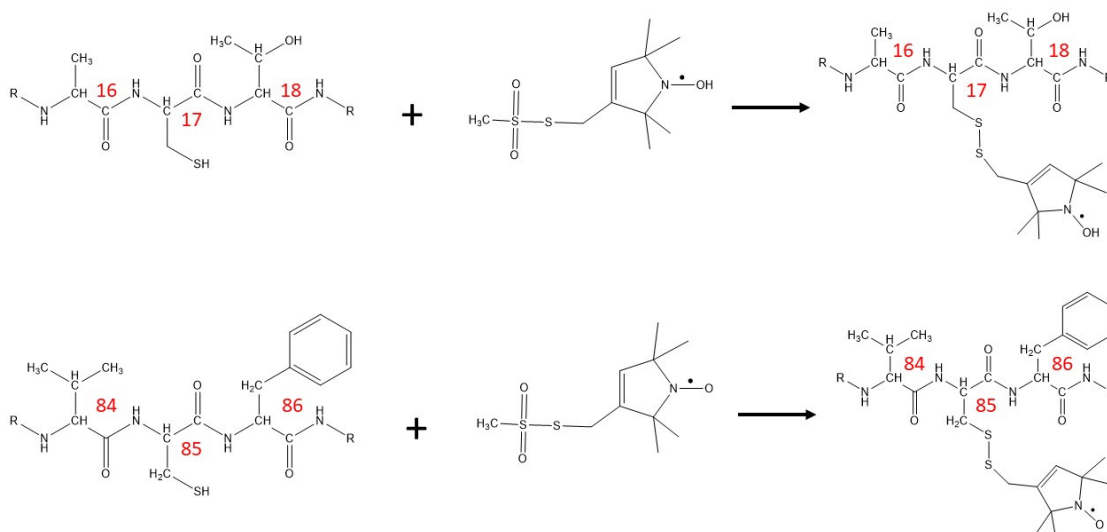


Abbildung 55 Möglicher Mechanismus einer Label-Reaktion von MTSSL mit den Cysteinresten an Aminosäure Position 17 und 85

Das überschüssige Label wurde über eine Äkta Pure (Äkta, GE Healthcare) mit einer Entsalzersäule abgetrennt; die Protein Konzentration wird mittels NanoDrop (Implen) bestimmt. Es ergab sich eine MBP-Konzentration von $c = 210 \mu\text{mol/l}$, das entspricht einer Label Effizienz von ca. 37 %. Die cw EPR und Pulse EPR Proben wurden nachfolgendem Schema pipettiert.

Tabelle 20 Pipetierschema EPR-Spinlabeled

PROBENNAME	KONZ. MBP [μM]	V MBP [μL]	V BMIM [μL]	V HEPES [μL]
HEPES	105	50	0	50
BMIM 45%	105	50	45	5
BMIM 50%	105	50	50	0

4.2.5 IR-Proben

Da die Bestimmungsgrenze des Bio-ATR-IRs bei ca. 1 mg/ml liegt, wurde auch hier eine Stammlösung von 10 mg/ml MBP hergestellt und nachfolgendem Schema pipettiert.

Tabelle 21 Pipettierschema IR Proben BMIm/HEPES Mischungen

PROBENNAME	KONZ. MBP [μM]	V MBP [μL]	V BMIM [μL]	V HEPES [μL]
HEPES	100	17,5	0	82,5
HEPES	150	26,3	0	73,7
HEPES	200	35	0	65
HEPES	285,5	50	0	50
BMIM 45%	100	17,5	45	37,5
BMIM 45%	150	26,3	45	23,7
BMIM 45%	200	35	45	20
BMIM 45%	285,5	50	45	5
BMIM 50%	100	17,5	50	32,5
BMIM 50%	150	26,3	50	23,7
BMIM 50%	200	35	50	15
BMIM 50%	285,5	50	50	0

4.2.6 SAXS-Proben

Für die SAXS-Messungen wurden Proben mit bMBP, rmMBP C1 WT und rmMBP C1 S17CH85C jeweils aus 10 mg/ml Stammlösung nach folgendem Pipettierschema hergestellt.

PROBENNAME	KONZ. MBP [μM]	V MBP [μL]	V BMIM [μL]	V PUFFER [μL]
HEPES	0	0	0	100
BMIM 25%	0	0	25	75
BMIM 45%	0	0	45	55
BMIM 50%	0	0	50	50
BMIM 75%	0	0	75	25

PROBENNAME	KONZ. MBP [μM]	V MBP [μL]	V BMIM [μL]	V PUFFER [μL]
HEPES	285,5	50	0	50
BMIM 45%	285,5	50	45	5
BMIM 50%	285,5	50	50	0

4.3 DLS-Messungen

Dynamische Lichtstreuungsmessungen wurden mit dem Litesizer 500 (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) durchgeführt. Jeweils 45 μl der Probenlösung wurden in eine Low Volume Quarzküvette (Hellma Analytics, Müllheim, Deutschland) pipettiert. Für alle Proben wurden Temperaturreihen von 20, 25, 30, 35 und 37 °C in einem Detektionswinkel von 90 ° (Seitwärtsstreuung) und 175 ° (Rückwärtsstreuung) gemessen. Die Einstellungen in der Messsoftware Kalliope waren wie folgt: 6 Durchläufe á 30 s mit einer Equilibrierzeit von 1 min zwischen den Temperaturen. Die Messfokussierung und Filtereinstellungen wurden auf automatisch gestellt. Für die Datenanalyse wurden ein enges Analysenmodell und ein Cumulant Modell verwendet.⁸⁶

Datenanalyse: Allgemein liegt der Dynamischen Lichtstreuung die Stokes-Einstein-Gleichung zugrunde.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (61)$$

Mit der Boltzmann-Konstante k_B , der Messtemperatur T und der Lösemittelviskosität η bekannt fehlt nur der Diffusionskoeffizient D , um den Hydrodynamischenradius r zu bestimmen. Unter der Annahme, das sich streuende Partikel in Lösung wie harte Kugeln verhalten und die Rayleigh-Debye-Theorie gültig ist, wird die Intensitätskorrelationsfunktion mittels Cumulant-Methode analysiert.⁸⁶ Hierbei wird ein Polynom dritten Grades an den Logarithmus der Intensitätskorrelationsfunktion angepasst und man erhält die Abklingrate Γ :

$$\Gamma = Dq^2 \quad (62)$$

Mit dem Streuvektor $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$ und unter Berücksichtigung von Lösungsmittelbrechungsindex n und Laserwellenlänge λ , verwendet die Kalliope- Software (Anton Paar GmbH, Graz Österreich) eine Anpassungsroutine für „nicht negative kleinste Quadrate“ mit Tikhonov-Regularisierung, mit der Option „allgemein“ und „eng“. Letzteres wurde ausgewählt wegen der engen Partikelgrößenverteilung bei den Proben.

Da das Cumulant-Modell nur monomodale Verteilungen analysieren kann, wurden die Intensitätskorrelationsfunktionen zusätzlich mit einem nichtlinearen Modell der ALV-Software ausgewertet.⁸⁶ Die Grundprinzipien des Modells sind dieselben für den

Diffusionskoeffizienten D , es wird jedoch das flexiblere CONTIN-Modell verwendet, um die Korrelationsfunktionen anzupassen. Dies verhindert außerdem, dass größere Partikel relativ höher gewichtet werden als kleine Partikel. Folgende Gleichung beschreibt die nichtlineare ALV-Anpassung für die Intensitätszeitkorrelationsfunktion $g_2(\tau)$ mit der Verteilungsfunktion der Abklingrate $G(\Gamma)$.

$$g_2(\tau) - 1 = \left(\int_{\Gamma_{min}}^{\Gamma_{max}} e^{-\Gamma\tau} G(\Gamma) d\Gamma \right)^2 \quad (63)$$

Die daraus resultierende massengewichtete Partikelgrößenverteilung wird durch Einstellen der Amplituden der Abklingrate erhalten, um nicht physikalische Beiträge bei kleinen Partikelradien zu entfernen.^{87,88}

4.4 ELS-Messungen

Elektrophoretische Lichtstreuungsmessungen wurden mit dem Litesizer 500 (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte wie in Kapitel 4.2.3 angegeben. Ca. 50 μ l der Probe wurden in die Univette-Low-Volume gefüllt und in das Gerät eingesetzt. Die Zeta-Potentiale wurden mittels LASER-Doppler-Velocimetrie in einem elektrophoretischen Lichtstreaufbau durch Messung der elektrophoretischen Mobilität bestimmt. Es wurden sowohl Messungen bei konstanter Temperatur von 25° C, als auch Temperaturreihen von 20°-37° C durchgeführt. Es wurde eine maximale Spannung von 10 V eingestellt, die Spannungsregelung erfolgte automatisch vom Gerät, die Henry-Funktion wurde über die Kalliope Software aus den hydrodynamischen Radien der DLS-Messungen berechnet. Die Datenanalyse erfolgte mit der kontinuierlich überwachten Phasenanalyse-Lichtstreutechnologie (cmPALS) im Softwarepaket Kalliope.⁹²

Datenanalyse: Nach der Henry-Gleichung steht das Zeta-Potential ζ in Verbindung mit der elektrophoretischen Mobilität U_E :

$$U_E = \frac{2 * \epsilon * \zeta * F(\kappa * \alpha)}{3 * \eta} \quad (6)$$

Mit ϵ als Permittivität, η die Viskosität und $F(\kappa * \alpha)$ die Henry Funktion κ die Debye-Länge und α als Teilchenradius. Hierfür wurde der hydrodynamische Radius aus den DLS-Messungen eingesetzt.^{91,93} Zusätzlich ist das Zeta-Potential von Temperatur und Ionenstärke der Probe abhängig. Folgende Gleichung beschreibt die Ionenstärke in Abhängigkeit der Konzentration c_i und der Ladung z_i der in der Probe enthaltenen ionischen Komponenten.

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2 \quad (65)$$

Die cmPALS-Methode hat den Vorteil, dass durch das hinzufügen eines Modulator Monitors die Kompensation jeglicher Nichtlinearität oder Verschlechterung der Leistung des Modulators nicht das Ergebnis beeinflussen. Zusätzlich verkürzt sich die Messzeit und es wird eine geringere elektrische Feldstärke benötigt, was ein Vorteil gegenüber herkömmlicher PALS-Methoden ist.^{92,93}

4.5 EPR-Messungen

4.5.1 cw EPR-Messungen

Die cw EPR-Messungen wurden auf dem X-Band Miniscope Benchtop Spektrometer MS400 (Magnetech GmbH, Berlin, Deutschland) mit einem Frequenzzähler (RACAL DANA, Modell 2101) und einer Temperatureinheit H03 (Magnetech GmbH, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden wie in Kapitel 4.2.4 hergestellt und ca. 20 µl in Quarzkapillaren (BLAUBRAND intraMARK) gefüllt und mit Critoseal verschlossen und in das MS400 gestellt. Für die Proben wurde eine Temperaturreihe von 20°-37° C mit 10 Durchläufen á 60 s, einer Modulationsamplitude von 0.05 mT, einer Scanbreite von 6 mT und einer Mikrowellendämpfung von 20 dB durchgeführt.

Datenanalyse: Die Datenanalyse erfolgte im Programm Matlab (R2017a) mit dem Software Paket EasySpin (Version 5.2.35) über selbstgeschriebene Skripte.¹⁵¹ Die Spektralsimulationen basieren auf der von Schneider und Freed entwickelten Zeitlupentheorie. Die Ausgangsparameter für den g-Tensor und Hyperfeinkopplungs-Tensor A wurden aus Literaturdaten entnommen.¹¹²

Der Parametersatz wurde sowohl für wässrige Lösungen als auch für Proben die IL enthielten in das Skript eingesetzt, zusätzlich musste noch der Euler-Winkel impliziert werden, für die Simulation wurde der Standardwinkelsatz für α , β und γ von [0 50 0] verwendet. Für die Simulationen wurden hauptsächlich die Werte des Hyperfeinkopplungs-Tensor A und des Rotationsdiffusionstensors D angepasst.¹⁶⁵ Der isotrope Wert a_{iso} wurde aus den simulierten Tensorwerten nach folgender Gleichung berechnet:

$$a_{iso} = \frac{(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})}{3} \quad (66)$$

Durch ein Modell der Brown'schen Diffusion, basierend auf dem Rotationsdiffusionstensor D, wurde die Rotationskorrelationszeit τ_{corr} nach folgender Gleichung berechnet:^{110,165}

$$\tau_{corr} = \frac{1}{6^3 \sqrt{D_{xx} D_{yy} D_{zz}}} \quad (67)$$

Die mittlere scheinbare Hyperfeinkopplungskonstante $a_{iso,app}$ wurde durch das Auslesen der Nulldurchgänge nach folgender Gleichung berechnet:^{110,111}

$$a_{iso,app} = \frac{(B_{highfield} - B_{lowfield})}{2} \quad (68)$$

Die Simulationsskripte erlauben Simulationen mit bis zu drei Komponenten. Die Gemessenen Spektren zeigten keine Anzeichen für zusätzliche Komponenten, deshalb konnten sie als Einkomponentenspektrum simuliert werden.¹¹⁰

4.5.2 Pulse EPR-Messungen

Alle 4-Puls-Deer-Experimente wurden auf einem Elexys E580-Spektrometer (BRUKER) ausgerüstet, mit einem ER4118X-MS3 Flexline Splitring-Resonator (BRUKER) und einem Kryostaten ARS AF204 (kundenspezifisch) durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte, wie in Kapitel 4.2.4.2 beschrieben, 100 μ l der Probe wurde in eine X-Band-Tube Quarzkapillare gefüllt und in unterkühltem 2-Methylbutan schockgefroren. Die gefrorene Probe wurde in den Resonator eingesetzt und ein einfaches Elektronenspin-Echo-Experiment (ESE) wurde durchgeführt. Das Maximum des ESE-Experiments wurde als Pumpfrequenz ν_{pump} und das Niederfeldmaximum als Observationsfrequenz ν_{obs} für das DEER-Experiment festgelegt. Alle Experimente wurden bei X-Band-Frequenzen von 9,3-9,6 GHz und 50 K durchgeführt.

Datenanalyse: Für das Elektronenspin Echo wurde ein einfaches 2-Puls-Experiment, unter Verwendung einer Hahn-Echosequenz $\frac{\pi}{2} - \tau - \pi - \tau - Echo$ und eines 20 mT Felddurchlauf durchgeführt. Die Impulslänge von $\frac{\pi}{2}$ betrug 16 ns, von π 32 ns und eine Verzögerungszeit τ zwischen den Impulsen betrug 176 ns. Die Integration wurde auf das Echo Maximum zentriert und auf eine Breite von 100 ns eingestellt. Aus dem aufgenommenen Spektrum wurde ν_{obs} und ν_{pump} ausgelesen und $\Delta\nu$ berechnet und in das DEER-Experiment übernommen.

Um die dipolare Zeitentwicklung aus einem DEER-Experiment zu erhalten, wurde eine 4-Puls-Sequenz durchgeführt:

$$\frac{\pi}{2}(\nu_{obs}) - \tau_1 - \pi(\nu_{obs}) - t' - \pi(\nu_{pump}) - (\tau_1 + \tau_2 - t') - \pi(\nu_{obs}) - \tau_2 - Echo \quad (69)$$

Die Länge des Beobachterpulses sowohl für $\frac{\pi}{2}$ als auch für π betrug 32 ns, für die Pumppulse wurden 12 ns eingestellt. Die Pumpzeit t' erhöhte sich schrittweise um 8 ns. τ_1 begann bei 180 ns und wurde ebenfalls schrittweise um 8 ns erhöht, die so erhaltenen 8 τ_1 -Werte wurden gemittelt, um die Protonenmodulation zu unterdrücken. Es wurden

DEER-Zeitspuren für 600, 800, 1500 und 2500 ns aufgenommen. Die Auswertung erfolgte in Matlab mit dem Programm DeerAnalysis (Version 2019) von Jeschke.¹²¹

4.6 IR-Messungen

Alle IR-Messungen wurden mit einer Bio-ATR-Einheit in einem Vertex 70 (BRUKER, Billerica, USA), ausgerüstet, mit einem K10 Thermostaten (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland), durchgeführt. Die Proben wurden, wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben hergestellt. 20 µl der Probe wurden auf den Zinkselenid-Kristall des ATR-IR-Gerätes gegeben und die Probenzelle verschlossen. Mit der Software OPUS und dem Softwarepaket Protein Dynamics wurde ein BIO-ATR-Experiment, bei einer konstanten Temperatur von 37° C und 256 Akkumulationen durchgeführt. Bei den Spektren handelt es sich um Differenzspektren, deshalb wurde vor jeder Messung der Hintergrund gemessen und direkt vom Probenspektrum subtrahiert. Die Auswertung erfolgte in Opus und Origin.

4.7 Refraktometer Messungen

Alle Refraktometermessungen wurden auf einem Abbemat Heavy Duty Refraktometer (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) ausgeführt. Alle Proben wurden, wie in der Probenvorbereitung beschrieben, hergestellt. 100 µl der Probenlösung wurden auf das Saphirprisma des Refraktometers pipettiert. Danach wurde eine Temperaturreihe in das Gerät einprogrammiert. Es wurden die Brechungsindices bei 20°, 25°, 30°, 35° und 37° C mit einer Wellenlänge von 589 nm bestimmt. Die Ausgabe der Daten erfolgte in einer Text Datei, die weitere Datenanalyse erfolgte in Tabellenkalkulationsprogrammen wie Excel und Origin. Der Brechungsindex ist eine optische Materialeigenschaft, die benötigt wurde, um mittels DLS den hydrodynamischen Radius zu berechnen.

4.8 Rheometer Messungen

Die Rheometermessungen wurden mit einem Physika MCR 301 Rheometer (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) ausgeführt. Dafür wurde das CP25-2/TG-SN9120 Messsystem in das Gerät eingesetzt. 200 µl der Probe wurden auf den Probenteller gegeben und das Messsystem wurde auf eine Messspalthöhe von 51 µm gefahren. Um die dynamische Viskosität zu messen, wurde eine Temperaturreihe von 20, 25, 30, 35 und 37 °C eingestellt und alle 5 s ein Messpunkt bei 40 Punkten und einer Scherrate von 0,1-100 Hz aufgenommen. Die Berechnung durch Mittelwertbildung der 40 Messpunkte erfolgte im

Programm Origin. Die Viskosität ist eine physikalische Stoffeigenschaft und wird zur Berechnung des hydrodynamischen Radius benötigt.

4.9 SAXS-Messungen

Alle SAXS-Messungen wurden im V-Transmissions-Modus in einer SAXSLAB Laborkonfiguration (Retro-F) mit einer AXO Microfokus Röntgenquelle durchgeführt. Der AXO Multilayer X-Ray Optic (AXO Dresden GmbH, Dresden Deutschland) wurde als Monochromator für CU-K α Strahlung ($\lambda=0,154$ nm) verwendet. Als zweidimensionaler Detektor wurde der PILATUS3 R 300 K (DECTRIS, Baden, Schweiz) verwendet. Die Probe wurde, wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben hergestellt und 20 μ l der Probe wurden in eine Kapillare mit 1 mm Durchmesser (BioSAS JSP stage, SAXSLAB/Xenos SAS, Grenoble, Frankreich) pipettiert. Die Kapillare wurde mit einem Brenner zu geschmolzen und in die Samplestage eingesetzt und mit etwas Klebeband fixiert. Das Röntgengerät wurde verschlossen und evakuiert.¹⁶⁶

Da sich die Position der Probe immer minimal von der vorherigen Messung unterscheidet, muss zuerst die Kapillare mit Probe in die Mitte des Röntgenstrahls gebracht werden. Dazu wird ein Scan der x-, y- und z-Achse durchgeführt, danach wird die Samplestage auf die sich daraus ergebende Position gefahren. Als nächstes wird eine Transmissionsmessung von 60 Sekunden durchgeführt, um den Streukontrast zu bestimmen, wovon die Gesamtmesszeit abhängig gemacht wird, denn es gilt je höher der Kontrast, desto kürzer die Messzeit. Die Proben, die IL enthielten, zeigten einen hohen Kontrast, weshalb sie ca. 3-5 Stunden gemessen wurden. Die Referenzmessungen von Puffer und Glas erfolgten jeweils für 10 Stunden über Nacht.

