

*Selbstassemblierte homogene und heterogene  
Proteinfasern und -strukturen induziert durch Oberflächen  
und Umgebungsbedingungen*



**FRIEDRICH-SCHILLER-  
UNIVERSITÄT  
JENA**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades**

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

**Vorgelegt dem Rat der Physikalisch-Astronomischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Dipl.-Ing. Christian Toni Helbing  
geboren am 25.03.1985 in Jena**

**Gutachter:**

1. Univ.-Prof. Dr. Klaus D. Jandt, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c. Werner E.G. Müller, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
3. Prof. Dr. Dorothea Brüggemann, Universität Bremen

Tag der Disputation: 28.10.2019

# Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Besonderer Dank geht an Prof. Dr. Klaus D. Jandt, meinen Doktorvater, für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die Möglichkeit, diese unter besten wissenschaftlichen und kollegialen Bedingungen am Lehrstuhl für Materialwissenschaft durchführen zu können.

Darüber hinaus danke ich all meinen aktuellen Kollegen sowie ehemaligen Kollegen für die sehr gute Zusammenarbeit, die intensiven Diskussionen, das freundschaftliche Verhältnis und die sehr schöne Zeit. Besonders Danke ich Dr. Izabela Firkowska-Boden, Dr. Thomas J. Dauben, M. Sc. Karl Scheuer, Dr. Matthias Arras, Dr. Mike Mühlstädt, Dr. Stefan Maenz, Dr. Robert Stößel und Dipl.-Biochem. Carolin Dewald, die mich, ob experimentell oder beim Erstellen von Publikationen, unterstützten und dazu beitrugen, dass ich diese Arbeit anfertigen konnte.

Dr. Tanja Deckert-Gaudig vom Institut für Physikalische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität danke ich für die Durchführung der TERS-Messungen und für die damit verbundene fachliche Hilfe beim Auswerten der unzähligen Spektren. Darüber hinaus danke ich Dr. Christoph Wiedemann von der ehemaligen Forschergruppe von Dr. Matthias Görlach, Biomolekulare NMR-Spektroskopie des Fritz-Lipmann-Instituts, für die Durchführung der CD-Messungen und für die wissenschaftlichen Diskussionen.

Der größte Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Kornelia und Frank, meinem Bruder Sebastian und meiner Schwägerin Irene sowie meiner Freundin Magdalena für die moralische und tatkräftige Unterstützung während der Dissertation.



## Zugehörige Veröffentlichungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind mehrere wissenschaftliche Publikationen entstanden, die bereits in wissenschaftlichen Fachzeitschriften (Peer-Reviewed) veröffentlicht wurden bzw. demnächst veröffentlicht werden. Folgende Publikationen wurden bereits veröffentlicht:

1. **C. Helbing**, R. Stößel, D. A. Hering, M. M. L. Arras, J. Bossert und K. D. Jandt. pH-dependent ordered fibrinogen adsorption on polyethylene single crystals. *Langmuir*; 32; 11868-11877
2. **C. Helbing**, T. Deckert-Gaudig, I. Firkowska-Boden, G. Wei, V. Deckert und K. D. Jandt. Protein Handshake on the Nanoscale: How Albumin and Hemoglobin Self-Assemble into Nanohybrid Fibers. *ACS Nano*; 12; 1211-1219

Folgende Publikation wird demnächst veröffentlicht:

3. K. Scheuer, **C. Helbing** und K. D. Jandt. Heterogeneous Protein Nanofibers: Tailoring their Properties by Adjusting their Composition, the Case of Fibronectin and Fibrinogen, *Small*, in Bearbeitung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist folgendes Buchkapitel entstanden, welches demnächst veröffentlicht wird:

4. **C. Helbing** und K. D. Jandt. Chapter 7: Novel protein and peptide nanofibrous structures by supramolecular co-assembly, In: G. Wei und S. G. Kumbar *Artificial Protein and Peptide Nanofibers*; Elsevier, Eingereicht.

Die Erlaubnis zur Verwendung der Daten in der vorliegenden Arbeit wurde von den entsprechenden Verlagen eingeholt.



# Zusammenfassung

Die Selbstassemblierung von Proteinen spielt in der Natur eine wichtige Rolle, da Proteinstrukturen z.B. das Grundgerüst natürlichen Gewebes oder die hochfesten Fasern der Spinnenseide bilden. Verschiedene Faktoren, wie Adsorption auf Oberflächen oder Veränderung der Umgebungsbedingungen, können die Assemblierung von Proteinen induzieren. Im Rahmen dieser Arbeit wird gezeigt, dass die im sub-Nanometerbereich strukturierte hydrophobe Oberfläche eines Polyethylen (PE)-Einkristalls die Ausrichtung von einzelnen Fibrinogen (HPF)-Molekülen beeinflusst. Der Orientierungsmechanismus beruht auf erhöhten intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den PE-Kettenfaltungsbögen und dem HPF-Molekül entlang spezifischer kristallographischer Richtungen sowie der dimensionalen Ähnlichkeiten der PE-Kettenfaltung und der  $\alpha$ -Helix des HPF-Moleküls. Aufgrund erhöhter Protein-Protein-Wechselwirkungen und verminderter Oberflächendiffusion wird keine Orientierung assemblierter HPF-Fasern und -faserartiger Netzwerke beobachtet.

Erstmalig wird die Ethanol- und Temperatur-induzierte Selbstassemblierung von Plasmaproteinen, speziell Albumin (HSA) und Hämoglobin (HGB), zu heterogenen Proteinnanofasern (hPNF) gezeigt. Es wird darüber hinaus dargestellt, dass Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie eine geeignete Methode ist, um die Anwesenheit beider Proteine in den neuartigen hPNF auf Nanoebene zu beweisen. Zusätzlich erfolgt eine Bestätigung des heterogenen Charakters mittels Immunogold-Markierungsverfahren. Der dabei beobachtete geringe Anteil an HGB wird durch Unterschiede in der Assemblierungskinetik erklärt. Basierend auf den gewonnenen Struktur-Eigenschafts-Beziehungen wird ein Modell für die Faserbildung der HSA-HGB-PNF entwickelt, welches eine Vorhersage weiterer potentieller hPNF erlaubt.

Neben dem neuen HSA-HGB-System wird erstmals die Ethanol-induzierte Selbstassemblierung für HPF und Fibronectin (HFN) zu hPNF untersucht. Dabei wird die Änderung der Fasercharakteristika (Faserdurchmesser, hydrodynamischer Radius, Zeta-Potenzial) selbstassemblierter hPNF in Abhängigkeit des initialen molaren Mischungsverhältnisses beider Proteine betrachtet. Während homogene PNF den betragsmäßig geringsten Wert aufweisen, wird für Fasern mit einem molaren Mischungsverhältnis von 1:1 immer der betragsmäßig maximale Wert beobachtet. Dies wird auf die stärkeren Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie die schnelleren

Assemblierungskinetiken zurückgeführt. Alle Fasern sind bis zu 24 Stunden in phosphatgepufferter Salzlösung stabil. Durch die Reduktion der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen in Wasser dissoziieren diese unerwarteterweise direkt. Es wird ein Modell vorgeschlagen, welches die Entstehung der beobachteten Strukturen erklärt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben grundlegende und essentielle Einblicke in den Mechanismus der Selbstassemblierung und zeigen Wege auf, diesen zu beeinflussen. Somit legen die gewonnenen Erkenntnisse den Grundstein für die Entwicklung neuer proteinbasierter Materialien mit steuerbaren Eigenschaften.