Für die Temperaturmessungen wurde die Temperatureinheit an die Samplestage angeschlossen und in der Gerätesoftware eine Temperaturreihe von 20 °-70 °C in 10 °K Schritten programmiert.

Datenanalyse: Die gemessenen Daten wurden mittels der Software Saxgui 2 umgewandelt, sodass sie in das Programm Igor Pro Version 7 eingeladen werden konnten. Die Analyse der Spektren lief für alle Proben nach den gleichen vier Schritten ab. Erstens wurden die Daten der Proben- und Referenzmessungen eingeladen. Zweitens mussten die Proben um den Hintergrund korrigiert werden. Da die Messungen für Puffer und Glas sehr ähnlich waren, wurden die Proben nur um Glas korrigiert. Bei allen Proben wurde der Wert für Glas abgezogen, die so erhaltenen Differenzspektren wurden für die weitere Auswertung verwendet. Im dritten Schritt wurden die Spektren, die aufgrund des Geräteaufbaus für SAXS, MAXS und WAXS einzeln gemessen wurden, zusammengefügt,

um ein Gesamtspektrum zu erhalten. Im finalen Schritt wurden die Gesamtspektren, mittels unterschiedlicher mathematischer Modelle analysiert, um Aussagen über Partikelgröße, Form und Struktur treffen zu können.

4.10 Rekombinante Herstellung von MBP

4.10.1 Transformation und Expression

4.10.1.1 Transformation der Zellen

Um Protein exprimieren zu können, müssen die Bakterienzellen transformiert werden, man taut BL21-Zellen auf und pipettiert 1-4 µl des gewünschten Expressionsvektors zu den Zellen und inkubiert sie für 20 Minuten auf Eis. Danach wurden die Zellen bei 42°C für 90 Sekunden hitzebehandelt und anschließend nochmals für 3 Minuten auf Eis gelegt. Anschließend wurden 500 µl SOC-Medium zur Zellsuspension gegeben und im Probenschüttler bei 300 rpm und 37° C für 30 Minuten inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 50 ml LB-Medium gegeben, zusätzlich wurde Ampicillin in der Verdünnung 1:1000 in das LB-Medium pipettiert. Die Vorkultur wird über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der OD-Wert gemessen.³³

4.10.1.2 Proteinexpression

Zur Proteinexpression wurden jeweils 15 ml der Übernachtskultur in je 1,0 l LB-Medium gegeben und wie bei der Vorkultur mit Ampicillin 1:1000 versetzt. Die Zellsuspension wurde bei 37° C im Inkubationsschüttler bis zu einer OD von 0,6-0,8 inkubiert. Zur Induktion der Proteinexpression wurden 1,5 ml IPTG-Lösung in den Kolben pipettiert. Nach 2,5-3 Stunden wurde die Inkubation abgebrochen und die Zellsuspension in Zentrifugenbecher gefüllt und bei 4000 rpm 4° C für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in wenigen Milliliter Medium resuspendiert, in 50 ml Falcontubes gefüllt und erneut bei 5000 rpm 4° C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit flüssigem Stickstoff gefroren und bis zum Zellaufschluss im Gefrierfach aufbewahrt.³³

4.10.1.3 Medien und Lösungen

LB-Medium (1,0 l):

15 g NaCl
7,5 g Hefeextrakt
15 g Trypton

SOC-Medium:

0,5% Hefeextrakt
2% Trypton
0,6 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glukose

Ampicillin:

50 mg/ml in 1 mol/l
Ethanol

IPTG:

Sämtliche Medien mussten vor Benutzung autoklaviert werden.³³

4.10.2 Zellaufschluss und Reinigung von MBP

4.10.2.1 Zellaufschluss

Auf das noch gefrorene Zellpellet wurde Lysis-Puffer gegeben, ca. 1 ml pro g Zellmasse, und das Zellpellet wurde unter vorsichtigem Schütteln gelöst. Die Suspension wurde in das Zellaufschlussgerät (Continuous Systems) gefüllt, das nach dem Aufschluss erhaltene Zell Lysat wurde in Zentrifugenröhrchen gefüllt und für 30 min bei 30000 rpm und 4° C zentrifugiert, um weitere Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand konnte sehr viskos sein und musste vor dem Einfüllen in die FPLC nochmals mit Lysis-Puffer 1:1 verdünnt werden.

4.10.2.2 Nickel Affinitätschromatographie

Das Zelllysate wurde in einen 150 ml Superloop (GE, Healthcare) gefüllt und an die FPLC (Äkta) angeschlossen. Die Reinigung erfolgte über ein 5 ml HisTrap™ Crude Säule; bevor aber das Protein aufgetragen wurde, musste die Säule mit 5 Säulenvolumina Lysis-Puffer equilibriert werden. Danach wurde das Zelllysate auf die Säule aufgetragen und mit 10 Säulenvolumina Lysis-Puffer gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde das Protein mit 10 Säulenvolumina Elutions-Puffer eluiert es wurden jeweils 5 ml Fraktionen aufgefangen. Die Flussrate sollte 1 ml/min betragen. Mittels UV-Detektor wurde geprüft, welche Fraktionen Protein enthalten. Diese Fraktionen wurden in einen Dialyseschlauch mit einem MWCO von 6-8 kDa gefüllt und gegen Dialyse-Puffer über Nacht dialysiert.³³

4.10.2.3 Ionenaustauschchromatographie

Das Dialysat wurde in einen 50 ml Superloop (GE, Healthcare) gefüllt und an die FPLC (Äkta) angeschlossen. Die Ionenaustauschchromatographie erfolgt über eine 1ml HiTrap SP FF Säule. Zuerst wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina IEX A gespült, um den Lagerpuffer zu entfernen, danach wurde sie mit 20 Säulenvolumina Charge-Puffer equilibriert und erneut mit 10 Säulenvolumina IEX A gespült. Als nächstes wurde die Probe geladen und mit 20 Säulenvolumina IEX A gewaschen. Um die Probe zu eluieren wurde ein linearer Gradient von 0% - 100% IEX B mit einem Gesamtvolumen von 50 ml eingestellt, es wurden 2 ml Fraktionen aufgefangen. Alle Fraktionen, die Protein enthalten, wurden für die Finale Dialyse in einen Dialyseschlauch mit einem MWCO von 6-8 kDa gefüllt. Die Dialyse erfolgte in drei Schritten zuerst zweimal gegen Dialysepuffer A, danach zweimal gegen Dialysepuffer B und zuletzt viermal gegen dest. Wasser. Jeder Dialyseschritt erfolgt mit einem Volumen von 2 L und einer Zeit zwischen 6-12 Stunden. Im letzten Schritt wurde das Protein aus dem Dialyseschlauch in ein 15 ml Reaktionsgefäß gefüllt und lyophilisiert.³³

4.10.2.4 Puffer und Fließmittel

Lysis-Puffer:

8 M Urea
100 mM NaH₂PO₄
5 mM TRIS
500 mM NaCl
10 mM Imidazol
1 % Tween 20
pH 8

Elutions-Puffer:

8 M Urea
100 mM NaH₂PO₄
5 mM TRIS
500 mM NaCl
10 mM Imidazol
pH 4,5

Dialysepuffer:

6 M Urea
80 mM Glycin
pH 10

IEX A:

6 M Urea
80 mM Glycin
pH 10

IEX B:

6 M Urea
80 mM Glycin
0,2 M NaCl
pH 10

Charge-Puffer:

6 M Urea
80 mM Glycin
1 M NaCl
pH 10

Dialysepuffer A:

50 mM Tris
250 mM NaCl

Dialysepuffer B:

100 mM NaCl

Dialysepuffer C:

dH₂O

Alle Fließmittel mussten vor Gebrauch filtriert und entgast werden. Für Cysteinvarianten musste sämtlichen Fließmitteln und Puffern, 10 mM β -Mercapthoethanol oder 1 mM DTT hinzugefügt werden

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ionische Flüssigkeiten gehören trotz ihrer langen Geschichte zu einer der am wenigsten erforschten Stoffklasse. Sie sind erst in den letzten Dekaden wieder in den Fokus der Forschung gerückt. Da sie aufgrund ihrer Eigenschaften, wie nicht-entflammbarkeit, vernachlässigbarem Dampfdruck und Ungiftigkeit, allgemein als umweltfreundlich gelten, werden sie oft als „Green Solvents“ bezeichnet. Bis jetzt werden sie als umweltfreundlicher Ersatz für konventionelle Lösemittel, Katalysator für chemische Reaktionen oder für elektrochemische Anwendung, z.B. in Batterien eingesetzt. Ein Teil dieser Arbeit sollte neue Anwendungsmöglichkeiten in der Protein Biochemie für diese ionischen Flüssigkeiten finden.^{1,2,4}

Basisches Myelin Protein ist ein intrinsisch ungeordnetes Protein der Myelinscheide, es erfüllt wichtige Aufgaben bei der Isolierung des Axons, indem es die multilamellare Membran verdichtet und stabilisiert. MBP spielt eine entscheidende Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Multipler Sklerose, die zu einer Demyelinisierung der Myelinmembran führt. Von IDPs ist bekannt, dass sie hochspezialisierte Proteine mit großer Flexibilität sind, die nur an ihrem Zielort sekundär oder tertiär Strukturen ausbilden. Über MBP im Speziellen ist bekannt, dass es in wässrigen Lösungen keinerlei Sekundärstruktur bildet und zur Aggregation neigt.^{9,10,19,27,31,55,61,167,168}

Im Zuge dieser Arbeit sollte der Einfluss von ionischen Flüssigkeiten auf MBP untersucht werden. Ziel war es, IL/Wasser Mischungen herzustellen und dadurch MBP in wässrige Lösung zu überführen, ohne dass es zur Aggregation oder Clusterung des Proteins kommt. Dafür wurden zwei Modell-ILs ausgewählt, die sich in früheren Arbeiten als äußerst vielversprechend im Zusammenhang mit der Stabilisation der Struktur von Proteinen erwiesen haben.^{3,6,48,50–53,169}

In Kapitel 3.1 wurde der Einfluss von Cholin-dihydrogenphosphat auf Dynamik und Struktur von MBP mittels dynamischer und elektrophoretischer Lichtstreuung gemessen. Es konnten einige interessante Ergebnisse beobachtet werden, allerdings hat sich gezeigt, dass die Verwendung von CDHP als IL die Aggregation bereits bei geringen Protein Konzentrationen verstärkt.²³ Um Puffer Effekte ausschließen zu können wurden die Messungen mit HEPES und PBS-Puffer durchgeführt. Es zeigte sich, dass Phosphatpuffer weniger geeignet sind als HEPES, da vermutlich die Phosphat-Ionen die Aggregation begünstigen. Nach diesen Ergebnissen wurde davon abgesehen, weitere Experimente mit CDHP als Modell IL durchzuführen.^{23,139}

In Kapitel 3.2 drehte sich alles um die rekombinante Herstellung von MBP in den Varianten C1WT und C1S17CH85C, welche für die cw- und Puls-EPR Experimente benötigt wurden. Durch Optimierung des Expressionsprozesses und der Reinigung konnte die

Ausbeute gesteigert werden.³³ Der Überschuss an Ausbeute konnte für Kristallisationsexperimente verwendet werden. Die Kristallisationsexperimente waren leider nur von kleinen Erfolgen gekrönt, es konnten zwar Kristalle gewonnen werden allerdings konnten sie nicht vermessen werden. Bei nachfolgenden Kristallisationsansätzen wurden nur noch Mikrokristalle generiert.

In Kapitel 3.3 ging es um die Verwendung von 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat (BMIm) als Modell zur Verwendung als pseudo Mono- bzw. Bilayer- Membransystem. Dazu wurde mittels DLS das optimale Mischungsverhältnis von BMIm zu Wasser bestimmt. Danach erfolgten DLS-Messungen, ob das entstandene System dazu in der Lage ist, MBP zu lösen. Um die Mikrostruktur der Lösung und ihre Interaktion mit MBP aufzuklären wurden ELS-, cw-EPR-, Puls-EPR-, IR- und SAXS-Messungen durchgeführt. Die daraus gewonnenen Ergebnisse wurden verwendet, um ein Modellsystem zu entwickeln, wie eine mögliche Interaktion aussehen könnte und welchen Einfluss MBP auf die vorhandenen Lösungsstrukturen hat.

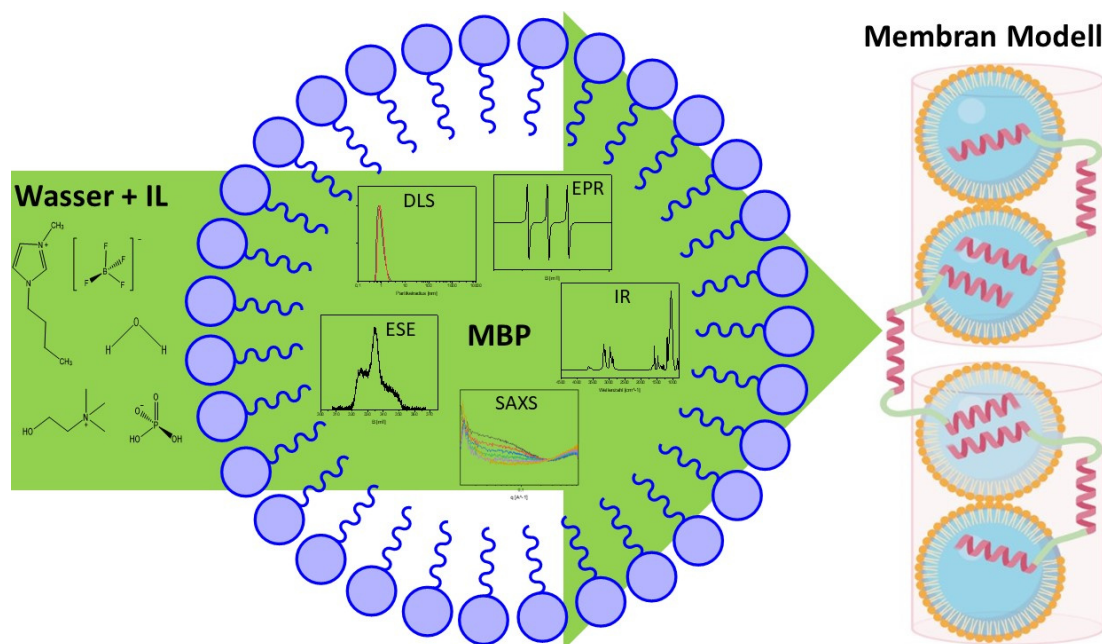


Abbildung 56 Zusammenfassung des Projektes von den verwendeten Chemikalien über die verwendeten Methoden bis zum entstandenen Modell

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse wie folgt darstellen:

1. Die Verwendung von Cholin-dihydrogenphosphat als Modell IL führt zur verstärkten Aggregation von MBP.
2. Es war möglich, die Ausbeute der rekombinanten Herstellung von MBP und seiner Varianten zu steigern.
3. BMIm/Wasser Mischungen sind in der Lage, MBP Aggregatfrei zu lösen und bilden ein pseudo Membran System, welches das Studium von MBP in wässrigen Lösungen erlaubt
4. Dieses Membransystem könnte es zukünftig erlauben MBP zu kristallisieren.

Diese Arbeit soll die Grundlage für zukünftige Projekte auf dem Gebiet der ionischen Flüssigkeiten und ihrer Interaktion mit Proteinen sein. Auf jeden Fall sollten weitere Kristallisationsexperimente in diesem oder einem ähnlichen System fortgeführt werden, da es bis zum heutigen Tag keine Kristallstruktur von MBP gibt. Des Weiteren könnte die Doppel-Cystein-Mutante C1S17CH85C mittels Fluoreszenzlabel in der Fluoreszenzspektroskopie oder Microscale Thermophorese (MST) gemessen werden, um noch detailliertere Einblicke in das System zu erhalten. Um herauszufinden, ob es sich bei dem System eher um einen Mono- oder Bilayer handelt, könnten Filmwaage Messungen durchgeführt werden.¹⁷⁰ Außerdem könnten Vergleichsmessungen mit den C8 Varianten des MBP durchgeführt werden, um herauszufinden ob erkranktes Myelin ähnliche Ergebnisse zeigt. Zusätzlich könnte durch Variation der Reste am Imidazol Größe und Aufbau der Lösungsstruktur verändert werden. Vielleicht kann das ermittelte Modellsystem zukünftig nicht nur für MBP, sondern auch für andere Membranproteine oder IDPs eingesetzt werden, um Struktur und Aufgabe dieser hochflexiblen und spezifischen Proteine zu verstehen. Alles in allem kann man sagen, dass es sich sowohl bei ILs als auch bei IDPs um ein wenig erforschtes Gebiet der Chemie bzw. der Biochemie handelt auf dem zukünftig noch viele Forschungsdurchbrüche möglich sind.