## Abstract

The self-assembly of proteins plays an important role in nature, since protein structures form, for example, the basic structure of natural tissue or the high-strength fibres of spider silk. Various factors, such as adsorption on surfaces or changes in environmental conditions, can induce the assembly of proteins. This work shows that the hydrophobic surface of a polyethylene (PE) single crystal, which is structured in the sub-nanometer range, influences the orientation of individual fibrinogen (HPF) molecules. The orientation mechanism is based on increased intermolecular interactions between the PE chain folds and the HPF molecule along specific crystallographic directions and the dimensional similarities of the PE chain folds and the  $\alpha$  helix of the HPF molecule. Due to increased protein-protein interactions and reduced surface diffusion, no orientation of assembled HPF fibers and fiber-like networks is observed.

For the first time, ethanol- and temperature-induced self-assembly of plasma proteins, especially albumin (HSA) and hemoglobin (HGB), to heterogeneous protein nanofibers (hPNF) will be induced. Further it will be shown that tip enhanced Raman spectroscopy is a suitable method to prove the presence of both proteins in the novel hPNF at the nano level. In addition, the heterogeneous character is confirmed by immunogold labeling. The low amount of HGB is explained by differences in assembly kinetics. Based on the obtained structure-property relationships, a model for the fiber formation of HSA-HGB PNF is developed, which allows a prediction of further potential hPNF.

In addition to the new HSA-HGB system, ethanol-induced self-assembly of HPF and fibronectin (HFN) to hPNF is investigated for the first time. The change of fiber characteristics (fiber diameter, hydrodynamic radius, zeta potential) of self-assembled hPNF as a function of the initial molar mixing ratio of both proteins is investigated. While homogeneous PNF have the lowest absolute value, for fibers with a molar mixing ratio of 1:1 the maximum absolute value is always observed. This is attributed to the stronger protein-protein interactions and the faster assembly kinetics. All fibers are stable for up to 24 hours in phosphate-buffered saline. By reducing the electrostatic interactions between the proteins in water, they showed an unexpected spontaneous dissociation. A model is proposed which explains the formation of the observed structures.

The results of this work give fundamental and essential insights into the mechanism of self-assembly and elucidate ways to influence it. Thus, the gained knowledge lays the foundation for the development of new protein-based materials with controllable properties.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	III
Zugehörige Veröffentlichungen .....	IV
Zusammenfassung.....	V
Abstract.....	VII
Inhaltsverzeichnis .....	IX
Abkürzungsverzeichnis .....	XII
Abbildungsverzeichnis .....	XIV
Tabellenverzeichnis .....	XVI
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Grundlagen .....</b>	<b>4</b>
2.1. Polymer.....	4
2.1.1. Polyethylen .....	4
2.2. Proteine .....	7
2.2.1. Fibrinogen .....	9
2.2.2. Serum Albumin .....	10
2.2.3. Hämoglobin.....	11
2.2.4. Fibronektin.....	12
<b>3. Stand des Wissens .....</b>	<b>14</b>
3.1. Organisation von Proteinen auf strukturierten Oberflächen .....	14
3.1.1. Proteinadsorption auf Blockcopolymeren .....	15
3.1.2. Proteinadsorption auf teilkristallinen Polymeren.....	17
3.2. Assemblierung von homogenen Proteinstrukturen .....	19
3.3. Assemblierung von heterogenen Proteinfasern.....	23
3.3.1. Elektrosponnen von heterogenen Proteinfasern.....	24
3.3.2. Extrusion von koassemblierten Proteinfasern .....	26
3.3.3. Selbstassemblierung von heterogenen Peptid-Proteinfasern .....	29
3.3.4. Selbstassemblierung von heterogenen Proteinfasern.....	31

<b>4.</b>	<b>Offene Fragen und Ziel der Arbeit .....</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>Experimentelles .....</b>	<b>39</b>
5.1.	Herstellung von Polyethylen-Einkristallen .....	39
5.2.	Adsorption von Fibrinogen auf Polyethylen-Einkristallen .....	39
5.3.	Charakterisierung der Oberfläche .....	40
5.4.	Analyse der Ausrichtung von adsorbierten Fibrinogen-Molekülen .....	40
5.5.	Herstellung von selbstassemblierten Proteinfasern .....	41
5.5.1.	Herstellung von Albumin-Hämoglobin Proteinfasern .....	41
5.5.2.	Herstellung von Fibronectin-Fibrinogen Proteinfasern .....	41
5.6.	Charakterisierung der selbstassemblierten Proteinfasern .....	42
5.7.	Zirkuläre Dichroismus-Spektroskopie .....	42
5.8.	Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie .....	43
5.9.	Kraftspektroskopie .....	43
5.10.	Stabilitätstests in Wasser und PBS .....	44
5.11.	Immunogold-Markierung .....	45
5.11.1.	Heterogene Albumin-Hämoglobin Nanofasern .....	45
5.11.2.	Heterogene Fibronectin-Fibrinogen Nanofasern .....	46
5.12.	Statistik .....	47
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>48</b>
6.1.	Proteinadsorption auf Polyethylen-Einkristallen .....	48
6.1.1.	Polyethylen-Einkristalle vor und nach der Proteinadsorption .....	48
6.1.2.	Einfluss der Adsorptionsbedingungen auf die Fibrinogenassemblierung auf Polyethylen-Einkristallen .....	50
6.1.3.	Orientierung der Fibrinogenassemblierungen auf nanostrukturierten Polyethylen-Einkristall-Oberflächen .....	55
6.1.4.	Kapitelzusammenfassung .....	61
6.2.	Selbstassemblierte Proteinfasern aus Albumin und Hämoglobin .....	62
6.2.1.	Herstellung und Charakterisierung von selbstassemblierten heterogenen Proteinfasern .....	62
6.2.2.	Bestimmung der Sekundärstruktur von Albumin, Hämoglobin und heterogenen Albumin-Hämoglobin Proteinfasern .....	64
6.2.3.	Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie – optische Eigenschaften von heterogenen Proteinfasern .....	66

6.2.4.	Immunogold-Markierung.....	70
6.2.5.	Kraftspektroskopie – Mechanische Eigenschaften von heterogenen Proteinfasern .....	71
6.2.6.	Assemblierungskinetik und Modellbildung.....	73
6.2.7.	Kapitelzusammenfassung .....	77
6.3.	Homogene und heterogene Proteinfasern aus Fibronectin und Fibrinogen.....	78
6.3.1.	Charakterisierung der selbstassemblierten PNF .....	78
6.3.2.	Stabilitätstests der selbstassemblierten PNF aus Fibronectin und Fibrinogen.....	81
6.3.2.1.	Stabilität in Wasser .....	82
6.3.2.2.	Stabilität in PBS mit und ohne Ethanol .....	84
6.3.3.	Immunogold-Markierung.....	87
6.3.4.	Mechanismus der Faserbildung .....	89
6.3.5.	Kapitelzusammenfassung .....	93
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>A.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>109</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>115</b>



# Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -PLL	$\alpha$ -helikales Poly(L-Lysin)
A53T	Homomutantes $\alpha$ -Synuclein
AFM	Rasterkraftmikroskopie
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
AuNP	Goldnanopartikel
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Ultraviolett-Zirkulare Dichroismus
CPL	Carbonatpufferlösung
DLS	Dynamische Lichtstreuung
ECM	Extrazelluläre Matrix
EIIIA/EIIIB	alternativ gespleißte FNIII-Domänen
FNI-III	FN Typ I-III Wiederholungen
FpA/B	Fibrinopeptid A/B
HDPE	High-density Polyethylen
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol
HFN	Humanes Fibronectin
HGB	Hämoglobin
HPF	Humanes Plasma Fibrinogen
hPNF	heterogene Protein Nanofasern
HSA	Humanes Serum Albumin
IAPP	Inselamyloid-Polypeptid
IIICS	FNIII-Verbindungssegment
iPB-1	isotaktisches-Polybuten-1
LDPE	Low-density Polyethylen
LLDPE	Lineares Low-density Polyethylen
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OKD	Oberflächenkettendichten
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Polyethylen
PE-EK	Polyethylen-Einkristall
PEG	Polyethylenglycol

pI <sub>s</sub>	isoelektrische Punkte
PNF	Protein Nanofasern
PS	Polystyrol
PS- <i>b</i> -PMMA	Polystyrol- <i>block</i> -Polymethylmetacrylat
R <sub>H</sub>	hydrodynamischer Radius
R <sub>q</sub>	Mittlere quadratische Rauigkeit
(S)TEM	(Raster)transmissionselektronenmikroskopie
TBS	TRIS-gepufferte Lösung
T <sub>c</sub>	Kristallisationstemperatur
TERS	Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie
TFE	Trifluorethanol
TTCS	Thiethoxychlorsilan
UHMWPE	Ultra-high-molecular-weight Polyethylen
ζ <sub>Pot</sub>	Zeta-Potenzial

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Grundlagen PE .....	5
Abbildung 2.2: PE-EK .....	6
Abbildung 2.3: Sekundärstruktur von Proteinen .....	7
Abbildung 2.4: Fibrinogen .....	9
Abbildung 2.5: Albumin.....	11
Abbildung 2.6: Hämoglobin .....	12
Abbildung 2.7: Fibronectin .....	13
Abbildung 3.1: Proteinadsorption auf Blockcopolymeren. ....	16
Abbildung 3.2: Proteinadsorption auf teilkristallinen Polymeren .....	17
Abbildung 3.3: Sigmoidales Massenwachstumsprofil der Fibrillenbildung .....	20
Abbildung 3.4: Selbstassemblierte PNF .....	21
Abbildung 3.5: Extrudierte hPNF .....	28
Abbildung 3.6: Selbstassemblierte heterogene Peptid-Proteinfasern.....	30
Abbildung 3.7: Koaggregationsstudien mittels Thioflavin T-Fluoreszenz für verschiedene globuläre Proteine in PBS bei ~70 °C .....	33
Abbildung 6.1: AFM-Höhenbild eines PE-EK vor (a) und nach (b) der HPF-Adsorption aus einer CPL-Lösung mit einem pH von 9,2 und einer Konzentration von 0,5 µg/ml .....	49
Abbildung 6.2: AFM-Höhenbilder von HPF-Strukturen nach der Inkubation mit verschiedenen HPF-Konzentrationen (0,5, 2,0 und 5,0 µg/ml) aus PBS (a-c) und aus CPL (d-f) .....	51
Abbildung 6.3: Orientierung von Fibrinogenassemblierungen auf PE-EK.....	56
Abbildung 6.4: Modell (maßstabsgerecht) für die Orientierung von $\alpha$ -Helixstrukturen in Abhängigkeit der kristallographischen Richtungen .....	59
Abbildung 6.5: HSA-HGB-hPNFs .....	63
Abbildung 6.6: Sekundärstruktur HSA-HGB, HSA und HGB .....	65
Abbildung 6.7: TERS an HSA-HGB hPNF .....	67
Abbildung 6.8: TERS an HSA hPNF .....	69
Abbildung 6.9: Immunogold-Markierung von HSA-HGB-hPNF.....	71
Abbildung 6.10: Kraft-Abstandskurven von HSA- und HSA-HGB-hPNF.....	72
Abbildung 6.11: Assemblierungskinetik von HSA-HGB, HSA und HGB. ....	74
Abbildung 6.12: Der Bildungsmechanismus von HSA-HGB-hPNF .....	75
Abbildung 6.13: Höhe und $R_H$ von HFN-HPF-hPNF .....	79
Abbildung 6.14: $\zeta_{Pot}$ der PNF in 80 Vol.% Ethanol in Abhängigkeit der Faserzusammensetzung.....	80
Abbildung 6.15: Stabilität der HFN-HPF-hPNF in Wasser .....	82
Abbildung 6.16: Stabilität von HFN-HPF-hPNF in PBS mit 40 Vol.% Ethanol.....	84
Abbildung 6.17: Durchschnittliche Faserhöhen der HFN-HPF-hPNF vor der Zugabe von PBS zum Assemblierungsmedium 80 Vol.% Ethanol und 1 h bis 2 h nach Zugabe von PBS .....	85

Abbildung 6.18: HFN-HPF-hPNF in PBS .....	86
Abbildung 6.19: Immunogold-Markierung von HFN-HPF-hPNF .....	88
Abbildung 6.20: Bildungsmechanismus der HFN-HPF-hPNF .....	91
Abbildung A 1: AFM-Höhenbild einer PE-EK-Oberfläche nach der HPF-Adsorption (0,5 µg/ml) aus CPL-Lösung .....	110
Abbildung A 2: TERS Charakterisierung von HSA-HGB-hPNF.....	112
Abbildung A 3: Vergleich von HSA-Aminosäuresequenzen mit HGB-Alpha- und Beta-Domänen .....	113
Abbildung A 4: Repräsentative AFM-Höhenbilder von homogenen und heterogenen PNF hergestellt aus HFN und/oder HPF .....	114

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Zusammenfassung selbstassemblierter hPNF.....	35
Tabelle 5.1: Molverhältnisse von HFN zu HPF in den Ausgangslösungen .....	42
Tabelle 6.1: HPF-Anordnungen auf PE-EK und deren Geometrie für verschiedene Konzentrationen und pH- Werte .....	52
Tabelle 6.2: Anteil an hydrophoben, polaren und geladenen Aminosäureresten in HSA und HGB .....	77
Tabelle A 1: Abschwächungskoeffizienten verschiedener Plasmaproteine .....	109
Tabelle A 2: Charakteristische Raman-Banden von Porphyrin und ihre entsprechenden Zuordnungen.....	111



# 1. Einleitung

Die Organisation von Molekülen zu übergeordneten Strukturen ist ein entscheidender Vorgang in der Natur. Verschiedene natürliche Prozesse beginnen mit der Zusammenlagerung kleiner Moleküle zu größeren Molekülen oder Strukturen, wie z.B. während der Bildung von Kristall- oder Kolloidstrukturen, der Bildung von Lipiddoppelschichten, der Phasentrennung von Copolymeren oder der Zusammenlagerung von Aptameren zu RNA und DNA. Diese wiederum sind für die Peptidsynthese verantwortlich, die in Kombination mit der Peptidfaltung zur Proteinbildung führt. Proteine sind für verschiedenste Funktionen im menschlichen Körper unerlässlich, wie etwa bei der Einleitung der Zelldifferenzierung oder dem Transport kleinerer Moleküle.<sup>3</sup> Albumin beispielsweise transportiert Substanzen wie Steroide, Fettsäuren oder Hormone.<sup>4</sup> Hämoglobin hingegen, welches eine funktionelle Überstruktur aus vier Untereinheiten besitzt, ist für den Sauerstofftransport verantwortlich.<sup>3</sup> Die Funktion anderer Proteine hängt wiederum mit deren Organisation zu supramolekularen Strukturen wie Fasern oder Netzwerken zusammen. Kollagenetzwerke sind unter anderem Teil der Grundstruktur biologischen Gewebes und bestimmen dessen mechanische Eigenschaften und Morphologie.<sup>5-6</sup> Fibrinogen, der Hauptbestandteil der Blutgerinnung, bildet ein fibröses Fibrinnetzwerk und spielt eine wichtige Rolle bei Heilungsprozessen und Gewebereparaturen.<sup>7</sup>

Oft besitzen Strukturen in der Natur einen hierarchischen Aufbau bestehend aus Proteinen als Grundbausteine, welche sich durch das Bottom-up-Prinzip bilden. Bei der Entstehung werden zwei verschiedene Mechanismen unterschieden: die Selbstorganisation und die Selbstassemblierung. Die Selbstorganisation ist die Zusammenlagerung von Molekülen zu Strukturen auf der Nano- und Mikroebene als Ergebnis von dynamischen dissipativen nichtlinearen Nichtgleichgewichtsprozessen.<sup>8</sup> Das Zusammenspiel aus internen (Koordinationswechselwirkung, Wasserstoffbindungen, Dipol-Dipol usw.) und externen (Konzentration, Temperatur, Lösungsmittel, Zeit, usw.) Faktoren kann zu nicht-thermodynamisch stabilen Strukturen mit besonderen zusammenlagerungsbedingten Eigenschaften führen.<sup>8</sup> Im Gegensatz dazu hängt die Selbstassemblierung von Gleichgewichtsprozessen und spezifischen Interaktionen der molekularen Grundbausteine ab. Diese führen zur Bildung einer vordefinierten Struktur welche im thermodynamischen Gleichgewicht ist.<sup>8</sup> Die resultierende Struktur ist somit

bei der Selbstassemblierung im Molekül vorgeschrieben, wohingegen dies für die Selbstorganisation keine Voraussetzung ist. Dies ist der essentielle Unterschied beider Mechanismen.<sup>8</sup>

Die Möglichkeit, die intrinsische Eigenschaft von Biomolekülen wie Proteinen, sich zu Strukturen zusammenzulagern, auszunutzen, weckt das Interesse an der Entwicklung von Nanostrukturen und -materialien auf Grundlage der Selbstassemblierung. Das Verständnis der Selbstassemblierungsmechanismen ist somit eine Voraussetzung für die Herstellung neuer proteinbasierter Materialien auf Grundlage natürlicher biologischer Vorlagen. Verschiedenste Faktoren können die Selbstassemblierung induzieren (wie Oberflächen oder aber veränderte Umgebungsbedingungen).<sup>9-11</sup> Wechselwirkungen von Proteinen mit Oberflächen, speziell Biomaterialoberflächen, sind ein essentieller Faktor für deren Funktion. Auch hier spielen die resultierenden Anordnungen auf der Oberfläche, also die selbstassemblierten Strukturen, eine entscheidende Rolle. Eine adsorbierte Schicht aus Proteinen kann die Gewebereparatur fördern, indem die Proteine Bindungsstellen für verschiedene Zelltypen wie Osteoblasten oder Fibroblasten bereitstellen. So führt die spezifische Adsorption von Fibronectin und dessen Assemblierung auf Implantatoberflächen zur Verbesserung der Endothelialisierung und minimiert das Risiko einer Abstoßung. Die Endothelialisierung kann ebenfalls durch oberflächliche Fibrinfaserbildung verbessert werden, welche in Abwesenheit von Thrombin durch Oberflächen induziert werden kann.<sup>12</sup> Auf der anderen Seite kann eine unkontrollierte Adsorption von Fibrinogen oder auch Immunoglobulin ungewünschte Reaktionen wie Koagulation, Thrombose oder Infektionen, hervorrufen.<sup>13</sup> Eine Methode zur Kontrolle der entstehenden Strukturen ist die Beeinflussung der Proteinorientierung während der Selbstassemblierung auf Oberflächen. Hierzu ist die Verwendung von nanostrukturierten Oberflächen mit Strukturen in Größenordnungen der Proteine vielversprechend.<sup>13</sup>

Neben der resultierenden Struktur ist es ebenfalls wünschenswert, die Zusammensetzung von selbstassemblierten Proteinfaserstrukturen zu beeinflussen, um deren Eigenschaften zu kontrollieren. Dieser Ansatz ist durch die Natur inspiriert, in welcher verschiedene Proteine beispielsweise die faserige Struktur der Extrazellulären Matrix (ECM) bilden. Eine Möglichkeit hierzu ist die Herstellung von heterogenen Proteinnanofasern (hPNF) welche sich aus verschiedenen Proteinen bilden. Hierzu gibt es in der Literatur verschiedenste Ansätze wie Elektrospinnen<sup>14-15</sup>, Extrusion<sup>16-21</sup> oder

Selbstassemblierung<sup>9,22-24</sup>, die auf dem Prinzip beruhen, durch Veränderung der Umgebungsbedingungen die Interaktion verschiedener Proteine zu induzieren. Bei vielen Methoden wird jedoch die Proteinorientierung zu Fasern durch einen zusätzlichen externen Stimulus wie Pressen durch eine Düse oder Ausrichtung durch ein elektrisches Feld hervorgerufen. Nur die Selbstassemblierung ist ein Prozess, bei dem die PNF-Bildung, wie bei der Amyloidbildung oder der Fibringerinnung, durch die eigene Organisation der Proteine entlang einer bevorzugten Achse entsteht. Die resultierenden selbstassemblierten faserigen Proteinstrukturen stellen Grundbausteine für neue, von der Natur inspirierte Biomaterialien dar.

Ziel der vorgelegten Arbeit ist es zu zeigen, dass Strukturen im sub-Nanometerbereich in der Lage sind, die Orientierung von Proteinen zu beeinflussen. Des Weiteren soll die Hypothese getestet werden, dass sich Proteine zu heterogenen PNF (hPNF) selbstassemblieren. Abschließend soll die Hypothese getestet werden, dass die hPNF-Charakteristika und -Eigenschaften über die Proteinverhältnisse kontrolliert werden können. Diese neue Art heterogener PNF erlaubt die Herstellung proteinbasierter Bionanomaterialien mit kontrollierbaren Eigenschaften.