Literaturverzeichnis

References

- (1) FREEMANTLE, M. *An introduction to ionic liquids*; Royal Society of Chemistry, 2010.
- (2) Clare, B.; Sirwardana, A.; Macfarlane, D. R. Synthesis, purification and characterization of ionic liquids. *Topics in current chemistry* **2010**, *290*, 1–40. DOI: 10.1007/128_2008_31.
- (3) Wilkes, J. S.; Zaworotko, M. J. Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992** (13), 965. DOI: 10.1039/C39920000965.
- (4) Blanchard, L. A.; Hancu, D.; Beckman, E. J.; Brennecke, J. F. Green processing using ionic liquids and CO₂. *Nature* **1999**, *399* (6731), 28–29. DOI: 10.1038/19887.
- (5) Camper, D.; Bara, J. E.; Gin, D. L.; Noble, R. D. Room-Temperature Ionic Liquid–Amine Solutions: Tunable Solvents for Efficient and Reversible Capture of CO₂. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, *47* (21), 8496–8498. DOI: 10.1021/ie801002m.
- (6) Akdogan, Y.; Junk, M. J. N.; Hinderberger, D. Effect of ionic liquids on the solution structure of human serum albumin. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (4), 1072–1079. DOI: 10.1021/bm1014156. Published Online: Feb. 18, 2011.
- (7) Goujon, N.; Wang, X.; Rajkova, R.; Byrne, N. Regenerated silk fibroin using protic ionic liquids solvents: towards an all-ionic-liquid process for producing silk with tunable properties. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2012**, *48* (9), 1278–1280. DOI: 10.1039/c2cc17143k. Published Online: Dec. 19, 2011.
- (8) Wang, J.; Wei, L.; Ma, Y.; Li, K.; Li, M.; Yu, Y.; Wang, L.; Qiu, H. Collagen/cellulose hydrogel beads reconstituted from ionic liquid solution for Cu(II) adsorption. *Carbohydrate polymers* **2013**, *98* (1), 736–743. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.06.001. Published Online: Jun. 7, 2013.
- (9) Dunker, A.; Lawson, J.; Brown, C. J.; Williams, R. M.; Romero, P.; Oh, J. S.; Oldfield, C. J.; Campen, A. M.; Ratliff, C. M.; Hipps, K. W.; Ausio, J.; Nissen, M. S.; Reeves, R.; Kang, C.; Kissinger, C. R.; Bailey, R. W.; Griswold, M. D.; Chiu, W.; Garner, E. C.; Obradovic, Z. Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2001**, *19* (1), 26–59. DOI: 10.1016/S1093-3263(00)00138-8.
- (10) Dunker, A. K.; Silman, I.; Uversky, V. N.; Sussman, J. L. Function and structure of inherently disordered proteins. *Current opinion in structural biology* **2008**, *18* (6), 756–764. DOI: 10.1016/J.SBI.2008.10.002. Published Online: Nov. 17, 2008.
- (11) Dunker, A. K.; Oldfield, C. J.; Meng, J.; Romero, P.; Yang, J. Y.; Chen, J. W.; Vacic, V.; Obradovic, Z.; Uversky, V. N. The unfoldomics decade: an update on

- intrinsically disordered proteins. *BMC genomics* **2008**, *9 Suppl 2*, S1. DOI: 10.1186/1471-2164-9-S2-S1. Published Online: Sep. 16, 2008.
- (12) Forman-Kay, J. D.; Mittag, T. From sequence and forces to structure, function, and evolution of intrinsically disordered proteins. *Structure (London, England : 1993)* **2013**, *21* (9), 1492–1499. DOI: 10.1016/j.str.2013.08.001.
- (13) Iakoucheva, L. M.; Brown, C. J.; Lawson, J.; Obradović, Z.; Dunker, A. Intrinsic Disorder in Cell-signaling and Cancer-associated Proteins. *Journal of molecular biology* **2002**, *323* (3), 573–584. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)00969-5.
- (14) Kurzbach, D.; Platzer, G.; Schwarz, T. C.; Henen, M. A.; Konrat, R.; Hinderberger, D. Cooperative unfolding of compact conformations of the intrinsically disordered protein osteopontin. *Biochemistry* **2013**, *52* (31), 5167–5175. DOI: 10.1021/bi400502c. Published Online: Jul. 24, 2013.
- (15) Kurzbach, D.; Schwarz, T. C.; Platzer, G.; Höfler, S.; Hinderberger, D.; Konrat, R. Kompensatorische Anpassungen der strukturellen Dynamik eines intrinsisch unstrukturierten Protein-Komplexes. *Angew. Chem.* **2014**, *126* (15), 3919–3922. DOI: 10.1002/ange.201308389.
- (16) Tompa, P.; Csermely, P. The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2004**, *18* (11), 1169–1175. DOI: 10.1096/fj.04-1584rev.
- (17) Tompa, P.; Fersht, A. *Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins*; Chapman and Hall/CRC, 2009. DOI: 10.1201/9781420078930.
- (18) Tompa, P.; Szász, C.; Buday, L. Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends in Biochemical Sciences* **2005**, *30* (9), 484–489. DOI: 10.1016/j.tibs.2005.07.008.
- (19) Uversky, V. N. Intrinsically disordered proteins from A to Z. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2011**, *43* (8), 1090–1103. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.04.001. Published Online: Apr. 8, 2011.
- (20) van der Lee, R.; Buljan, M.; Lang, B.; Weatheritt, R. J.; Daughdrill, G. W.; Dunker, A. K.; Fuxreiter, M.; Gough, J.; Gsponer, J.; Jones, D. T.; Kim, P. M.; Kriwacki, R. W.; Oldfield, C. J.; Pappu, R. V.; Tompa, P.; Uversky, V. N.; Wright, P. E.; Babu, M. M. Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chemical reviews* **2014**, *114* (13), 6589–6631. DOI: 10.1021/cr400525m. Published Online: Apr. 29, 2014.
- (21) Cumberworth, A.; Lamour, G.; Babu, M. M.; Gsponer, J. Promiscuity as a functional trait: intrinsically disordered regions as central players of interactomes. *The Biochemical journal* **2013**, *454* (3), 361–369. DOI: 10.1042/BJ20130545.

- (22) Lange, C.; Patil, G.; Rudolph, R. Ionic liquids as refolding additives: N'-alkyl and N'-(omega-hydroxyalkyl) N-methylimidazolium chlorides. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2005**, *14* (10), 2693–2701. DOI: 10.1110/ps.051596605.
- (23) Mehta, A.; Rao, J. R.; Fathima, N. N. Electrostatic Forces Mediated by Choline Dihydrogen Phosphate Stabilize Collagen. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (40), 12816–12827. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b07055. Published Online: Sep. 28, 2015.
- (24) Schröder, C. Proteins in Ionic Liquids: Current Status of Experiments and Simulations. *Topics in current chemistry (Cham)* **2017**, *375* (2), 25. DOI: 10.1007/s41061-017-0110-2. Published Online: Feb. 7, 2017.
- (25) Shao, Q. On the influence of hydrated imidazolium-based ionic liquid on protein structure stability: a molecular dynamics simulation study. *The Journal of Chemical Physics* **2013**, *139* (11), 115102. DOI: 10.1063/1.4821588.
- (26) Baumann, N.; Pham-Dinh, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews* **2001**, *81* (2), 871–927. DOI: 10.1152/physrev.2001.81.2.871.
- (27) Buehler, L. K. *Cell membranes*; Garland Science, Taylor & Francis Group, 2016.
- (28) Harauz, G.; Boggs, J. M. Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms. *Journal of neurochemistry* **2013**, *125* (3), 334–361. DOI: 10.1111/jnc.12195. Published Online: Mar. 6, 2013.
- (29) Harauz, G.; Ishiyama, N.; Hill, C. M. D.; Bates, I. R.; Libich, D. S.; Farès, C. Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron (Oxford, England : 1993)* **2004**, *35* (7), 503–542. DOI: 10.1016/J.MICRON.2004.04.005.
- (30) Harauz, G.; Ladizhansky, V.; Boggs, J. M. Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein. *Biochemistry* **2009**, *48* (34), 8094–8104. DOI: 10.1021/bi901005f.
- (31) Hafler, D. A. Multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* **2004**, *113* (6), 788–794. DOI: 10.1172/JCI21357.
- (32) Kim, J. K.; Mastronardi, F. G.; Wood, D. D.; Lubman, D. M.; Zand, R.; Moscarello, M. A. Multiple sclerosis: an important role for post-translational modifications of myelin basic protein in pathogenesis. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2003**, *2* (7), 453–462. DOI: 10.1074/mcp.M200050-MCP200. Published Online: Jun. 25, 2003.
- (33) George Harauz. *Harauz Lab Manual*.
- (34) Annapureddy, H. V. R.; Kashyap, H. K.; Biase, P. M. de; Margulis, C. J. What is the origin of the prepeak in the X-ray scattering of imidazolium-based room-temperature ionic liquids? *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (50), 16838–16846. DOI: 10.1021/jp108545z. Published Online: Nov. 15, 2010.

- (35) Abe, H.; Takekiyo, T.; Shigemi, M.; Yoshimura, Y.; Tsuge, S.; Hanasaki, T.; Ohishi, K.; Takata, S.; Suzuki, J.-I. Direct Evidence of Confined Water in Room-Temperature Ionic Liquids by Complementary Use of Small-Angle X-ray and Neutron Scattering. *The journal of physical chemistry letters* **2014**, *5* (7), 1175–1180. DOI: 10.1021/jz500299z. Published Online: Mar. 20, 2014.
- (36) Bernadó, P.; Mylonas, E.; Petoukhov, M. V.; Blackledge, M.; Svergun, D. I. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (17), 5656–5664. DOI: 10.1021/ja069124n. Published Online: Apr. 6, 2007.
- (37) Bhargava, B. L.; Devane, R.; Klein, M. L.; Balasubramanian, S. Nanoscale organization in room temperature ionic liquids: a coarse grained molecular dynamics simulation study. *Soft matter* **2007**, *3* (11), 1395–1400. DOI: 10.1039/B710801J.
- (38) Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2016**, *235*, 337–351. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017. Published Online: Jun. 10, 2016.
- (39) Bradley, A. E.; Hardacre, C.; Holbrey, J. D.; Johnston, S.; McMath, S. E. J.; Nieuwenhuyzen, M. Small-Angle X-ray Scattering Studies of Liquid Crystalline 1-Alkyl-3-methylimidazolium Salts. *Chem. Mater.* **2002**, *14* (2), 629–635. DOI: 10.1021/cm010542v.
- (40) Hardacre, C.; Holbrey, J. D.; Mullan, C. L.; Youngs, T. G. A.; Bowron, D. T. Small angle neutron scattering from 1-alkyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquids (C(n)mimPF(6), n=4, 6, and 8). *The Journal of Chemical Physics* **2010**, *133* (7), 74510. DOI: 10.1063/1.3473825.
- (41) Kashyap, H. K.; Santos, C. S.; Annapureddy, H. V. R.; Murthy, N. S.; Margulis, C. J.; Castner, E. W. Temperature-dependent structure of ionic liquids: X-ray scattering and simulations. *Faraday discussions* **2012**, *154*, 133-43; discussion 189-220, 465-71. DOI: 10.1039/C1FD00059D.
- (42) Kikhney, A. G.; Svergun, D. I. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS letters* **2015**, *589* (19 Pt A), 2570–2577. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.08.027. Published Online: Aug. 29, 2015.
- (43) Martinelli, A.; Maréchal, M.; Ostlund, A.; Cambedouzou, J. Insights into the interplay between molecular structure and diffusional motion in 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids: a combined PFG NMR and X-ray scattering study. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2013**, *15* (15), 5510–5517. DOI: 10.1039/C3CP00097D.
- (44) Chittur, K. K. FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. *Biomaterials* **1998**, *19* (4-5), 357–369. DOI: 10.1016/S0142-9612(97)00223-8.

- (45) Glassford, S. E.; Byrne, B.; Kazarian, S. G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochimica et biophysica acta* **2013**, *1834* (12), 2849–2858. DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.07.015. Published Online: Aug. 6, 2013.
- (46) Perkins, S. L.; Painter, P.; Colina, C. M. Molecular dynamic simulations and vibrational analysis of an ionic liquid analogue. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (35), 10250–10260. DOI: 10.1021/jp404619x. Published Online: Aug. 25, 2013.
- (47) Navia, P.; Troncoso, J.; Romani, L. Excess Magnitudes for Ionic Liquid Binary Mixtures with a Common Ion. *J. Chem. Eng. Data* **2007**, *52* (4), 1369–1374. DOI: 10.1021/je700076t.
- (48) Gomes de Azevedo, R.; Esperança, J. M. S. S.; Najdanovic-Visak, V.; Visak, Z. P.; Guedes, H. J. R.; Da Nunes Ponte, M.; Rebelo, L. P. N. Thermophysical and Thermodynamic Properties of 1-Butyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate and 1-Butyl-3-methylimidazolium Hexafluorophosphate over an Extended Pressure Range. *J. Chem. Eng. Data* **2005**, *50* (3), 997–1008. DOI: 10.1021/je049534w.
- (49) Sigma-Aldrich. *Sicherheitsdatenblatt 1-Butyl-3-methyl-imidazoliumtetrafluoroborat*, 2022.
- (50) Cha, S.; Ao, M.; Sung, W.; Moon, B.; Ahlström, B.; Johansson, P.; Ouchi, Y.; Kim, D. Structures of ionic liquid-water mixtures investigated by IR and NMR spectroscopy. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2014**, *16* (20), 9591–9601. DOI: 10.1039/C4CP00589A.
- (51) Zheng, Y.-Z.; Zhou, Y.; Deng, G.; Guo, R.; Chen, D.-F. A combination of FTIR and DFT to study the microscopic structure and hydrogen-bonding interaction properties of the BMIMBF₄ and water. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* **2020**, *226*, 117624. DOI: 10.1016/j.saa.2019.117624. Published Online: Oct. 7, 2019.
- (52) Zhang, S.; Zhou, Q.; Lu, X.; Song, Y.; Wang, X., Eds. *Physicochemical Properties of Ionic Liquid Mixtures*; Springer Netherlands, 2016. DOI: 10.1007/978-94-017-7573-1.
- (53) Zhang, S.; Zhou, Q.; Lu, X.; Song, Y.; Wang, X. Introduction to properties of ionic liquid mixtures. In *Physicochemical Properties of Ionic Liquid Mixtures*; Zhang, S., Zhou, Q., Lu, X., Song, Y., Wang, X., Eds.; Springer Netherlands, 2016; pp 1–53. DOI: 10.1007/978-94-017-7573-1_1.
- (54) Sigma-Aldrich. *Sicherheitsdatenblatt Cholin-dihydrogenphosphat*, 2022.
- (55) Tompa, P. Intrinsically unstructured proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **2002**, *27* (10), 527–533. DOI: 10.1016/S0968-0004(02)02169-2.
- (56) Ward, J. J.; Sodhi, J. S.; McGuffin, L. J.; Buxton, B. F.; Jones, D. T. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *Journal of molecular biology* **2004**, *337* (3), 635–645. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.02.002.

- (57) Wright, P. E.; Dyson, H. J. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of molecular biology* **1999**, *293* (2), 321–331. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3110.
- (58) Tompa, P.; Fuxreiter, M. Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends in Biochemical Sciences* **2008**, *33* (1), 2–8. DOI: 10.1016/j.tibs.2007.10.003. Published Online: Nov. 28, 2007.
- (59) Uversky, V. N.; Gillespie, J. R.; Fink, A. L. Why are ?natively unfolded? proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* **2000**, *41* (3), 415–427. DOI: 10.1002/1097-0134(20001115)41:3<415:AID-PROT130>3.0.CO;2-7.
- (60) Welsch, U.; Deller, T., Eds. *Histologie - Lehrbuch und Atlas: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie*, 6. Auflage; Urban & Fischer in Elsevier, 2022.
- (61) Boggs, J. M. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2006**, *63* (17), 1945–1961. DOI: 10.1007/s00018-006-6094-7.
- (62) Vassall, K. A.; Bamm, V. V.; Jenkins, A. D.; Velte, C. J.; Kattnig, D. R.; Boggs, J. M.; Hinderberger, D.; Harauz, G. Substitutions mimicking deimination and phosphorylation of 18.5-kDa myelin basic protein exert local structural effects that subtly influence its global folding. *Biochimica et biophysica acta* **2016**, *1858* (6), 1262–1277. DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.02.024. Published Online: Feb. 19, 2016.
- (63) Widder, K.; Träger, J.; Kerth, A.; Harauz, G.; Hinderberger, D. Interaction of Myelin Basic Protein with Myelin-like Lipid Monolayers at Air-Water Interface. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2018**, *34* (21), 6095–6108. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b00321. Published Online: May. 16, 2018.
- (64) Haas, H.; Oliveira, C.; Torriani, I. L.; Polverini, E.; Fasano, A.; Carlone, G.; Cavatorta, P.; Riccio, P. Small Angle X-Ray Scattering from Lipid-Bound Myelin Basic Protein in Solution. *Biophysical journal* **2004**, *86* (1), 455–460. DOI: 10.1016/S0006-3495(04)74122-3.
- (65) Mueller, H.; Butt, H.-J.; Bamberg, E. Adsorption of Membrane-Associated Proteins to Lipid Bilayers Studied with an Atomic Force Microscope: Myelin Basic Protein and Cytochrome c. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (18), 4552–4559. DOI: 10.1021/jp9940856.
- (66) Bates, I. R.; Boggs, J. M.; Feix, J. B.; Harauz, G. Membrane-anchoring and charge effects in the interaction of myelin basic protein with lipid bilayers studied by site-directed spin labeling. *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278* (31), 29041–29047. DOI: 10.1074/jbc.M302766200. Published Online: May. 14, 2003.
- (67) Vassall, K. A.; Bamm, V. V.; Harauz, G. MyelStones: the executive roles of myelin basic protein in myelin assembly and destabilization in multiple sclerosis. *The Biochemical journal* **2015**, *472* (1), 17–32. DOI: 10.1042/BJ20150710.

- (68) Raasakka, A.; Kursula, P. Flexible Players within the Sheaths: The Intrinsically Disordered Proteins of Myelin in Health and Disease. *Cells* **2020**, *9* (2). DOI: 10.3390/cells9020470. Published Online: Feb. 18, 2020.
- (69) Raasakka, A.; Ruskamo, S.; Kowal, J.; Barker, R.; Baumann, A.; Martel, A.; Tuusa, J.; Myllykoski, M.; Bürck, J.; Ulrich, A. S.; Stahlberg, H.; Kursula, P. Membrane Association Landscape of Myelin Basic Protein Portrays Formation of the Myelin Major Dense Line. *Scientific reports* **2017**, *7* (1), 4974. DOI: 10.1038/s41598-017-05364-3. Published Online: Jul. 10, 2017.
- (70) Bund, T.; Boggs, J. M.; Harauz, G.; Hellmann, N.; Hinderberger, D. Copper uptake induces self-assembly of 18.5 kDa myelin basic protein (MBP). *Biophysical journal* **2010**, *99* (9), 3020–3028. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.08.022.
- (71) Harauz, G.; Musse, A. A. A tale of two citrullines--structural and functional aspects of myelin basic protein deimination in health and disease. *Neurochemical research* **2007**, *32* (2), 137–158. DOI: 10.1007/s11064-006-9108-9. Published Online: Aug. 9, 2006.
- (72) Shaharabani, R.; Ram-On, M.; Avinery, R.; Aharoni, R.; Arnon, R.; Talmon, Y.; Beck, R. Structural Transition in Myelin Membrane as Initiator of Multiple Sclerosis. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138* (37), 12159–12165. DOI: 10.1021/jacs.6b04826. Published Online: Sep. 6, 2016.
- (73) Shaharabani, R.; Ram-On, M.; Talmon, Y.; Beck, R. Pathological transitions in myelin membranes driven by environmental and multiple sclerosis conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2018**, *115* (44), 11156–11161. DOI: 10.1073/pnas.1804275115. Published Online: Oct. 15, 2018.
- (74) Tranquill, L. R.; Cao, L.; Ling, N. C.; Kalbacher, H.; Martin, R. M.; Whitaker, J. N. Enhanced T cell responsiveness to citrulline-containing myelin basic protein in multiple sclerosis patients. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **2000**, *6* (4), 220–225. DOI: 10.1177/135245850000600402.
- (75) Uversky, V. N. Intrinsic disorder in proteins associated with neurodegenerative diseases. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **2009**, *14* (14), 5188–5238. DOI: 10.2741/3594. Published Online: Jun. 1, 2009.
- (76) Uversky, V. N.; Davé, V.; Iakoucheva, L. M.; Malaney, P.; Metallo, S. J.; Pathak, R. R.; Joerger, A. C. Pathological unfoldomics of uncontrolled chaos: intrinsically disordered proteins and human diseases. *Chemical reviews* **2014**, *114* (13), 6844–6879. DOI: 10.1021/cr400713r. Published Online: May. 15, 2014.
- (77) Weil, M.-T.; Möbius, W.; Winkler, A.; Ruhwedel, T.; Wrzos, C.; Romanelli, E.; Bennett, J. L.; Enz, L.; Goebels, N.; Nave, K.-A.; Kerschensteiner, M.; Schaeren-Wiemers, N.; Stadelmann, C.; Simons, M. Loss of Myelin Basic Protein Function

- Triggers Myelin Breakdown in Models of Demyelinating Diseases. *Cell reports* **2016**, *16* (2), 314–322. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.06.008. Published Online: Jun. 23, 2016.
- (78) Wender, M. Acute disseminated encephalomyelitis (ADEM). *Journal of neuroimmunology* **2011**, *231* (1-2), 92–99. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2010.09.019. Published Online: Jan. 14, 2011.
- (79) Jennica Träger. Physikochemische Charakterisierung des Einflusses lokaler Umgebungsveränderungen auf myelinartige Membranmodelle. Dissertation, Martin Luther Universität, Halle, 2021.
- (80) Weickert, S.; Cattani, J.; Drescher, M. Intrinsically disordered proteins (IDPs) studied by EPR and in-cell EPR. In *Electron Paramagnetic Resonance*; Chechik, V., Murphy, D. M., Eds.; Electron Paramagnetic Resonance; Royal Society of Chemistry, 2018; pp 1–37. DOI: 10.1039/9781788013888-00001.
- (81) Bienz, S.; Bigler, L.; Fox, T.; Meier, H. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 9., überarbeitete und erweiterte Auflage; Georg Thieme Verlag, 2016.
- (82) Winter, R.; Noll, F.; Czeslik, C. *Methoden der biophysikalischen Chemie*, 2., überarb. und erw. Aufl.; Studium; Vieweg + Teubner, 2011.
- (83) Carpenter, D. K. Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology, and Physics (Berne, Bruce J.; Pecora, Robert). *J. Chem. Educ.* **1977**, *54* (10), A430. DOI: 10.1021/ed054pA430.1.
- (84) Holoubek, J. Some applications of light scattering in materials science. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* **2007**, *106* (1-3), 104–121. DOI: 10.1016/j.jqsrt.2007.01.013.
- (85) Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews* **2016**, *8* (4), 409–427. DOI: 10.1007/s12551-016-0218-6. Published Online: Oct. 6, 2016.
- (86) Koppel, D. E. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. *The Journal of Chemical Physics* **1972**, *57* (11), 4814–4820. DOI: 10.1063/1.1678153.
- (87) Provencher, S. W. A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Computer Physics Communications* **1982**, *27* (3), 213–227. DOI: 10.1016/0010-4655(82)90173-4.
- (88) Su, M.; Xu, F.; Cai, X.; Ren, K.; Shen, J. Optimization of regularization parameter of inversion in particle sizing using light extinction method. *China Particuology* **2007**, *5* (4), 295–299. DOI: 10.1016/j.cpart.2007.04.005.
- (89) Delgado, A. V.; González-Caballero, F.; Hunter, R. J.; Koopal, L. K.; Lyklema, J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Journal of colloid and*

interface science **2007**, 309 (2), 194–224. DOI: 10.1016/j.jcis.2006.12.075. Published Online: Mar. 21, 2007.