## **Aufbau der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit ist in zwei thematische Komplexe gegliedert. Im ersten Themenkomplex werden die Hintergründe des Themas näher erläutert. Dazu erfolgt zunächst eine Einführung in die Thematik der Polymere und Proteine. Danach wird der aktuelle Forschungsstand zum Einfluss von nanostrukturierten Oberflächen auf die Proteinadsorption und kurz die Assemblierung von homogenen als auch verschiedene Herstellungsmethoden für heterogene PNF vorgestellt. Aus diesen werden dann die offenen Fragen und die Ziele der Arbeit abgeleitet. Im zweiten Themenkomplex werden die verwendeten experimentellen Methoden sowie die Ergebnisse vorgestellt und diskutiert. Im ersten Abschnitt des Komplexes wird gezeigt, dass die Oberflächenstruktur eines Polyethylen-Einkristalls (PE-EK) die Orientierung von einzelnen Proteinen und Proteinstrukturen beeinflusst. Im nächsten Teil wird die Selbstassemblierung von Albumin und Hämoglobin zu hPNF gezeigt und deren Existenz auf der Nanoebene bewiesen. Im dritten Teil wird der Einfluss des Proteinverhältnisses von Fibronectin zu Fibrinogen auf die Charakteristika und Eigenschaften der selbstassemblierten hPNF untersucht. Abschließend werden die Ergebnisse kurz zusammengefasst.



## 2. Grundlagen

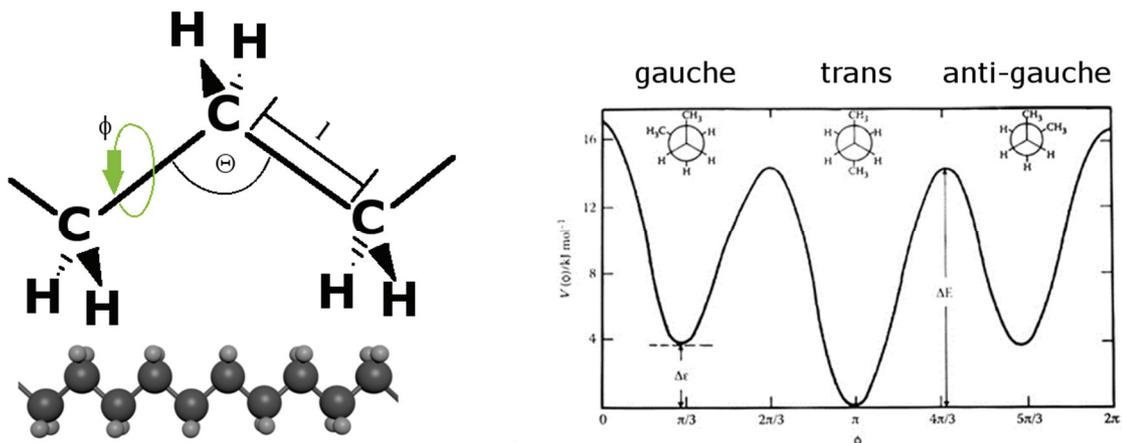
### 2.1. Polymer

Polymere (gr.: polys=viel, meros=Teil) sind Makromoleküle, welche aus einer Aneinanderreihung einer oder mehrerer Moleküleinheiten (Mere) bestehen und durch deren Länge die Kettenenden keinen Einfluss haben. Die Mere sind in einer Kette kovalent miteinander verbunden und haben jeweils dieselbe chemische Struktur (Konstitution). Die meisten kommerziell verfügbaren Polymermoleküle haben ein Rückgrat, welches aus kovalent gebundenen Kohlenstoffatomen oder Silizium (Silane) besteht. Die Eigenschaften der Polymere werden sowohl durch ihre Konstitution, Konfiguration, also der Mer-Anzahl und ihre Art der Verknüpfung, und die Konformation, der räumlichen Ausprägung der Ketten, bestimmt. Eine wichtige Eigenschaft, welche auch von diesen drei Faktoren beeinflusst wird, ist das Vermögen amorphe oder teilkristalline Bereiche auszubilden. Hierbei spielen vor allem die Seitengruppen, welche am Kohlenstoffrückgrat angeordnet sind, eine entscheidende Rolle.<sup>25</sup> Die Seitenkettenanordnung wird durch die sogenannte Taktizität beschrieben. Es wird dabei zwischen der isotaktischen (alle Seitengruppen sind gleich ausgerichtet), syndiotaktischen (die Ausrichtung der Seitengruppen ist alternierend und gespiegelt) und ataktischen (zufällig ausgerichtete Seitengruppen) Konformation unterschieden.<sup>26</sup> Da es für Polymere mit kleinen und regelmäßig angeordneten Seitengruppen energetisch vorteilhaft ist, sich in kristalliner Form an bestehende Ketten anzulagern, ist die Kristallisation für isotaktische Polymere am wahrscheinlichsten. In Abhängigkeit der 3D-Kettenstruktur kann auch das syndiotaktische Polymer kristallisieren, wohingegen das ataktische fast ausschließlich im amorph erstarrten Zustand vorliegt, jedoch weisen einige ataktische Polymere eine geringe Kristallinität auf.

#### 2.1.1. Polyethylen

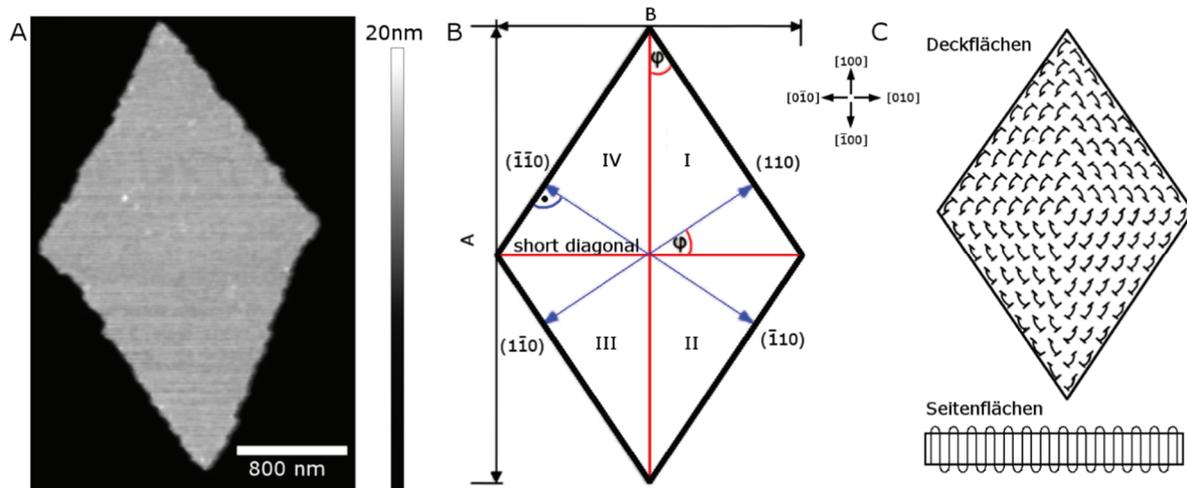
Das im chemischen Sinne simpelste Polymer ist das Polyethylen (PE), da es idealerweise keine Seitengruppen besitzt und nur aus Kohlenstoff und Wasserstoff besteht. Eine PE-Kette mit der entsprechenden Bindungslänge und dem entsprechenden Winkel in der all-trans-Konformation oder auch zick-zack-Konformation ist in Abbildung

2.1 dargestellt. Diese ausgestreckte Form mit einem Drehwinkel  $\phi$  von  $180^\circ$  um die C-C Bindung ist die energetisch günstigste Form. Daneben existieren noch zwei weitere lokale Minima für die Drehung um die C-Achse, die gauche und anti-gauche Konformation (Abbildung 2.1 rechts), welche zu einer Drehung bzw. Faltung der Kette führen. Bei der Ausführung vier gleicher gauche-Drehungen dreht sich die Kette um  $180^\circ$ . Dies ist eine entscheidende Grundlage für die Bildung von Kettenfaltungskristallen.



**Abbildung 2.1:** Grundlagen PE: Schema eines PE mit der Bindungslänge  $l=0,154$  nm, dem Bindungswinkel  $\Theta=109,47^\circ$ , dem Drehwinkel  $\phi$  (links, oben) und der all-trans-Konformation des PE (links, unten).<sup>27</sup> Energieverteilung für verschiedene Konformationswinkel von n-Butan. (rechts, Abbildung nach Ref. 28)

Aufgrund seiner simplen Struktur ist PE ein teilkristallines Polymer. Abhängig vom Herstellungsverfahren können sich jedoch verschiedene strukturelle Unterschiede ausbilden, welche sich in Anzahl und Länge der Verzweigungen sowie dem Molekulargewicht unterscheiden. So hat zum Beispiel das Low-density PE (LDPE) eine hohe Anzahl verschieden langer Verzweigungen, wodurch die Kristallisation erschwert wird.<sup>29</sup> Verkürzen sich die Längen der Verzweigungen, so spricht man von linearen Low-density PE (LLDPE).<sup>29</sup> Sind die Ketten hingegen sehr lang, mit einem Molekulargewicht höher als  $3,6 \cdot 10^6$  g/mol, spricht man von einem Ultra-high-molecular-weight PE (UHMWPE).<sup>29</sup> Aufgrund des hohen Molekulargewichtes tendiert dieses PE zur Ausbildung einer hohen Anzahl von Verschlaufungen in der Kette, was die Kristallisationskinetik reduziert und somit den Kristallisationsgrad senkt. Das am besten kristallisierbare Polyethylen ist das High-density PE (HDPE), welches nur eine geringe Anzahl an Verzweigungen aufweist.<sup>29</sup> Wie alle thermoplastischen Polymere kristallisiert HDPE aus der Schmelze zu Sphärolithen bestehend aus Kettenfaltungskristallen, welche über amorphe Bereiche miteinander verbunden sind.<sup>25</sup> Die Polymerketten bilden dabei



**Abbildung 2.2:** PE-EK: Rasterkraftmikroskop (AFM)-Höhenbild (A) eines PE-EK nach der Kristallisation bei 85°C für 7 Tage in Xylol. (B) schematische Darstellung der vier Sektoren einer PE-EK-Oberfläche in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsrichtung und der Kristallorientierung. Die beiden Kristaldiagonalen A und B und der Winkel der Kristallrichtungen  $\varphi$  sind hervorgehoben. (C) Ideale Anordnung der PE-Kettenfaltungen auf der PE-EK-Oberfläche und die Orientierung der ausgestreckten Ketten in den Seitenflächen. Die Kettenfaltungen sind parallel zur Kante des PE-EK ausgerichtet. Nachgedruckt mit Erlaubnis von Ref. 30; © 2016 American Chemical Society

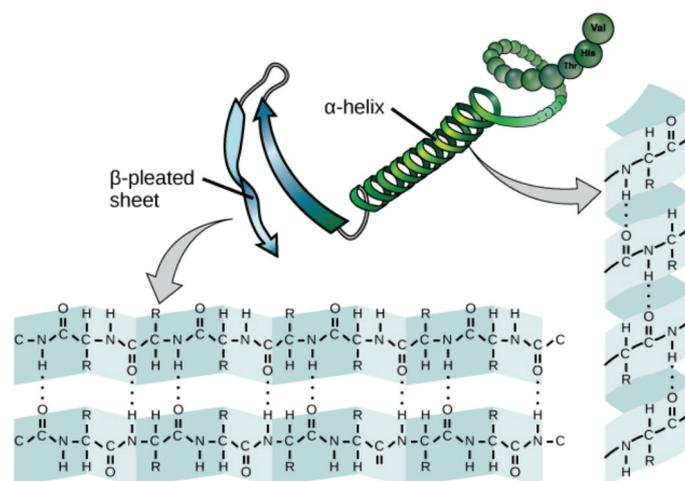
sowohl den kristallinen als auch den amorphen Teil. Als „tie“-Moleküle werden Polymerketten bezeichnet, welche zwei kristalline Bereiche miteinander verbinden.

Kristallisiert man HDPE aus einer verdünnten Lösung anstatt einer relaxierten Schmelze kommt es zur Bildung von lamellenartigen Einkristallen, welche aus Kettenfaltungen bestehen. Diese können einige Mikrometer in x- und y-Richtung, die thermodynamisch begrenzte Dicke beträgt aber nur wenige 10 nm (Abbildung 2.2A).<sup>25</sup> Bei Kristallbildung bzw. -wachstum lagern sich die Ketten entlang der  $\{110\}$ -Ebenen an (Abbildung 2.2B). Daraus ergibt sich eine senkrechte Anlagerung der ausgestreckten Ketten in *all-trans* Stellung in den Seitenflächen, während die Kettenfaltungen die Deckflächen der Kristalle bilden (Abbildung 2.2C). Die Dicke der Einkristalle wird somit durch den Abstand der Kettenfaltungen bestimmt. Es wird davon ausgegangen, dass 75% der Kettenfaltungen aus vier gauche-Drehungen bestehen und somit an der direkt benachbarten Stelle wieder in den Kristall eintreten.<sup>27, 31-32</sup> Betrachtet man zusätzlich noch einen Eintritt an übernächster Stelle, was mehrere gauche-Drehungen benötigen würde, machen diese 81 % der PE-EK Oberfläche aus.<sup>27, 31-32</sup> Darüber hinaus kann es zum Auftreten von Defekten, wie losen Schleifen oder Versetzungen kommen. Beim idealen Kristall wird jedoch davon ausgegangen, dass die Kettenfaltungen mit direkt benachbartem Eintritt die Oberflächenstruktur bilden (Abbildung 2.2C). Die äußere Form

der PE-EK ist abhängig vom verwendeten Lösungsmittel, für Xylol ist beispielsweise die Rautenform typisch (Abbildung 2.2). Diese lässt sich in vier Sektoren unterteilen, wobei die Ausrichtung der Kettenfaltungen, aufgrund der Wachstumsrichtungen, in den Sektoren I und III sowie II und IV gleich sind (Abbildung 2.2B und C). Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften sind PE-EK ein interessantes Modellsystem zur Untersuchung der Wechselwirkung von Molekülen mit einer Oberflächenstruktur im sub-Nanometerbereich.