(90) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*; Elsevier, 2003.

(91) Fritsch, R. J.; Krause, I. ELECTROPHORESIS. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*; Elsevier, 2003; pp 2055–2062. DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/01409-7.

(92) Miller, J. F.; Schätzel, K.; Vincent, B. The determination of very small electrophoretic mobilities in polar and nonpolar colloidal dispersions using phase analysis light scattering. *Journal of colloid and interface science* **1991**, 143 (2), 532–554. DOI: 10.1016/0021-9797(91)90286-H.

(93) Chen, Z.; Wei, Z.; Chen, Y.; Dames, C. Anisotropic Debye model for the thermal boundary conductance. *Phys. Rev. B* **2013**, 87 (12). DOI: 10.1103/PhysRevB.87.125426.

(94) Kaszuba, M.; Corbett, J.; Watson, F. M.; Jones, A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* **2010**, 368 (1927), 4439–4451. DOI: 10.1098/rsta.2010.0175.

(95) Freire, J. M.; Domingues, M. M.; Matos, J.; Melo, M. N.; Veiga, A. S.; Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B. Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. *European biophysics journal : EBJ* **2011**, 40 (4), 481–487. DOI: 10.1007/s00249-010-0661-4. Published Online: Jan. 13, 2011.

(96) Atherton, N. M. *Principles of electron spin resonance*, [Rev. ed.]; Ellis Horwood PTR Prentice Hall physical chemistry series; Horwood, 1993.

(97) Chechik, V.; Carter, E.; Murphy, D. *Electron paramagnetic resonance*; Oxford chemistry primers; Oxford Univ Press, 2016.

(98) Chechik, V.; Murphy, D. M., Eds. *Electron Paramagnetic Resonance*; Electron Paramagnetic Resonance; Royal Society of Chemistry, 2018. DOI: 10.1039/1465-1955.

(99) Drescher, M.; Jeschke, G.; Bordignon, E. *EPR spectroscopy: Applications in chemistry and biology*; Topics in current chemistry, Vol. 321; Springer, 2012.

(100) Gunnar Jeschke. *Einführung in die ESR-Spektroskopie*, 1998.

(101) Gunnar Jeschke. *Kurze Einführung in die elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie*, Universität Konstanz, Konstanz, 2008.

(102) Kirmse. *ESR-Spektroskopie*; De Gruyter, 1985.

(103) Cardona, M.; Fulde, P.; Klitzing, K. von; Queisser, H.-J.; Lotsch, H. K. V.; Slichter, C. P. *Principles of Magnetic Resonance*, Vol. 1; Springer Berlin Heidelberg, 1990. DOI: 10.1007/978-3-662-09441-9.

- (104) Webb, G. A., Ed. *Modern Magnetic Resonance*; Springer Netherlands, 2006. DOI: 10.1007/1-4020-3910-7.
- (105) Weil, J. A.; Bolton, J. R. *Electron paramagnetic resonance:Elementary theory and practical applications*, 2nd ed.; Wiley, 2007.
- (106) Schweiger, A.; Jeschke, G. *Principles of pulse electron paramagnetic resonance*; Oxford University Press, 2001.
- (107) Theory of the nuclear hyperfine structure of paramagnetic resonance spectra in crystals. *Proc. R. Soc. Lond. A* **1951**, 205 (1080), 135–153. DOI: 10.1098/rspa.1951.0022.
- (108) Katharina Widder. Characterisation of the effects of intrinsically disordered protein (IDP)solvent and (IDP)lipid interactions in aqueous solution and lipid monolayers. Dissertation, Martin Luther Universität, Halle, 2019.
- (109) Dzuba, S. A. Librational motion of guest spin probe molecules in glassy media. *Physics Letters A* **1996**, 213 (1-2), 77–84. DOI: 10.1016/0375-9601(96)00081-3.
- (110) Hinderbergerand, D.; Jeschke, G. Site-specific Characterization of Structure and Dynamics of Complex Materials by EPR Spin Probes. In *Modern Magnetic Resonance*; Webb, G. A., Ed.; Springer Netherlands, 2006; pp 1529–1537. DOI: 10.1007/1-4020-3910-7_170.
- (111) Budil, D. E.; Earle, K. A.; Freed, J. H. Full determination of the rotational diffusion tensor by electron paramagnetic resonance at 250 GHz. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97 (7), 1294–1303. DOI: 10.1021/j100109a009.
- (112) Timofeev, V. P.; Misharin, A. Y.; Tkachev, Y. V. Simulation of EPR spectra of the radical TEMPO in water-lipid systems in different microwave ranges. *BIOPHYSICS* **2011**, 56 (3), 407–417. DOI: 10.1134/S0006350911030274.
- (113) Blume, R. J. Electron Spin Relaxation Times in Sodium-Ammonia Solutions. *Phys. Rev.* **1958**, 109 (6), 1867–1873. DOI: 10.1103/PhysRev.109.1867.
- (114) J.N.Junk, M. *Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy*; Springer Berlin Heidelberg, 2012. DOI: 10.1007/978-3-642-25135-1.
- (115) Mims, W. B. Envelope Modulation in Spin-Echo Experiments. *Phys. Rev. B* **1972**, 5 (7), 2409–2419. DOI: 10.1103/PhysRevB.5.2409.
- (116) Hahn, E. L. Spin Echoes. *Phys. Rev.* **1950**, 80 (4), 580–594. DOI: 10.1103/PhysRev.80.580.
- (117) Jeschke, G. DEER distance measurements on proteins. *Annual review of physical chemistry* **2012**, 63, 419–446. DOI: 10.1146/annurev-physchem-032511-143716. Published Online: Jan. 30, 2012.

- (118) Jeschke, G.; Polyhach, Y. Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2007**, *9* (16), 1895–1910. DOI: 10.1039/b614920k. Published Online: Jan. 23, 2007.
- (119) Pannier, M.; Veit, S.; Godt, A.; Jeschke, G.; Spiess, H. W. Dead-time free measurement of dipole-dipole interactions between electron spins. 2000. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2011**, *213* (2), 316–325. DOI: 10.1016/j.jmr.2011.08.035.
- (120) Steinhoff, H.-J. Inter- and intra-molecular distances determined by EPR spectroscopy and site-directed spin labeling reveal protein-protein and protein-oligonucleotide interaction. *Biological chemistry* **2004**, *385* (10), 913–920. DOI: 10.1515/BC.2004.119.
- (121) Jeschke, G.; Chechik, V.; Ionita, P.; Godt, A.; Zimmermann, H.; Banham, J.; Timmel, C. R.; Hilger, D.; Jung, H. DeerAnalysis2006—a comprehensive software package for analyzing pulsed ELDOR data. *Appl. Magn. Reson.* **2006**, *30* (3-4), 473–498. DOI: 10.1007/BF03166213.
- (122) Günzler, H. *IR-Spectroscopy: An Introduction*; Wiley-VCH, 2001.
- (123) Harris, D. C.; Bertolucci, M. D. *Symmetry and spectroscopy: An introduction to vibrational and electronic spectroscopy*; Dover Publications, Inc, 2019.
- (124) *Modern techniques in applied molecular spectroscopy*; Techniques in analytical chemistry series; Wiley, 1998.
- (125) Mirabella, F. M. *Internal reflection spectroscopy: Theory and applications*; Practical spectroscopy, vol. 15; M. Dekker, 1993.
- (126) Nishikida, K.; Nishio, E.; Hannah, R. W. *Selected Applications of Modern FT-IR Techniques*; Routledge, 2018.
- (127) Belitz, H.-D.; Bergner, K.-G.; Berndt, D.; Diemair, W.; Drawert, F.; Eisenbrand, J.; Feiling, K.; Flügge, J.; Freund, H.; Grüne, A. M. B.; Hecker, E.; Heimann, W.; Henning, H.-J.; Jägerhuber, P.; Johannsen, H.; Mahling, A.; Pfeilsticker, K.; Pfeilsticker, K.; Ramb, R.; Seher, A.; Slevogt, K. E.; Volz, K.; Walter, F.; Werner, H.; Wisser, K.; Wohleben, G.; Wollenberg, H.; Schormüller, J., Eds. *Analytik der Lebensmittel: Physikalische und Physikalisch-Chemische Untersuchungsmethoden*; Handbuch der Lebensmittelchemie, 2 / 1; Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer, 1965.
- (128) *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*; Springer US, 1987.
- (129) *Small angle x-ray and neutron scattering from solutions of biological macromolecules*; International Union of Crystallography monographs on crystallography, Vol. 19; Oxford University Press, 2013.

- (130) Svergun, D. I.; Koch, M. H. J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep. Prog. Phys.* **2003**, *66* (10), 1735–1782. DOI: 10.1088/0034-4885/66/10/R05.
- (131) Koch, M. H.; Vachette, P.; Svergun, D. I. Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Quarterly reviews of biophysics* **2003**, *36* (2), 147–227. DOI: 10.1017/S0033583503003871.
- (132) Petoukhov, M. V.; Svergun, D. I. Applications of small-angle X-ray scattering to biomacromolecular solutions. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2013**, *45* (2), 429–437. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.10.017. Published Online: Nov. 9, 2012.
- (133) Mertens, H. D. T.; Svergun, D. I. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *Journal of structural biology* **2010**, *172* (1), 128–141. DOI: 10.1016/j.jsb.2010.06.012. Published Online: Jun. 15, 2010.
- (134) Barnes, H. A.; Hutton, J. F.; Walters, K. *An introduction to rheology*, 6th impression; Rheology, Vol. 3; Elsevier, 1998.
- (135) Kulicke, W.-M.; Clasen, C. *Viscosimetry of Polymers and Polyelectrolytes*; Springer Laboratory; Springer Berlin Heidelberg, 2004.
- (136) Mezger, T. *The rheology handbook: For users of rotational and oscillatory rheometers*, 5th revised edition; European coatings library; Vincentz, 2020.
- (137) Wulf, K. Fließverhalten von Stoffen und Stoffgemischen. Hg. von W.-M. KULICKE. ISBN 3-85738-115-4. Basel/Heidelberg/New York: Hüthig und Wepf Verlag 1986. 487 S., geb. DM 168,—. *Acta Polym.* **1987**, *38* (8), 507. DOI: 10.1002/ACTP.1987.010380817.
- (138) *Colloidal Suspension Rheology*; Knovel.
- (139) Ulrike Cerajewski. Ionic liquids and ionic liquid-like systems – from molecular structure to macroscopical properties. Dissertation, Martin Luther Universität, Halle, 2020.
- (140) Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen, J. V.; Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols* **2006**, *1* (6), 2856–2860. DOI: 10.1038/nprot.2006.468.
- (141) Olsen, J. V.; Godoy, L. M. F. de; Li, G.; Macek, B.; Mortensen, P.; Pesch, R.; Makarov, A.; Lange, O.; Horning, S.; Mann, M. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2005**, *4* (12), 2010–2021. DOI: 10.1074/mcp.T500030-MCP200. Published Online: Oct. 24, 2005.

- (142) Cox, J.; Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* **2008**, *26* (12), 1367–1372. DOI: 10.1038/nbt.1511. Published Online: Nov. 30, 2008.
- (143) McPherson, A.; Gavira, J. A. Introduction to protein crystallization. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications* **2014**, *70* (Pt 1), 2–20. DOI: 10.1107/S2053230X13033141. Published Online: Dec. 24, 2013.
- (144) McPherson, A. Introduction to protein crystallization. *Methods (San Diego, Calif.)* **2004**, *34* (3), 254–265. DOI: 10.1016/j.ymeth.2004.03.019.
- (145) McPherson, A.; Cudney, B. Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications* **2014**, *70* (Pt 11), 1445–1467. DOI: 10.1107/S2053230X14019670. Published Online: Oct. 31, 2014.
- (146) Wlodawer, A.; Minor, W.; Dauter, Z.; Jaskolski, M. Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. *The FEBS journal* **2013**, *280* (22), 5705–5736. DOI: 10.1111/febs.12495. Published Online: Sep. 18, 2013.
- (147) Gorrec, F. The MORPHEUS protein crystallization screen. *Journal of applied crystallography* **2009**, *42* (Pt 6), 1035–1042. DOI: 10.1107/S0021889809042022. Published Online: Nov. 7, 2009.
- (148) Holcomb, J.; Spellmon, N.; Zhang, Y.; Doughan, M.; Li, C.; Yang, Z. Protein crystallization: Eluding the bottleneck of X-ray crystallography. *AIMS biophysics* **2017**, *4* (4), 557–575. DOI: 10.3934/biophy.2017.4.557. Published Online: Sep. 26, 2017.
- (149) Cerajewski, U.; Träger, J.; Henkel, S.; Roos, A. H.; Brehm, M.; Hinderberger, D. Nanoscopic structures and molecular interactions leading to a dystectic and two eutectic points in EMI/Cl/urea mixtures. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2018**, *20* (47), 29591–29600. DOI: 10.1039/c8cp04912b.
- (150) Jana Eisermann. Colloid-like Ionic Clusters Structure Formation with Small Molecules through Weak Interactions in Solution. Dissertation, Martin Luther Universität, Halle, 2019.
- (151) Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2006**, *178* (1), 42–55. DOI: 10.1016/j.jmr.2005.08.013. Published Online: Sep. 26, 2005.
- (152) Kattnig, D. R.; Bund, T.; Boggs, J. M.; Harauz, G.; Hinderberger, D. Lateral self-assembly of 18.5-kDa myelin basic protein (MBP) charge component-C1 on

- membranes. *Biochimica et biophysica acta* **2012**, *1818* (11), 2636–2647. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.06.010. Published Online: Jun. 21, 2012.
- (153) Byler, D. M.; Susi, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* **1986**, *25* (3), 469–487. DOI: 10.1002/bip.360250307.
- (154) Kong, J.; Yu, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **2007**, *39* (8), 549–559. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x.
- (155) *The Infrared Spectra of Polypeptides in Various Conformations: Amide I and II Bands*, 1961.
- (156) Krimm, S. Infrared spectra and chain conformation of proteins. *Journal of molecular biology* **1962**, *4* (6), 528–540. DOI: 10.1016/S0022-2836(62)80107-7.
- (157) Haris, P. I.; Severcan, F. FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **1999**, *7* (1-4), 207–221. DOI: 10.1016/S1381-1177(99)00030-2.
- (158) Manning, M. C. Use of infrared spectroscopy to monitor protein structure and stability. *Expert review of proteomics* **2005**, *2* (5), 731–743. DOI: 10.1586/14789450.2.5.731.
- (159) Sarver, R. W.; Krueger, W. C. Protein secondary structure from fourier transform infrared spectroscopy: A data base analysis. *Analytical biochemistry* **1991**, *194* (1), 89–100. DOI: 10.1016/0003-2697(91)90155-M.
- (160) Teixeira, J. Small-angle scattering by fractal systems. *Journal of applied crystallography* **1988**, *21* (6), 781–785. DOI: 10.1107/S0021889888000263.
- (161) Justice, R. S.; Wang, D. H.; Tan, L.-S.; Schaefer, D. W. Simplified tube form factor for analysis of small-angle scattering data from carbon nanotube filled systems. *Journal of applied crystallography* **2007**, *40* (s1), s88-s92. DOI: 10.1107/S0021889807004153.
- (162) Pelton, J. T.; McLean, L. R. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Analytical biochemistry* **2000**, *277* (2), 167–176. DOI: 10.1006/abio.1999.4320.
- (163) Berliner, L. J.; Reuben, J., Eds. *Spin Labeling*; Biological Magnetic Resonance; Springer US, 1989. DOI: 10.1007/978-1-4613-0743-3.
- (164) Jörg Reichenwallner. Spinlabeling Protokoll Albumin. Protokoll, Martin Luther Universität, Halle, 2017.
- (165) Schneider, D. J.; Freed, J. H. Calculating Slow Motional Magnetic Resonance Spectra. In *Spin Labeling*; Berliner, L. J., Reuben, J., Eds.; Biological Magnetic Resonance; Springer US, 1989; pp 1–76. DOI: 10.1007/978-1-4613-0743-3_1.

- (166) Lauth, L. M.; Voigt, B.; Bhatia, T.; Machner, L.; Balbach, J.; Ott, M. Heparin promotes rapid fibrillation of the basic parathyroid hormone at physiological pH. *FEBS letters* **2022**. DOI: 10.1002/1873-3468.14455. Published Online: Jul. 28, 2022.
- (167) Moscarello, M. A. Myelin Basic Protein, the “Executive” Molecule of the Myelin Membrane. In *Cell Biology and Pathology of Myelin*; Juurlink, B. H. J., Devon, R. M., Doucette, J. R., Nazarali, A. J., Schreyer, D. J., Verge, V. M. K., Eds.; Springer US, 1997; pp 13–25. DOI: 10.1007/978-1-4615-5949-8_2.
- (168) Moscarello, M. A.; Wood, D. D.; Ackerley, C.; Boulias, C. Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. *The Journal of clinical investigation* **1994**, *94* (1), 146–154. DOI: 10.1172/JCI117300.
- (169) Kattnig, D. R.; Hinderberger, D. Temperature-dependent formation and transformation of mesostructures in water-ionic liquid mixtures. *Chemistry, an Asian journal* **2012**, *7* (5), 1000–1008. DOI: 10.1002/asia.201101040. Published Online: Mar. 15, 2012.
- (170) Da Gonçalves Silva, A. M. P. S. Interaction of Hydrophobic Ionic Liquids with Lipids in Langmuir Monolayers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2018**, *34* (13), 3797–3805. DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b04164. Published Online: Mar. 20, 2018.