## 2.2. Proteine

Proteine sind Makromoleküle die, im Gegensatz zu synthetischen Polymeren, jeweils ein festes Molekulargewicht mit einem stark hierarchischen und festgelegten Aufbau haben.<sup>3, 33-34</sup> Der strukturelle Aufbau kann grundsätzlich in Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur unterschieden werden.<sup>3, 33-34</sup> Die Grundbausteine der Proteine sind Aminosäuren, welche über eine Kondensationsreaktion der Amino- und Carboxylgruppen polymerisieren und somit eine Peptidbindung bilden.<sup>34</sup> Es gibt 20 natürliche proteinogene Aminosäuren, welche bei der Synthese von Proteinen in biologischen Zellen vorkommen. Abhängig von den Eigenschaften der R-Gruppe werden Aminosäuren in die Kategorien hydrophob, hydrophil, geladen und andere eingeteilt.<sup>35</sup> Hydrophoben Reste umfassen die aliphatischen Reste (A, I, L, M, V) sowie die aromatischen Reste (F, W, Y). Hydrophile, ungeladene Reste können entweder über -OH



**Abbildung 2.3:** Sekundärstruktur von Proteinen: Schematische Darstellung einer antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Struktur und einer  $\alpha$ -Helix. Die Strukturen werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carboxyl- und Aminogruppen des Peptide-Rückgrates stabilisiert. Nachgedruckt mit Erlaubnis von Ref. 3 © 2017 Rice University

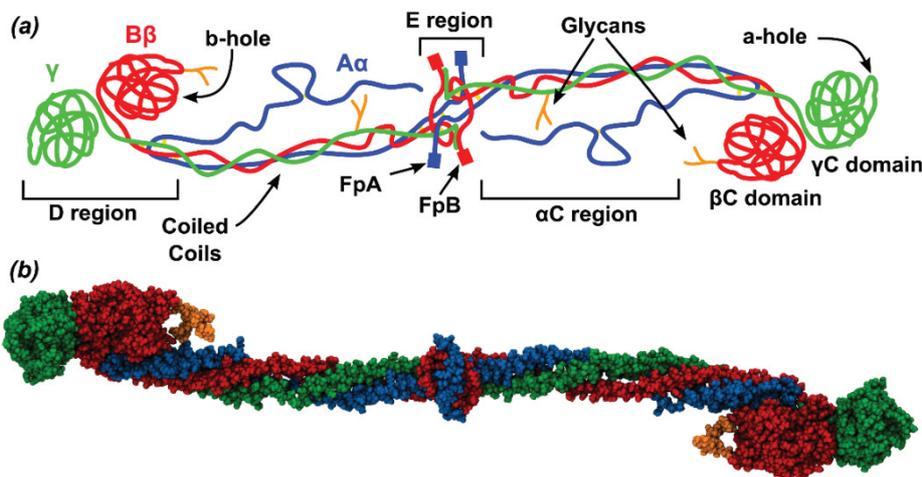
(S, T) oder -CONH (N, Q) Gruppen an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sein.<sup>35</sup> Geladene Reste können entweder positiv (H, K, R) oder negativ (D, E) geladen sein und genutzt werden, um spezifische Ladungs-Ladungs-Wechselwirkungen zu erzeugen.<sup>35</sup> Die restlichen Aminosäuren (C, P, G) können zu strukturellen Modifikationen, wie z.B. Biegungen in der Proteinkette, führen oder als Angriffspunkte für chemische Modifikationen dienen.

Die Aminosäuresequenz eines Proteins wird in dessen Protein spezifischer Primärstruktur beschrieben und bestimmt das Molekulargewicht des Proteins.<sup>33-34</sup> Wechselwirkungen der Aminosäuren untereinander sowie mit dem umgebenden Medium bestimmen die Konformation des Moleküls, welche in der Sekundärstruktur beschrieben wird. Dabei sind die beiden Hauptstrukturelemente die  $\alpha$ -Helix- und die  $\beta$ -Faltblattstruktur (Abbildung 2.3). Während die eng geknäulte  $\alpha$ -Helix nur durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird, bildet die  $\beta$ -Faltblattstruktur auch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aus.<sup>33-34</sup> Bei der  $\beta$ -Faltblattstruktur kann man zwischen antiparallel (Abbildung 2.3) oder parallel unterscheiden, was sich auf die Ausrichtung der C- und N-Termini benachbarter Ketten zu einander bezieht. Während beim antiparallelen die C-Termini den N-Termini gegenüberstehen, stehen sich bei der parallelen Konformation jeweils die C- und C- bzw. die N- und N-Termini gegenüber. Die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente wird als Tertiärstruktur bezeichnet.<sup>33-34</sup> Die Quartärstruktur beschreibt die Anordnung verschiedener Proteindomänen zueinander, falls diese vorhanden sind.<sup>33-34</sup> Im physiologischen Zustand bilden Proteine ihren nativen Zustand aus, also ihre native Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur.<sup>33-34</sup> Durch diese native Struktur des Proteins wird dessen Funktion bestimmt. Eine Änderung der Umgebungsbedingungen kann zur sogenannten Denaturierung führen. Dies bezeichnet die Änderung der Proteinkonformation unter den vorherrschenden Bedingungen in einen thermodynamisch stabileren Zustand. Die Denaturierung kann durch Änderung der Polarität, des pH-Wertes und der Ionenkonzentration des Umgebungsmediums sowie der Temperatur als auch durch Wechselwirkungen mit Oberflächen induziert werden.<sup>33, 36-40</sup> Die Strukturänderung in Folge von Denaturierung kann einerseits zum Verlust der nativen Funktionen führen, andererseits durch Exposition bisher versteckter Bereiche schadhafte oder neue Funktionen hervorrufen.

Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Proteine näher beschrieben.

## 2.2.1. Fibrinogen

Fibrinogen, oder auch Humanes Plasma Fibrinogen (HPF), ist ein amphiphiles Glykoprotein des Blutplasmas mit einer Länge von etwa 45 nm und einem Molekulargewicht von ~340 kDa. Es besteht aus zwei identischen Teilen, welche sich je aus den drei Polypeptiden  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ - und  $\gamma$  zusammensetzen. Diese sind wiederum über Disulfidbrücken verbunden.<sup>12, 41-42</sup> Beide Teile bilden mit ihren N-Termini ein gemeinsames Zentrum, die E-Domäne, während die C-Termini der  $\beta\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten „D-Domänen“ an den Enden des linearen Proteins formen. (Abbildung 2.4) Die C-Termini der beiden  $\alpha\alpha$ -Ketten bilden globuläre Strukturen:  $\alpha$ C-Domänen, welche zentrumsnah intramolekular mit den Fibrinopeptiden (Fp)B der E-Domäne wechselwirken.<sup>12</sup>



**Abbildung 2.4:** Fibrinogen: (a) Schematische Darstellung eines trinodulär-stabförmigen HPF-Moleküls,  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ - und  $\gamma$  Ketten sind jeweils blau, rot und grün hervorgehoben. (b) Die Van-der-Waals-Darstellung der kristallographischen Struktur, wobei die Farben wieder den Ketten in (a) entsprechen. Die  $\alpha$ C-Region und die Fibrinopeptide A und B (FpA und FpB) sind in der kristallographischen Darstellung nicht gezeigt. © 2015 Köhler et al. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 41

Zu Beginn der Blutgerinnungskaskade kommt es zur Ausschüttung von Gerinnungsfaktoren wie z.B. HPF (Gerinnungsfaktor I) und dem Enzym Thrombin (Gerinnungsfaktor IIa). Thrombin wechselwirkt mit dem N-Terminus der  $\alpha\alpha$ -,  $\beta\beta$ -Ketten der zentralen E-Domäne unter Abspaltung von FpA und FpB. Das durch Thrombin „aktivierte“ HPF wird als Fibrin bezeichnet.<sup>42-43</sup> Durch die Abspaltung von FpA werden Wechselwirkungsstellen, die sogenannten „A-Knob“ frei, welche sich am Ende der  $\alpha$ -Ketten in der E-Domäne befinden.<sup>43</sup> Diese können mit den „A-Holes“ der  $\gamma$ -Ketten in den D-Domänen anderer Fibrin- und HPF-Moleküle wechselwirken und somit Protofibrillen mit einer Dicke von zwei-Molekülen bilden.<sup>43</sup> Durch die Abspaltung der FpB werden die