Anhang

Anhang Kapitel 3.1

Anhang 3.1.1.2

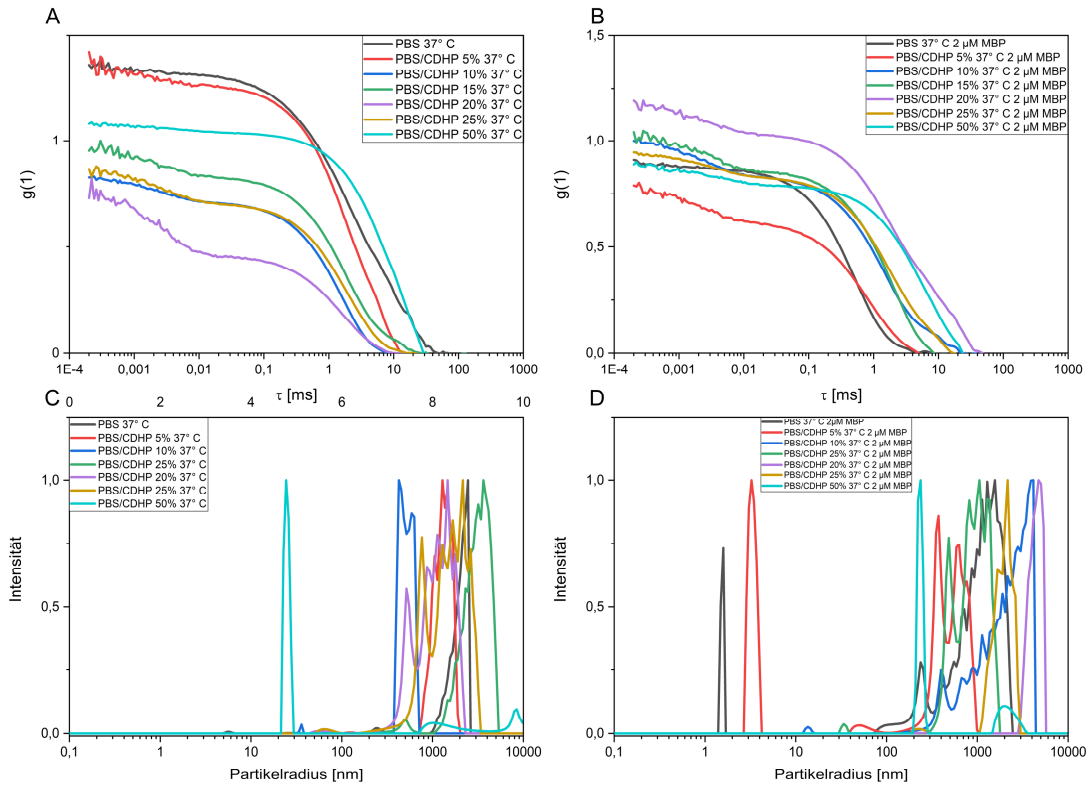


Abbildung 57 Ergebnisse Seitwärtsstreuung A: Autokorrelation PBS/CDHP ohne Protein B: Autokorrelationsfunktionen PBS/CDHP mit 2 μM MBP C: Partikelgrößenverteilung PBS/CDHP ohne Protein D: Partikelgrößenverteilung PBS/CDHP mit 2 μM MBP

Anhang 3.1.2.2

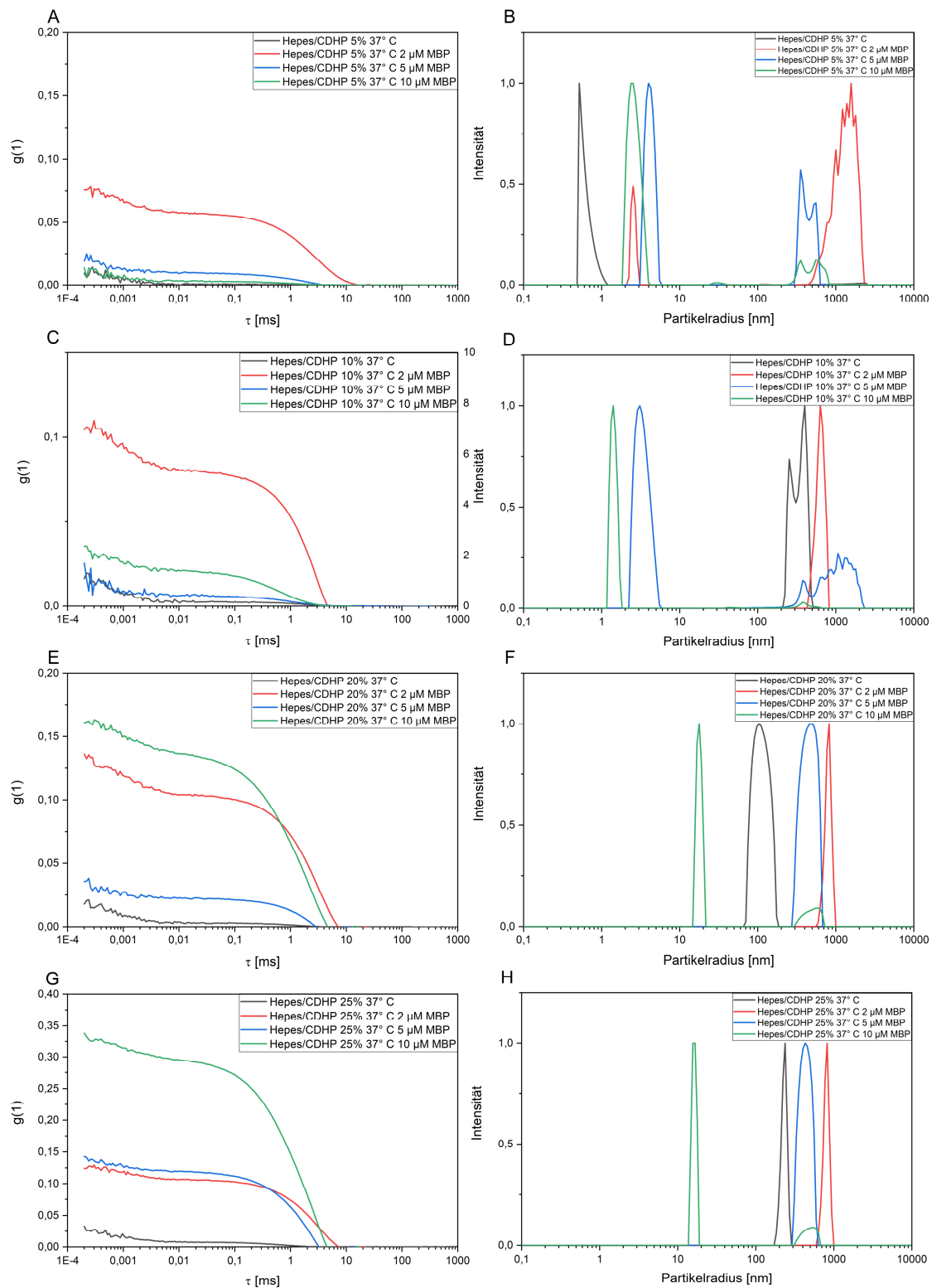


Abbildung 58 Ergebnisse Rückwärtsstreuung A: Autokorrelation HEPES/CDHP 5% B: Partikelgrößenverteilung HEPES/CDHP 5% C: Autokorrelation HEPES/CDHP 10% D: Partikelgrößenverteilung HEPES/CDHP 10% E: Autokorrelation HEPES/CDHP 20% F: Partikelgrößenverteilung HEPES/CDHP 20% G: Autokorrelation HEPES/CDHP 25% H: Partikelgrößenverteilung HEPES/CDHP 25%

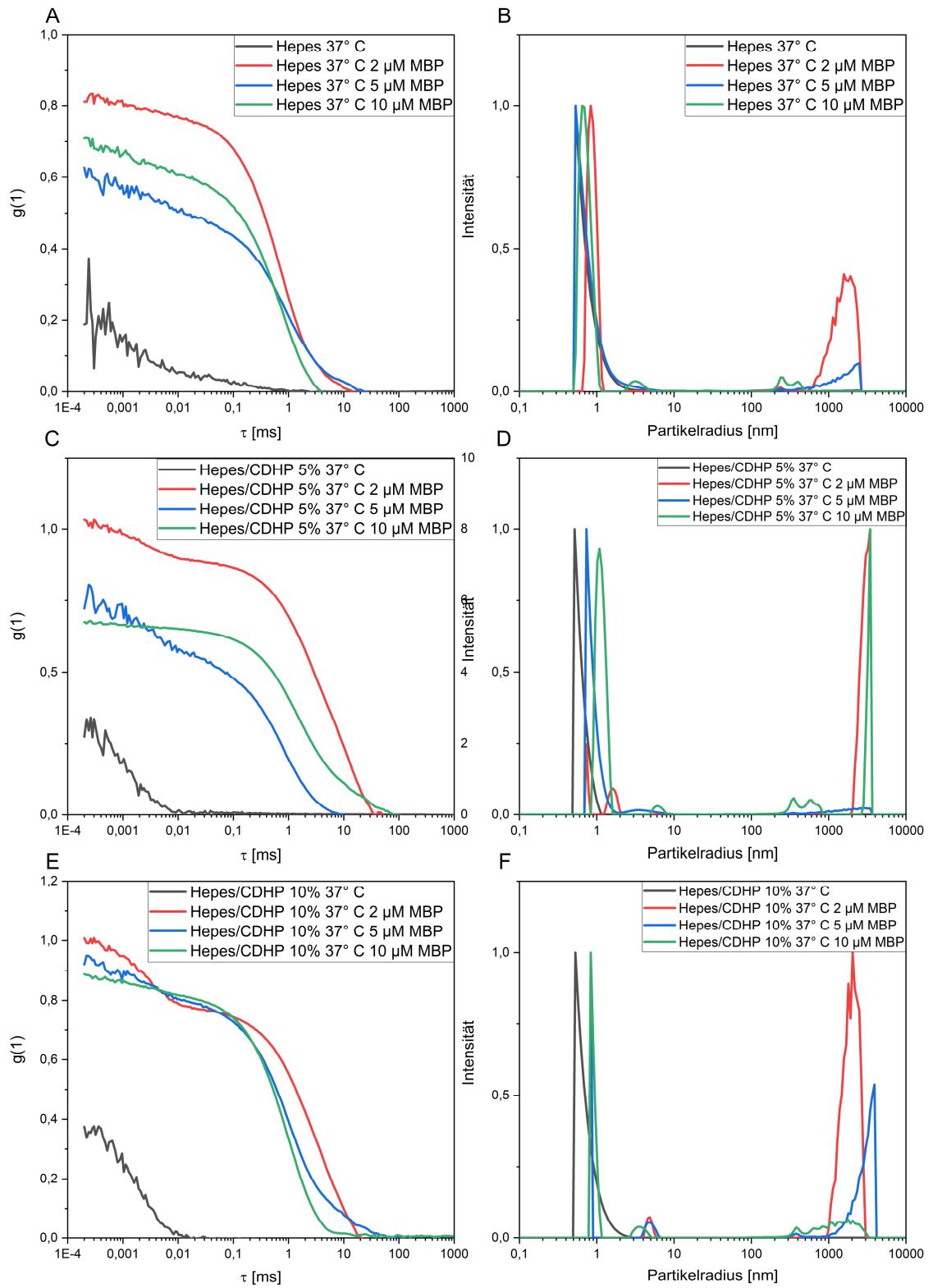


Abbildung 59 Ergebnisse Seitwärtsstreuung A: Autokorrelation HEPES B: Partikelgrößenverteilung HEPES C: Autokorrelation HEPES/CDHP 5% D: Partikelgrößenverteilung HEPES/CDHP 5% E: Autokorrelation HEPES/CDHP 10% F: Partikelgrößenverteilung HEPES/CDHP 10%

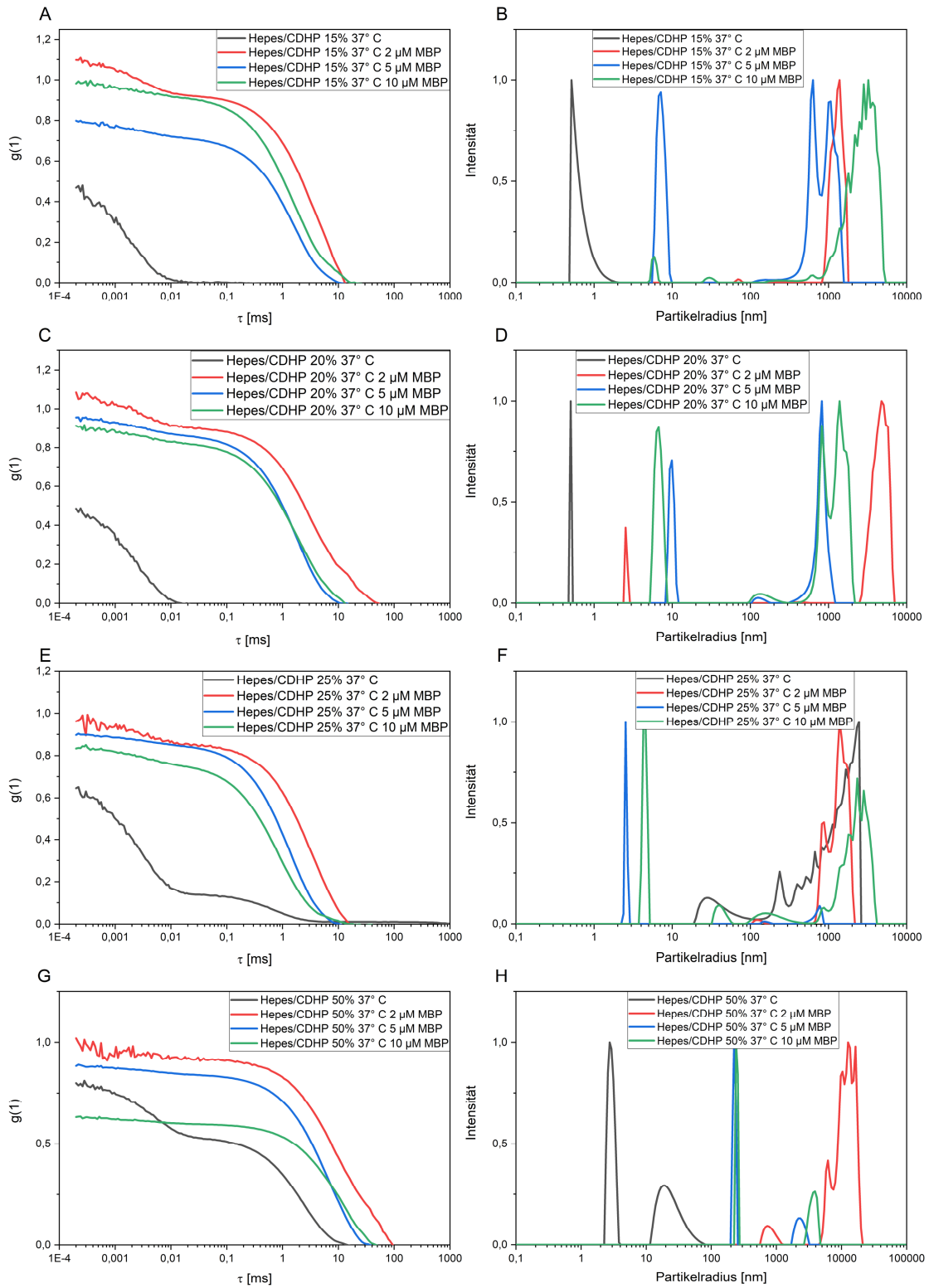


Abbildung 60 Ergebnisse Seitwärtsstreuung
 Partikelgrößenverteilung HEPES/CDHP 15%
 Partikelgrößenverteilung HEPES/CDHP 20%
 Partikelgrößenverteilung HEPES/CDHP 25%
 Partikelgrößenverteilung HEPES/CDHP 50%

A: Autokorrelation HEPES/CDHP 15% B:
 C: Autokorrelation HEPES/CDHP 20% D:
 E: Autokorrelation HEPES/CDHP 25% F:
 G: Autokorrelation HEPES/CDHP 50% H:

Anhang Kapitel 3.2

Tabelle 22 Ergebnisse Massenspektrometrie rmMBP C1WT

SEQUENZEN	PROTEIN	START POSI- TION	END POSI- TION
SKYLATASTMDHAR	MBP_C1_WT	10	23
YLATASTMDHAR	MBP_C1_WT	12	23
HRDTGILDSIGR	MBP_C1_WT	30	41
HRDTGILDSIGRFFSGDR	MBP_C1_WT	30	47
DTGILDSIGR	MBP_C1_WT	32	41
DTGILDSIGRFFSGDR	MBP_C1_WT	32	47
DTGILDSIGRFFSGDRGAPK	MBP_C1_WT	32	51
FFSGDRGAPK	MBP_C1_WT	42	51
FFSGDRGAPKR	MBP_C1_WT	42	52
RSGKDSHTR	MBP_C1_WT	52	61
GSGKDSHTRTTHYGSLPQK	MBP_C1_WT	53	71
DSHTRTTHYGSLPQK	MBP_C1_WT	57	71
TTHYGSLPQK	MBP_C1_WT	62	71
TTHYGSLPQKSQHGR	MBP_C1_WT	62	76
SQHGRQTQDENPVVHFFK	MBP_C1_WT	72	88
SQHGRQTQDENPVVHFFKNIIVTPR	MBP_C1_WT	72	94
TQDENPVVHFFK	MBP_C1_WT	77	88
TQDENPVVHFFKNIIVTPR	MBP_C1_WT	77	94
TQDENPVVHFFKNIIVTPRT- PPPSQGK	MBP_C1_WT	77	102
NIVTPRTPPPSQGK	MBP_C1_WT	89	102
NIVTPRTPPPSQGKGR	MBP_C1_WT	89	104
TPPPSQGK	MBP_C1_WT	95	102
TPPPSQGKGRGLSLSR	MBP_C1_WT	95	110
GRGLSLSR	MBP_C1_WT	103	110
FSWGAEGQK	MBP_C1_WT	111	119
FSWGAEGQKPGFGGYGGR	MBP_C1_WT	111	128
PGFGGYGGR	MBP_C1_WT	120	128
ASDYKSAHKGFK	MBP_C1_WT	129	140
SAHKGFKGAYDAQGTLISK	MBP_C1_WT	134	151
GFKGAYDAQGTLISK	MBP_C1_WT	138	151
GAYDAQGTLISK	MBP_C1_WT	141	151

SEQUENZEN	PROTEIN	START POSI- TION	END POSI- TION
GAYDAQGTLISKIFK	MBP_C1_WT	141	154
IFKLGGR	MBP_C1_WT	152	158
IFKLGGRDSR	MBP_C1_WT	152	161
LGGRDSR	MBP_C1_WT	155	161
SGSPMAR	MBP_C1_WT	162	168

Tabelle 23 Ergebnisse Massenspektrometrie rmMBP C1S17CH85C

SEQUENZEN	PROTEIN	START POSI- TION	END POSI- TION
SKYLATACTMDHAR	MBP_C1_S17CH85C	10	23
YLATACTMDHAR	MBP_C1_S17CH85C	12	23
HRDTGILDSIGR	MBP_C1_S17CH85C	30	41
HRDTGILDSIGRFFSGDR	MBP_C1_S17CH85C	30	47
DTGILDSIGR	MBP_C1_S17CH85C	32	41
DTGILDSIGRFFSGDR	MBP_C1_S17CH85C	32	47
DTGILDSIGRFFSGDRGAPK	MBP_C1_S17CH85C	32	51
FFSGDRGAPK	MBP_C1_S17CH85C	42	51
TTHYGSLPQK	MBP_C1_S17CH85C	62	71
TTHYGSLPQKSQHGR	MBP_C1_S17CH85C	62	76
TQDENPVVCFK	MBP_C1_S17CH85C	77	88
TQDENPVVHFFKNIVTPR	MBP_C1_S17CH85C	77	94
NIVTPRTPPPSQGK	MBP_C1_S17CH85C	89	102
TPPPSQGKGRGLSLSR	MBP_C1_S17CH85C	95	110
GRGLSLSR	MBP_C1_S17CH85C	103	110
FSWGAEGQKPGFG- GYGGR	MBP_C1_S17CH85C	111	128
PGFGGYGGR	MBP_C1_S17CH85C	120	128
SAHKGFKGAYDAQGTLISK	MBP_C1_S17CH85C	134	151
GFKGAYDAQGTLISK	MBP_C1_S17CH85C	138	151
GAYDAQGTLISK	MBP_C1_S17CH85C	141	151
IFKLGGR	MBP_C1_S17CH85C	152	158
IFKLGGRDSR	MBP_C1_S17CH85C	152	161

Anhang Kapitel 3.3

Anhang Kapitel 3.3.1

Tabelle 24 Ergebnisse Temperaturserie Brechungsindex BMIm 5-100 %

PROBE- NAME	20° C	25° C	30° C	35° C	37° C
BMIM 5	1,33839	1,33768	1,33693	1,33614	1,33578
BMIM 10	1,34314	1,34243	1,34168	1,34089	1,34053
BMIM 15	1,34790	1,34710	1,34626	1,34536	1,34502
BMIM 20	1,35238	1,35147	1,35054	1,34956	1,34935
BMIM 25	1,3565	1,35559	1,35462	1,35360	1,35337
BMIM 30	1,36188	1,36082	1,35975	1,35865	1,35840
BMIM 35	1,36648	1,36538	1,36424	1,36302	1,36292
BMIM 40	1,36881	1,36745	1,36637	1,36525	1,36482
BMIM 55	1,38816	1,38691	1,38567	1,38438	1,38399
BMIM 60	1,38798	1,38680	1,38546	1,38400	1,38399
BMIM 65	1,39222	1,39091	1,38964	1,38836	1,38806
BMIM 70	1,39521	1,39389	1,39254	1,39120	1,39114
BMIM 75	1,39677	1,39548	1,39440	1,39305	1,39251
BMIM 80	1,39945	1,39822	1,39691	1,39568	1,39527
BMIM 85	1,40245	1,40111	1,39983	1,39851	1,39806
BMIM 90	1,41175	1,41047	1,40917	1,40786	1,40734
BMIM 95	1,41564	1,41435	1,41304	1,41175	1,41125
BMIM 100	1,42256	1,42128	1,42001	1,41872	1,41819

Tabelle 25 Ergebnisse Temperaturserie Viskosität BMIm 5-100 %

PROBE	VISKOSI- TÄT 20° C [PA*S]	VISKOSI- TÄT 25° C [PA*S]	VISKOSI- TÄT 30° C [PA*S]	VISKOSI- TÄT 35° C [PA*S]	VISKOSI- TÄT 37° C [PA*S]
BMIM 5	0,0010641	0,0009367	0,0007337	0,0006312	0,0006300
BMIM 10	0,0011222	0,0009827	0,0007826	0,0006872	0,0006433
BMIM 15	0,0011819	0,0010013	0,0008611	0,0007432	0,0007108
BMIM 20	0,0012406	0,0010723	0,0008935	0,0007889	0,0007677
BMIM 25	0,0013018	0,0011000	0,0009687	0,0009111	0,0009015
BMIM 30	0,0013581	0,0011030	0,0009723	0,0009147	0,0008907
BMIM 35	0,0014825	0,0012008	0,0011282	0,0010178	0,0009567

PROBE	VISKOSI-TÄT 20° C [PA*S]	VISKOSI-TÄT 25° C [PA*S]	VISKOSI-TÄT 30° C [PA*S]	VISKOSI-TÄT 35° C [PA*S]	VISKOSI-TÄT 37° C [PA*S]
BMIM 40	0,0015816	0,0013603	0,0011551	0,0010324	0,0009723
BMIM 55	0,0027555	0,0023857	0,0021471	0,0019465	0,0019357
BMIM 60	0,0033015	0,0028852	0,0026268	0,0025215	0,0024802
BMIM 65	0,0040128	0,0035323	0,0032573	0,0031881	0,0030521
BMIM 70	0,0053846	0,0050025	0,0048087	0,0047953	0,0047410
BMIM 75	0,0072251	0,0070630	0,0068420	0,0065969	0,0063851
BMIM 80	0,0091624	0,0088405	0,0084007	0,0080297	0,0080043
BMIM 85	0,0095105	0,0094206	0,0092638	0,0089933	0,0082248
BMIM 90	0,0181692	0,0162589	0,0146153	0,0133615	0,0132769
BMIM 95	0,0287538	0,0251820	0,0219128	0,0193435	0,0187615
BMIM 100	0,1209487	0,0929692	0,0744641	0,0592225	0,0543102

Anhang Kapitel 3.3.2

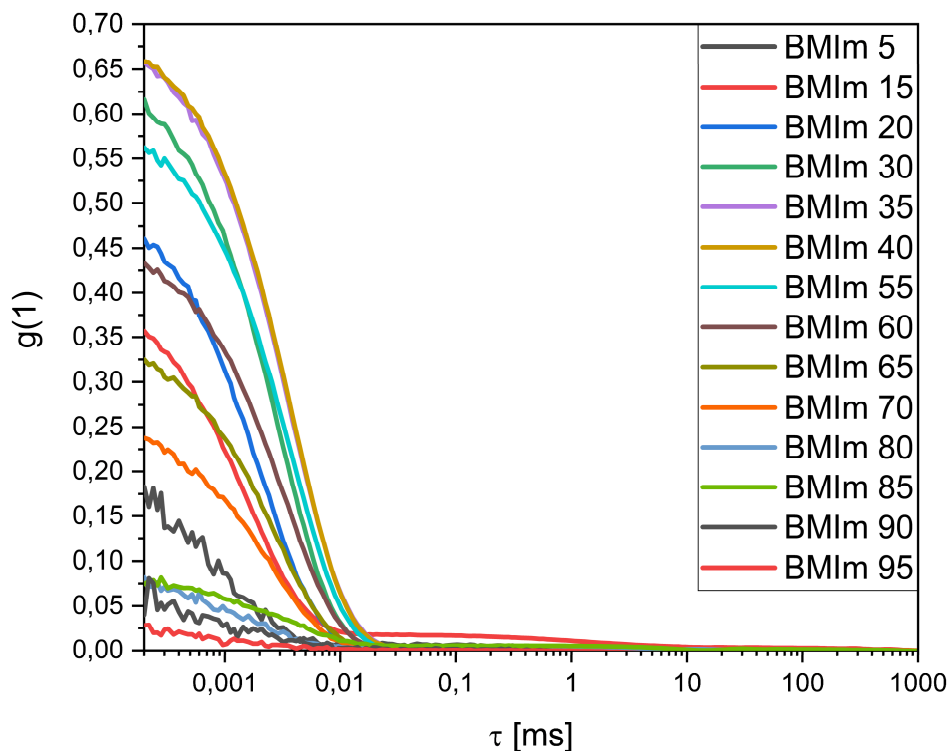


Abbildung 61 Autokorrelationsfunktionen der Rückwärtsstreuung von BMIm 5 bis 95

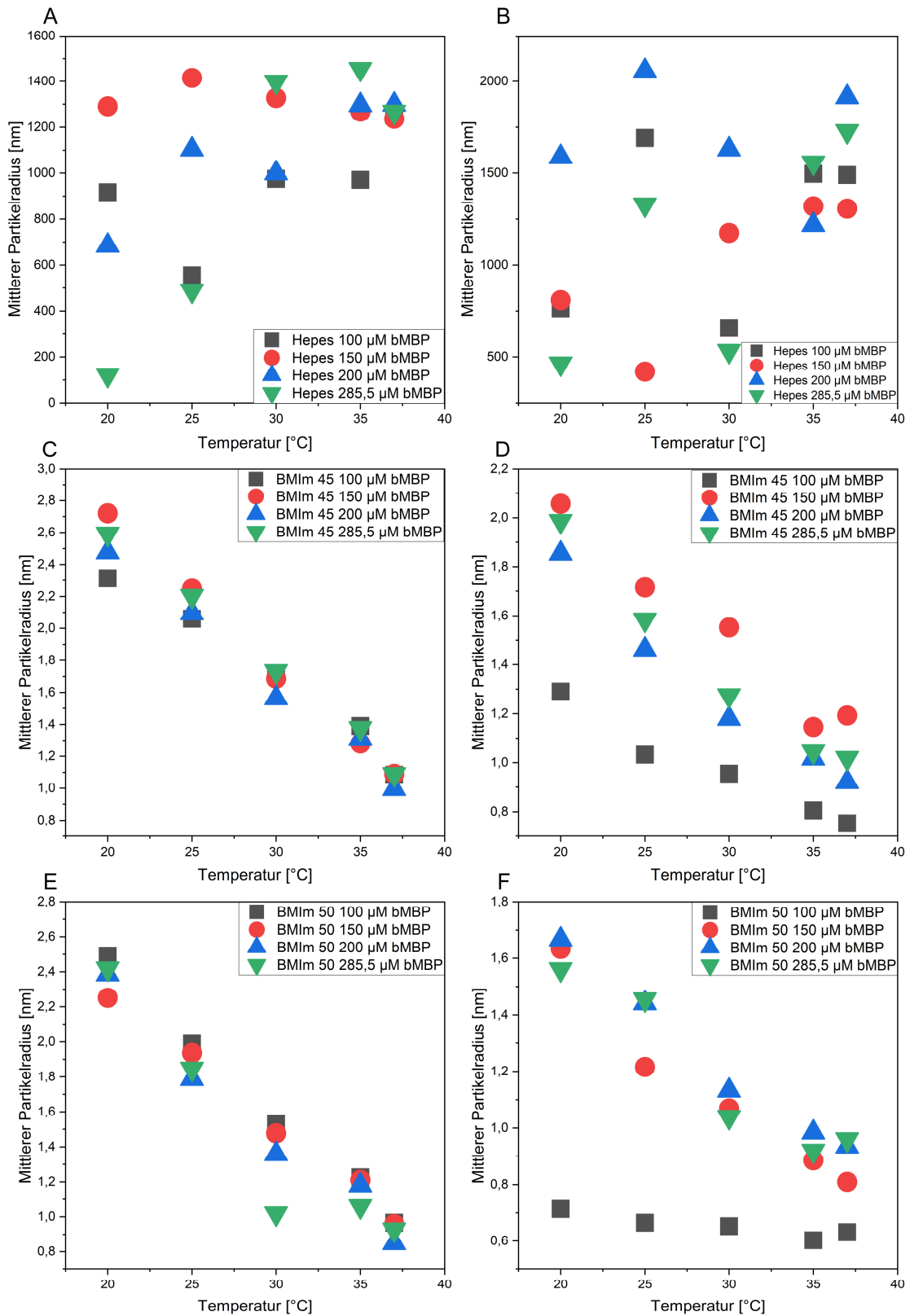


Abbildung 62 Ergebnisse dynamische Lichtstreuung für unterschiedliche bMBP Konzentrationen A: Seitwärtstreuung von bMBP in HEPES B: Rückwärtstreuung von bMBP in HEPES C: Seitwärtstreuung von bMBP in BMIm 45 D: Rückwärtstreuung von bMBP in BMIm 45 E: Seitwärtstreuung von bMBP in BMIm 50 F: Rückwärtstreuung von bMBP in BMIm 50

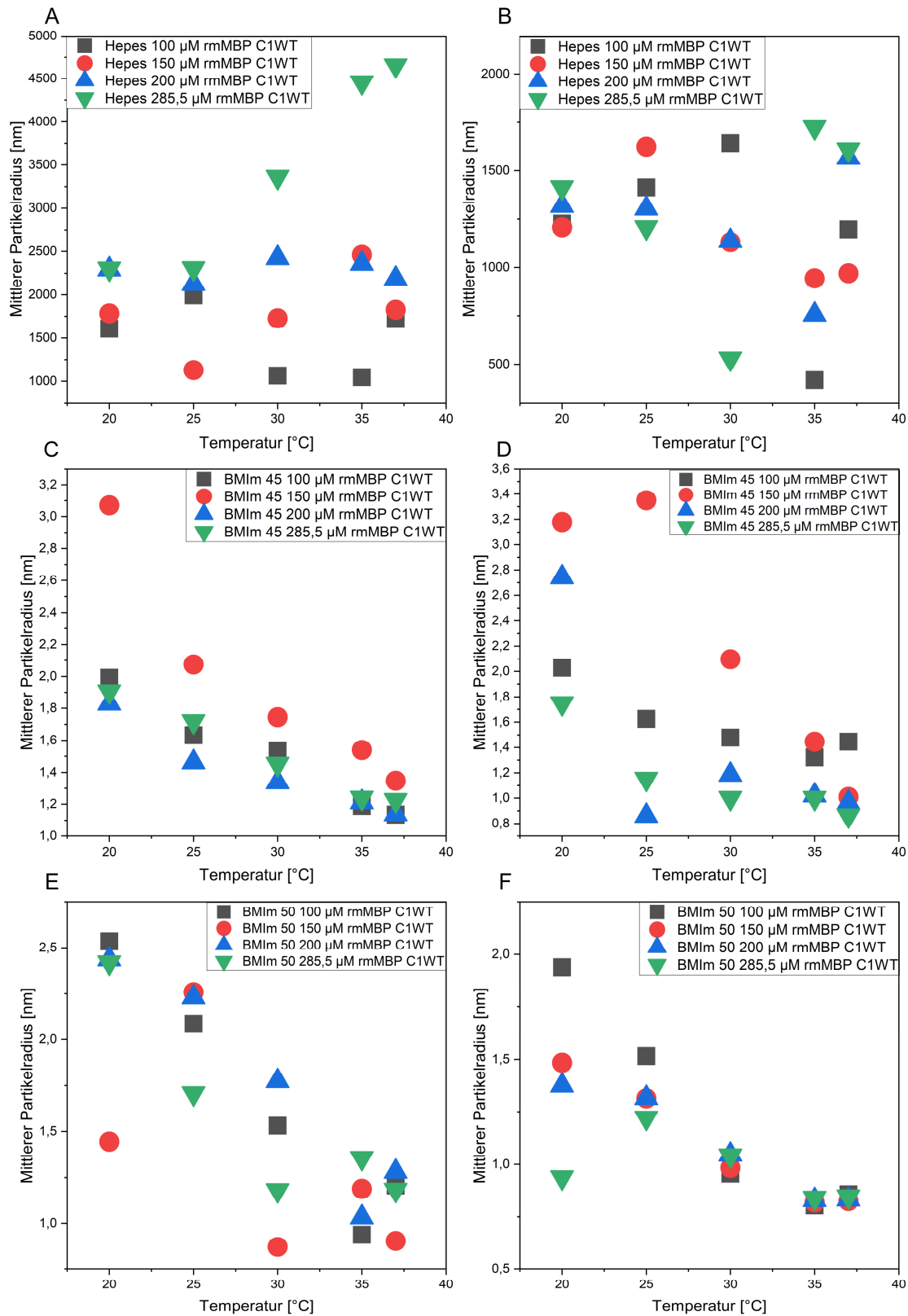


Abbildung 63 Ergebnisse dynamische Lichtstreuung für unterschiedliche C1WT Konzentrationen A: Seitwärtstreuung von C1WT in HEPES B: Rückwärtstreuung von C1WT in HEPES C: Seitwärtstreuung von C1WT in BMIm 45 D: Rückwärtstreuung von C1WT in BMIm 45 E: Seitwärtstreuung von C1WT in BMIm 50 F: Rückwärtstreuung von C1WT in BMIm 50

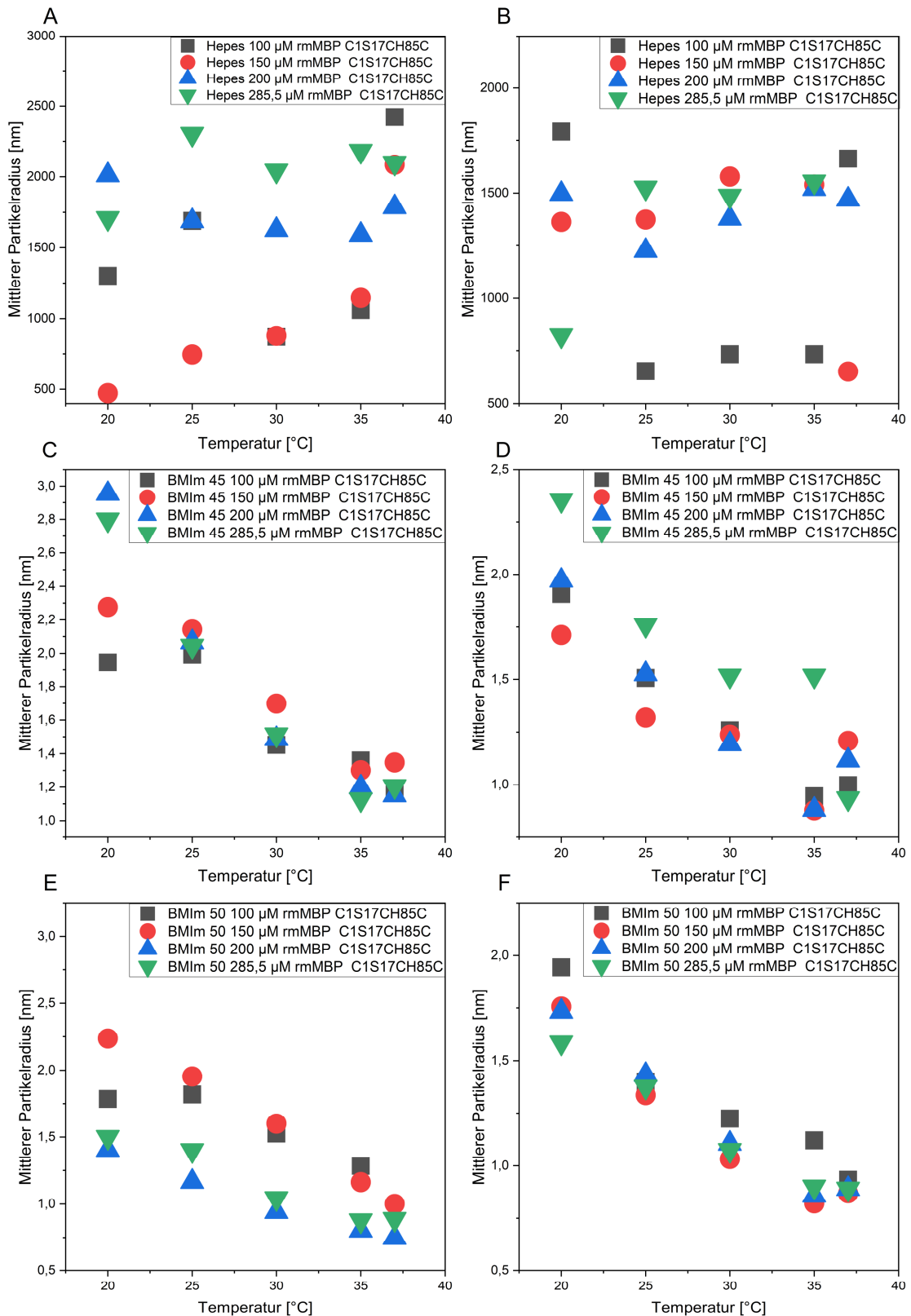


Abbildung 64 Ergebnisse dynamische Lichtstreuung für unterschiedliche C1S17CH85C Konzentrationen A: Seitwärtstreuung von C1S17CH85C in HEPES B: Rückwärtstreuung von C1S17CH85C in HEPES C: Seitwärtstreuung von C1S17CH85C in BmIm 45 D: Rückwärtstreuung von C1S17CH85C in BmIm 45 E: Seitwärtstreuung von C1S17CH85C in BmIm 50 F: Rückwärtstreuung von C1S17CH85C in BmIm 50

Anhang Kapitel 3.3.3

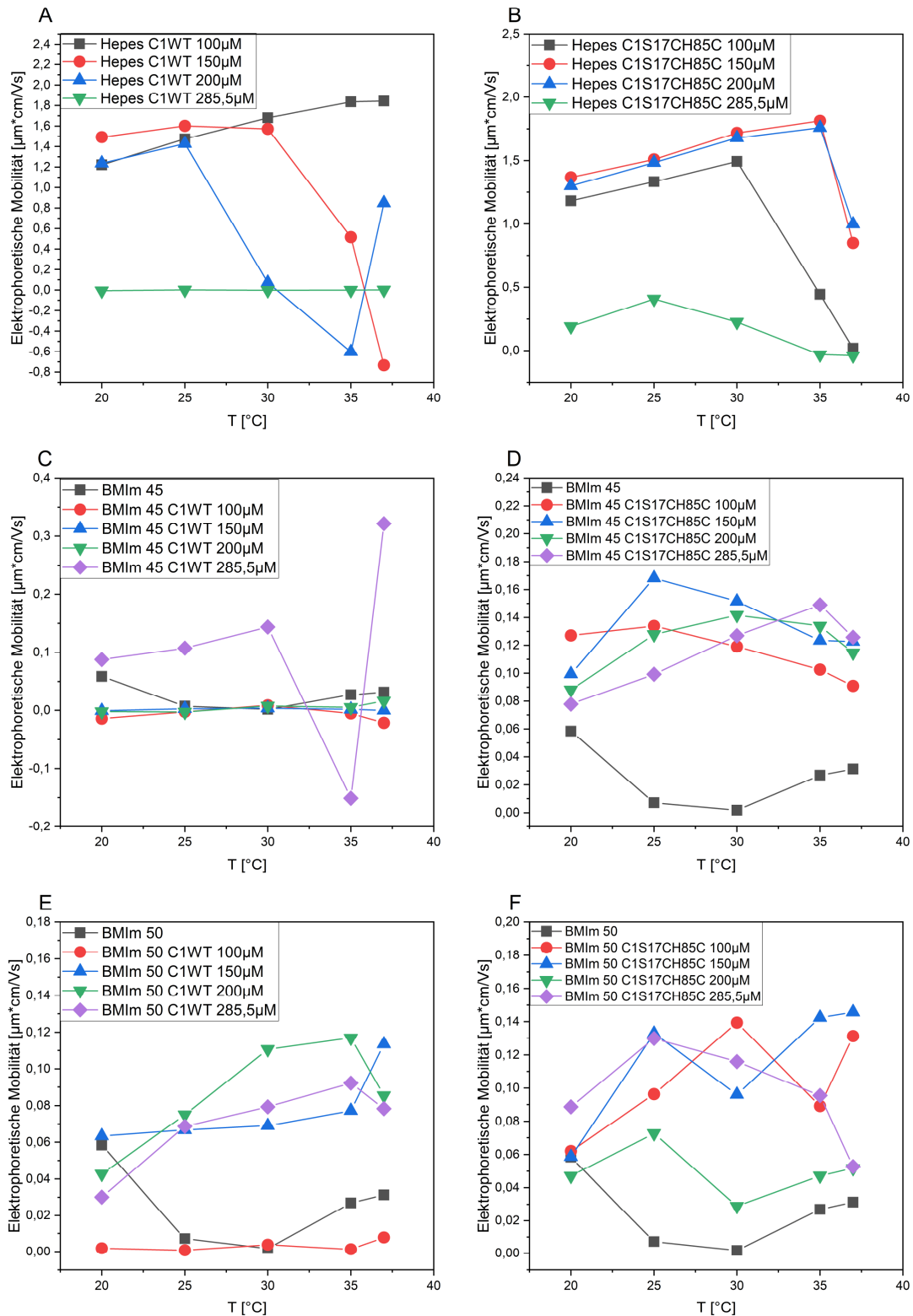


Abbildung 65 Elektrophoretische Mobilität in Abhängigkeit der Temperatur für C1WT und C1S17Ch85C A: C1WT in HEPES-Puffer B: C1S17CH85C in HEPES-Puffer C: C1WT in BMIm 45 D: C1S17CH85C in BMIm 45 E: C1WT in BMIm 50 F: C1S17CH85C in BMIm 50

Anhang Kapitel 3.3.4

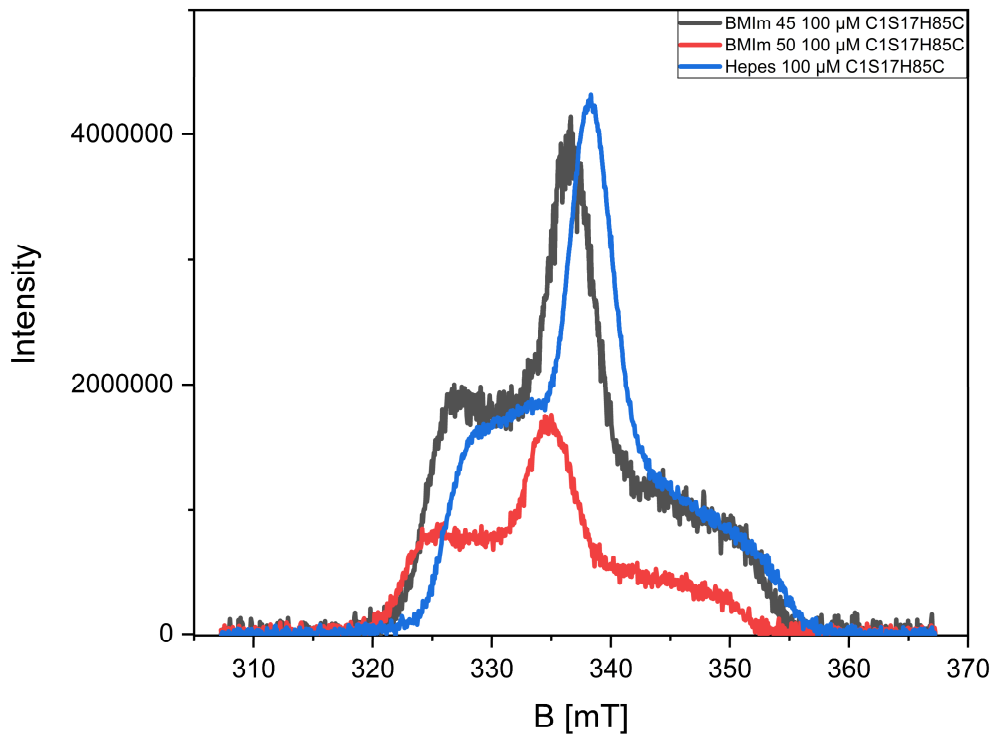


Abbildung 66 Ergebnisse des Hahn-Echo-Experiments zur Bestimmung der Pumpfrequenz für die DEER-Messungen

Validierungsparameter DEER-Analysis

Tabelle 26 Validierungsparameter Deer Analysis

Parameter	Min.	Max.	Versuchsanzahl
White noise	0,02	1,50	10
Background start	240	1000	10
Background dim.	2,80	3,20	5
Background density	1,50	2,30	5
Modulation depth	0,175	0,260	5

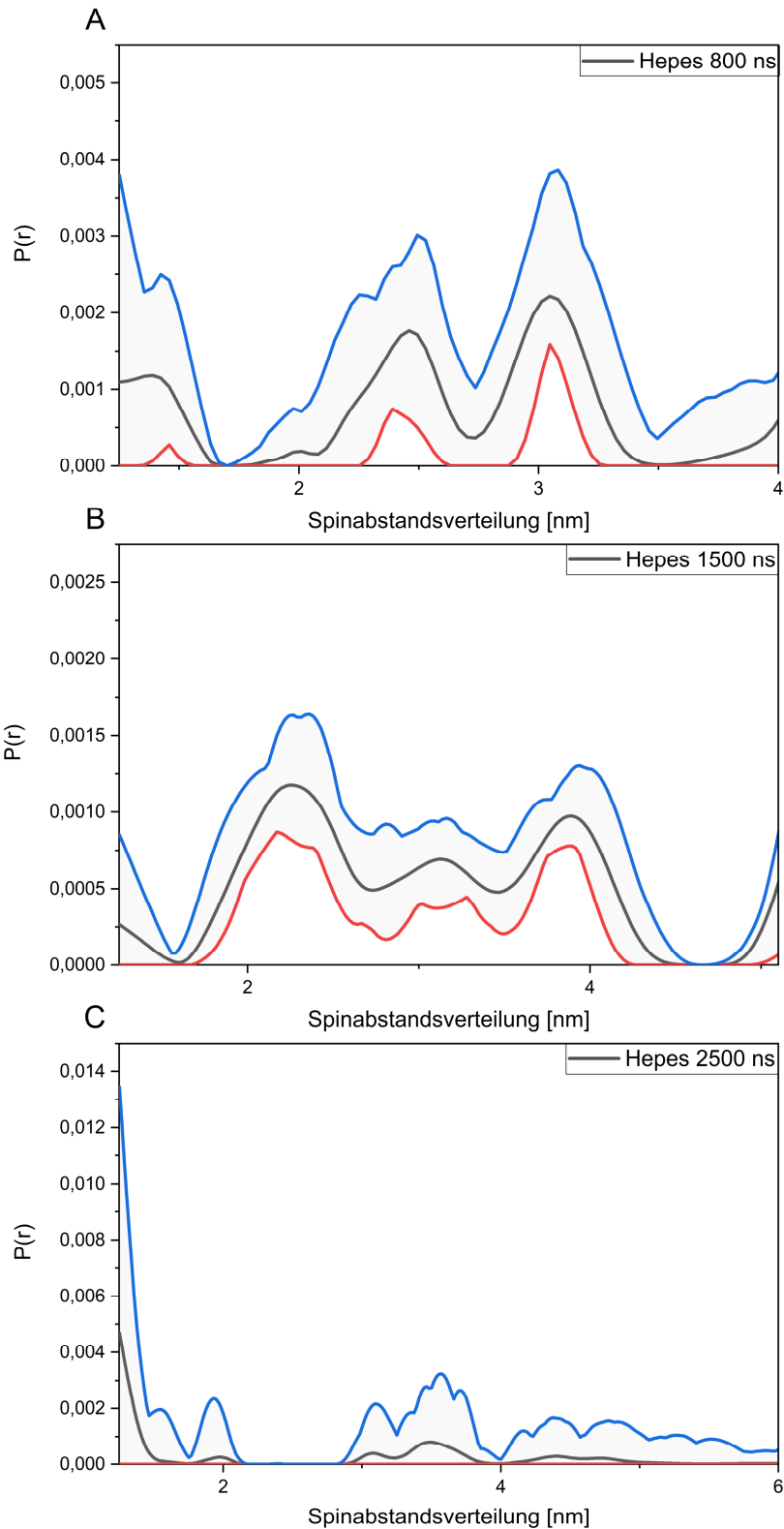


Abbildung 67 Validierung der DEER-Ergebnisse Validierung nach Parametern in Tabelle 26. Die schwarze Kurve entspricht dabei der Manuellen Auswertung die untere Grenze (rot) und die obere Grenze (blau) ergeben sich aus der Validierung des Programms. A: zeigt die Validierung von HEPES mit 800 ns Messzeit, B: zeigt die Validierung von HEPES bei 1500 ns Messzeit und C: zeigt die Validierung von HEPES bei 2500 ns Messzeit.

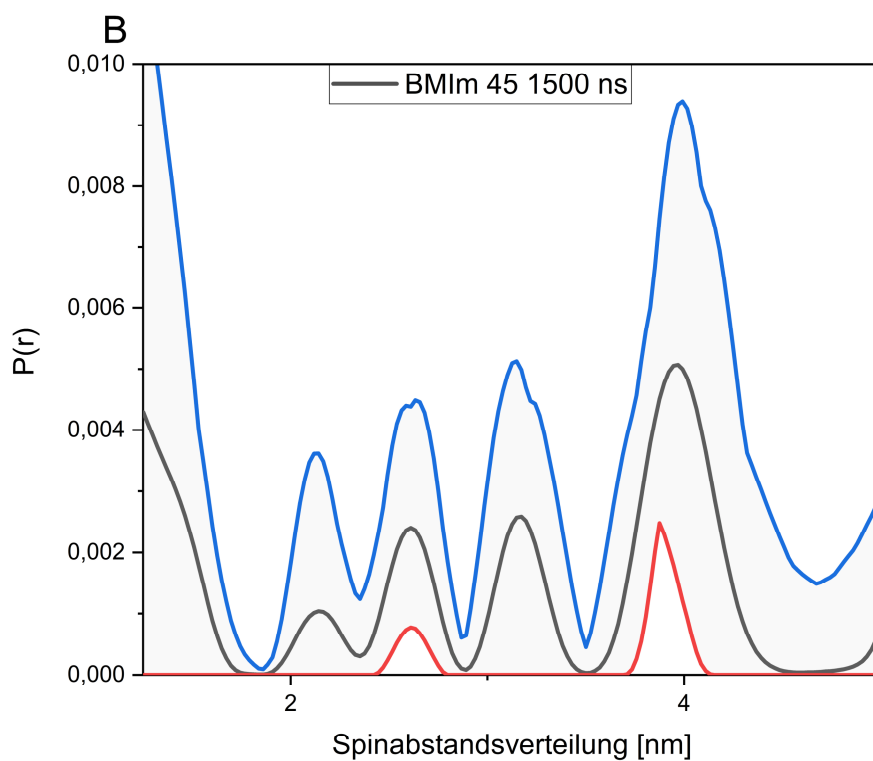
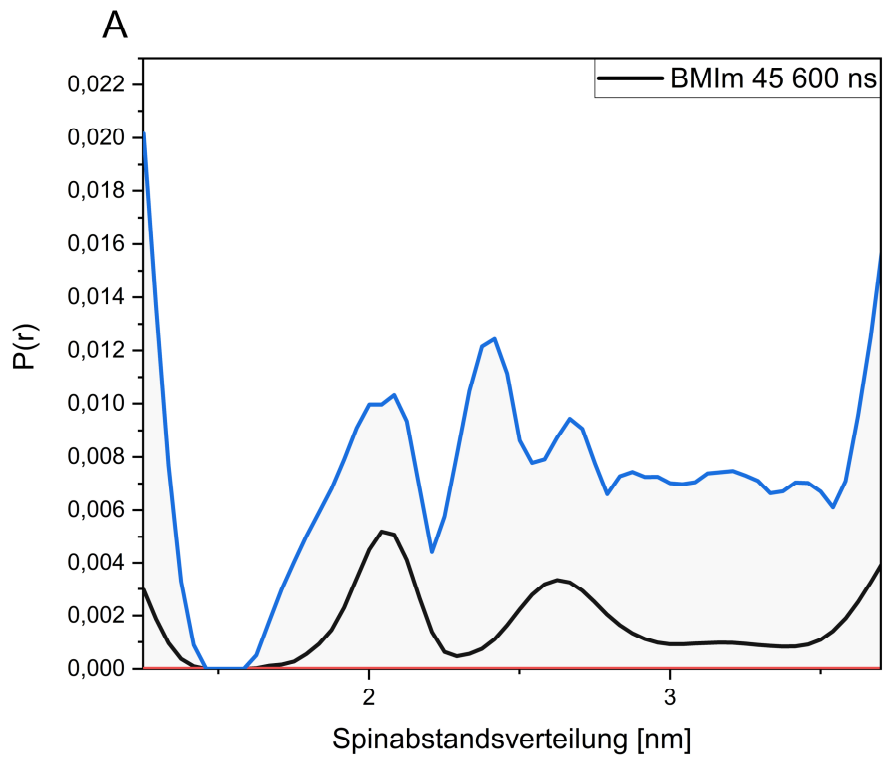


Abbildung 68 Validierung der DEER-Ergebnisse Validierung nach Parametern in Tabelle 26. Die schwarze Kurve entspricht dabei der Manuellen Auswertung die untere Grenze (rot) und die obere Grenze (blau) ergeben sich aus der Validierung des Programms. A: zeigt die Validierung von BMIm 45 mit 800 ns Messzeit, B: zeigt die Validierung von BMIm 45 bei 1500 ns Messzeit.

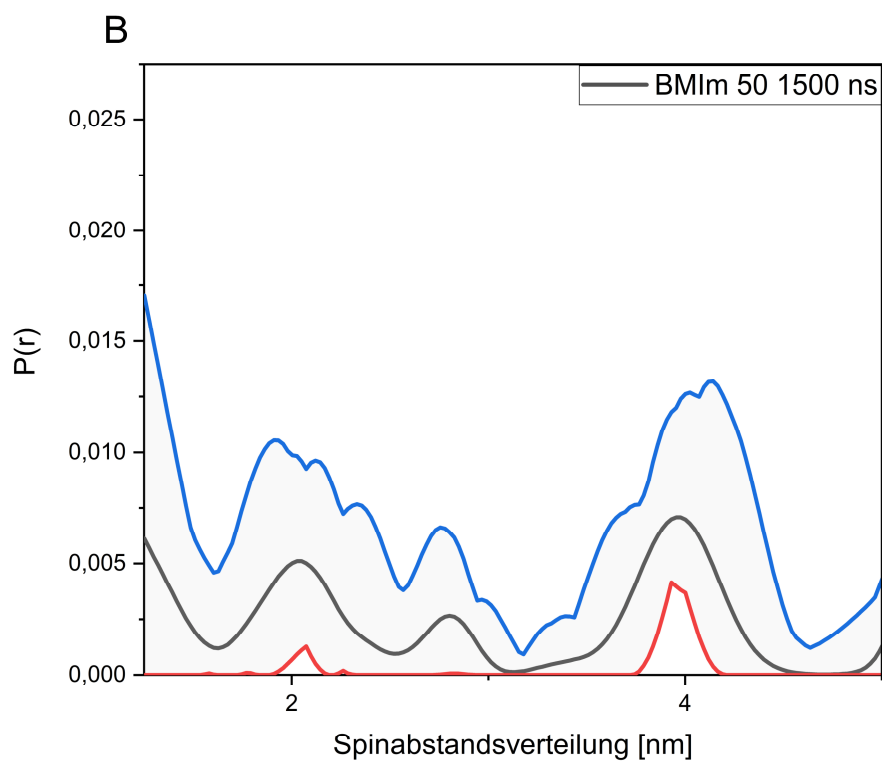
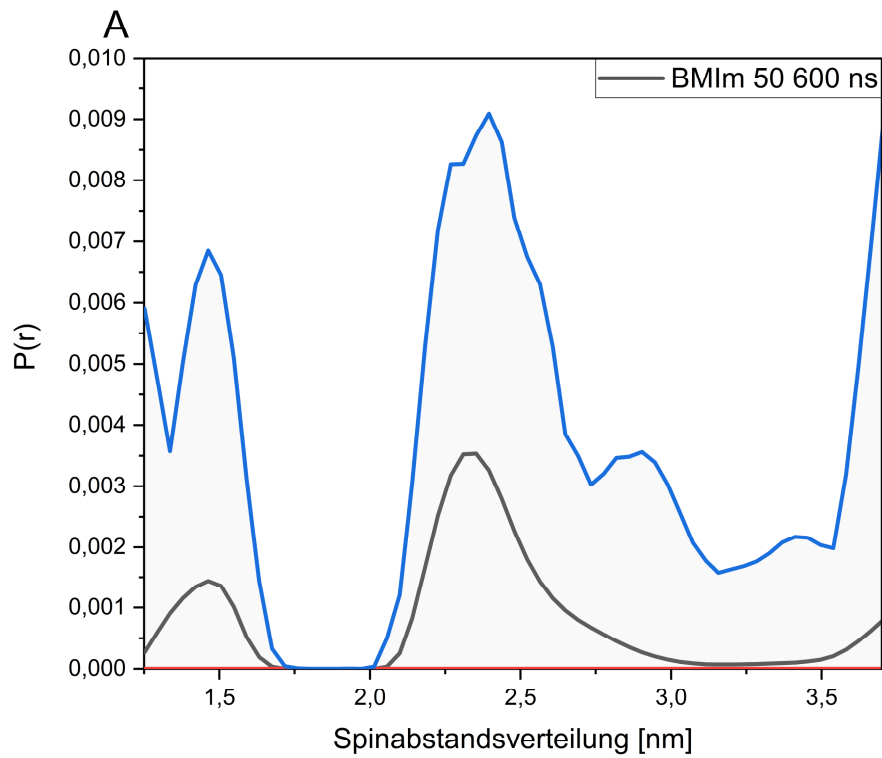


Abbildung 69 Validierung der DEER-Ergebnisse Validierung nach Parametern in Tabelle 26. Die schwarze Kurve entspricht dabei der Manuellen Auswertung die untere Grenze (rot) und die obere Grenze (blau) ergeben sich aus der Validierung des Programms. A: zeigt die Validierung von BMIm 50 mit 800 ns Messzeit, B: zeigt die Validierung von BMIm 50 bei 1500 ns Messzeit.

Anhang Kapitel 3.3.6

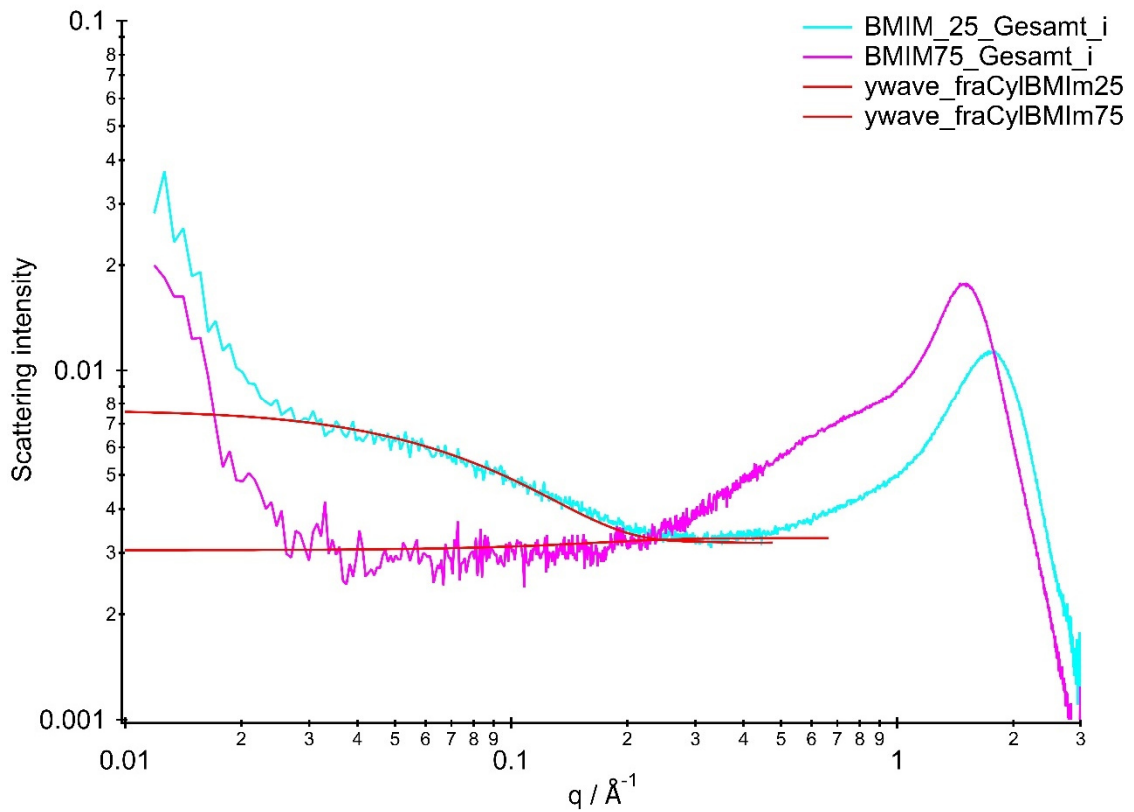


Abbildung 70 Ergebnisse SAXS BMIm 25 und BMIm 75

Tabelle 27 Ergebnisse SAXS BMIm 25 und BMIm 75

BMIM	VOLUMEN FRAKTION	FRAKTAL DIMENSION	KORRELATIONS LÄNGE [Å]	ZYLINDER RADIUS [Å]	ZYLINDER LÄNGE [Å]
25	0,00005347	1,00088	24,494	16,77	17,084
75	0,00000736	1,00088	2,4464	16,77	17,084

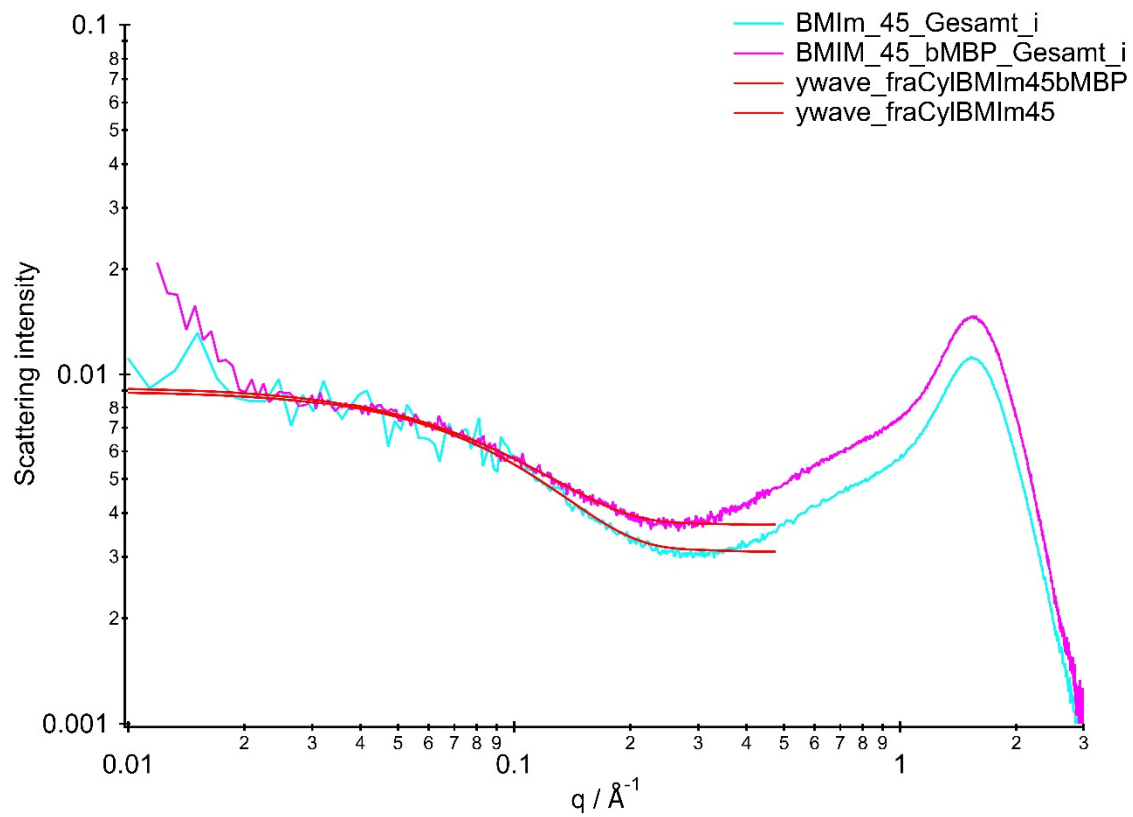


Abbildung 71 Ergebnisse SAXS BMIm 45 und BMIm 45 mit bMBP

Tabelle 28 Ergebnisse SAXS BMIm 45 und BMIm 45 mit bMBP

BMIM	VOLUMEN FRAKTION	FRAKTAL DIMENSION	KORRELATIONS LÄNGE [Å]	ZYLINDER RADIUS [Å]	ZYLINDER LÄNGE [Å]
45	0,00007199	1,00088	29,9953	16,77	17,084
45 + BMBP	0,00006621	1,00088	19,1856	16,77	17,084

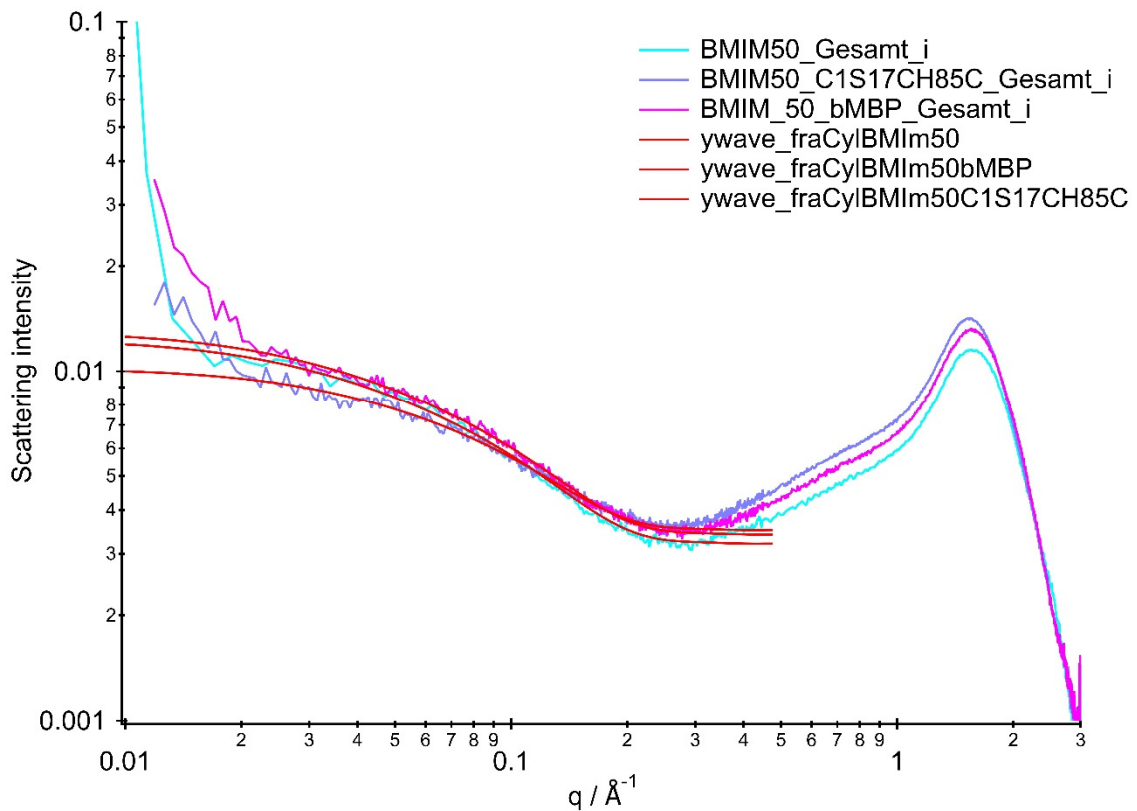


Abbildung 72 Ergebnisse SAXS BMIm 50, BMIm 50 mit bMBP und BMIm mit C1S17CH85C

Tabelle 29 Ergebnisse SAXS BMIm 50, BMIm 50 mit bMBP und BMIm mit C1S17CH85C

BMIM	VOLUMEN FRAKTION	FRAKTAL DIMENSION	KORRELATIONS LÄNGE [Å]	ZYLINDER RADIUS [Å]	ZYLINDER LÄNGE [Å]
50	0,00007622	1,00088	41,1295	16,77	17,084
50 + bMBP	0,00007911	1,00088	41,6735	16,77	17,084
50 + C1	0,00006455	1,00088	32,599	16,77	17,084

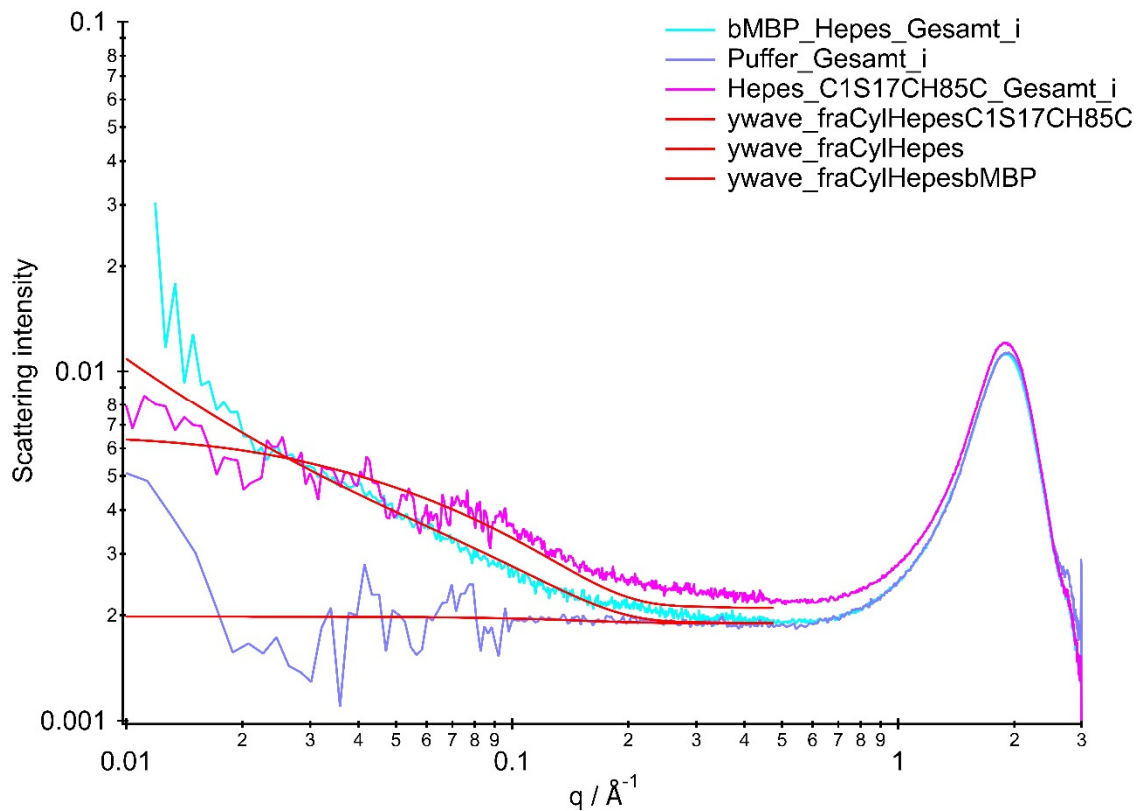


Abbildung 73 Ergebnisse SAXS HEPES, HEPES mit bMBP und HEPES mit C1S17CH85C

Tabelle 30 Ergebnisse SAXS HEPES, HEPES mit bMBP und HEPES mit C1S17CH85C

PROBE	VOLUMEN FRAKTION	FRAKTAL DIMENSION	KORRELA-TIONS LÄNGE [Å]	ZYLIN- DER RA- DIUS [Å]	ZYLINDER LÄNGE [Å]
HEPES	0,00007630	1,00088	0	16,77	17,084
HEPES + BMBP	0,00002383	1,00088	60,5308	16,77	17,084
HEPES + C1	0,00003705	1,00088	41,0242	16,77	17,084

Danksagung

Hier ist der Zeitpunkt gekommen sich bei all denen zu bedanken die mich während meiner Promotion unterstützt haben. Allen voran Prof. Dr. Dariush Hinderberger der mir die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation gegeben hat. Er hat mich bereits während meiner Diplomarbeit herzlich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen und stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Seine wissenschaftliche Expertise hat mir geholfen komplexe Probleme zu lösen auf die ich während meiner Arbeit stieß.

Als nächstes möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe, bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern für die gute Zusammenarbeit und das großartige Arbeitsklima bedanken. Einen besonderen Dank möchte ich Frau Heike Schimm aussprechen die Mutter der Kompanie und das Herz der Arbeitsgruppe ohne ihr technisches Knowhow wäre praktisches Arbeiten nicht möglich gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Milton T. Stubbs bedanken, im Besonderen bei Robert Broneske ohne seine Hilfe bei der rekombinanten Proteinherstellung wären ein Großteil der Messungen nicht möglich gewesen.

Weiterer Dank geht an die Graduierten Schule „Agripoly“ ohne ihre Finanzierung wäre das Projekt und die Dissertation nie zustande gekommen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Familie und Freunden bedanken. Insbesondere bei meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich in jeder Lebenslage unterstützt haben.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Jonas Volmer

Beruflicher Werdegang

Seit 05/2019	Promotion Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg Komplexe Selbstorganisierende Systeme AG Prof. Hinderberger
10/2014-04/2019	Studium der Lebensmittelchemie Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg Abschluss: Diplom Lebensmittelchemiker
09/2011-06/2014	Ausbildung zum Chemielaboranten Landesbetrieb Hessisches Landeslabor
07/2008- 06/2011	Albert-Schweitzer-Schule Hofgeismar Allgemeine Hochschulreife

Halle (Saale),

Jonas Volmer

Publikationsliste

Hauptautor:

"Tuning human serum albumin (HSA) hydrogels through albumin glycation.", Jonas Volmer; S. Hamidreza Arabi; Christian Henning; Marcus A. Glomb; Dariush Hinderberger
Macromolecular Bioscience (<https://doi.org/10.1002/mabi.202200487>)

Co-Autor:

„Hydrogels from serum albumin in a molten globule-like state“ Seyed Hamidreza Arabi; Behdad Aghelnejad; Jonas Volmer; Dariush Hinderberger
Protein Science (<https://doi.org/10.1002/pro.3976>)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale),

Jonas Volmer