„B-Knobs“ in der  $\beta$ -Kette der E-Domäne frei und können mit den „B-Holes“ der  $\beta$ -Kette der D-Domäne wechselwirken. Dadurch wird das Protofibrillenwachstum gefördert. Durch das Freiwerden der FpB dissoziieren die  $\alpha$ C-Domänen von der E-Domäne und können somit mit anderen  $\alpha$ C-Domänen interagieren was die laterale Fibrinogenaggregation fördert.<sup>43</sup> Darüber hinaus können HPF-Moleküle untereinander über die  $\gamma$ -Kette in den D-Domänen ( $\gamma$ XL und D:D-Regionen) interagieren. Die D:D-Regionen sind an den Enden der D-Domänen zwischen den Aminosäureresten 275 und 300 der  $\gamma$  Ketten lokalisiert.<sup>43-44</sup> Diese Stellen fungieren als Bindeglied zwischen D-Domänen benachbarter HPF- und Fibrinmoleküle sowie zur Adhäsion von Endothelzellen. Die  $\gamma$ XL-Bereiche der  $\gamma$ -Kettenregionen in beiden D-Domänen sind an der Verbindung der D-Domänen verschiedener HPF-Moleküle und somit der Fibrillenbildung beteiligt.<sup>42, 45-47</sup> Während der Blutgerinnungskaskade interagieren die gebildeten Fibrinfasern mit dem Fibrinstabilisierenden Faktor (Gerinnungsfaktor XIII), welcher kovalente Bindungen zwischen benachbarten HPF-Molekülen induziert.

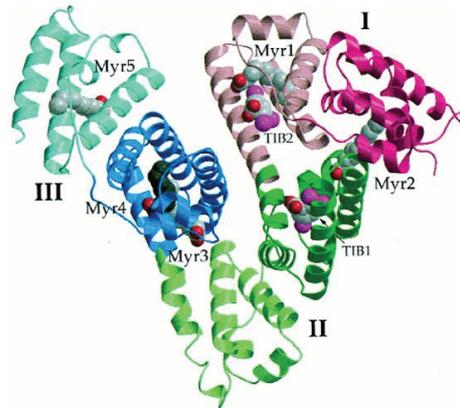
Neben seiner Funktion bei der Blutgerinnung ist HPF dafür bekannt, krankheitsbedingt im Körper und unter nichtphysiologischen Bedingungen außerhalb des Körpers  $\beta$ -faltblattreiche amyloide Fibrillen auszubilden.<sup>39, 48</sup> Thermisch denaturiertes Fibrinogen wird bereits in der Medizintechnik als Matrix zur Konstruktion biomedizinischer Geräte verwendet.<sup>39</sup>

### **2.2.2. Serum Albumin**

Humanes Serum Albumin (HSA) ist ein globuläres Protein bestehend aus 585 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 65 kDa. Das herzförmige Protein besteht aus drei  $\alpha$ -Helix reichen Domänen (~67 %) welche sich jeweils in 2 Unterdomänen unterteilen (Abbildung 2.5).<sup>49-51</sup>

HSA ist das am häufigsten vorkommende Protein (60 %) im Blut und ist dabei das Haupttransportprotein für unesterifizierte Fettsäuren, aber auch für eine große Anzahl an Metaboliten, Medikamenten und organischen Verbindungen.<sup>4</sup> Neben dem Stofftransport erfüllt es antioxidative und entzündungshemmende Funktionen.<sup>52</sup> Die verschiedenen Domänen haben dabei verschiedene Bindungseigenschaften. Während die Domäne IB Häm und Porphyrin bindet, haben die Domänen IIA und IIIA Bindungsstellen

für verschiedene Substanzen wie z.B. Fettsäuren.<sup>52</sup> Darüber hinaus verhindert HSA durch Regulierung des osmotischen Drucks Wasseransammlungen im Gewebe und trägt als amphoterer Protein zur Stabilisierung des Blutpuffers bei.<sup>53</sup>



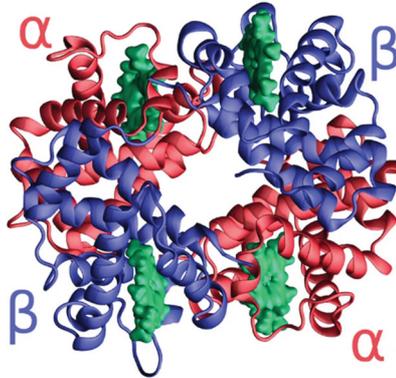
**Abbildung 2.5:** Albumin: Schematische Darstellung der HSA-Sekundärstruktur. Die Domänen sind farblich gekennzeichnet: I, rot; II, grün; III, blau. Die Subdomänen A und B innerhalb jeder Domäne werden in dunklen bzw. hellen Farbtönen dargestellt. Die Ligandenmoleküle sind raumfüllend dargestellt und die Atomarten entsprechend gefärbt (Kohlenstoff, grau; Sauerstoff, rot; Jod, magenta) Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 4 © 1998, Springer Nature

Wie bei anderen Proteinen auch, ist die Molekulare Struktur des HSAs temperaturabhängig und zeigt eine schrittweise Entfaltung zwischen 55 °C und 65 °C.<sup>54</sup> Eine derartige Änderung der Sekundärstruktur des HSAs, welche auch durch andere Denaturierungsmittel ausgelöst werden kann, führt zur amyloiden Fibrillenbildung.<sup>55</sup>

### 2.2.3. Hämoglobin

Hämoglobin (HGB) ist ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 64 kDa, welches aus je zwei äquivalenten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domänen besteht (141 und 146 Aminosäuren; Abbildung 2.6).<sup>38, 40</sup> Im nativen Zustand liegen ca. 70 % dieser Ketten als  $\alpha$ -Helix vor, der Rest als  $\beta$ -Faltblatt.<sup>40</sup> Jede  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne besitzt zusätzlich noch eine Häm-Gruppe, welche aus einer Komplexverbindung mit Eisen als Zentralion und einem Porphyrin-Ring als Ligand besteht. Die Hauptfunktion von HGB, der Gastransport im Blut, ist mit dieser Häm-Gruppe assoziiert,<sup>38, 56</sup> Dabei transportiert es vor allem Sauerstoff von den Lungen zu den Zellen verschiedener Gewebe, aber auch Teile des entstandenen CO<sub>2</sub> von den Zellen zurück zu den Lungen.<sup>38, 56</sup> HGB kann in zwei verschiedenen Konformation, der relaxierten R-Form und der gespannten T-Form auftreten. Nicht-oxidiertes HGB liegt fast ausschließlich in der T-Form vor. Bei der Oxygenierung bindet Sauerstoff an das Fe<sup>2+</sup>-

Ion der Häm-Gruppe und wird dabei von einem Histidin-Rest stabilisiert. Dadurch ändert sich die Konformation zur R-Form. Die Sauerstoffaffinität des HGB wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, z.B. sinkt diese mit sinkendem pH-Wert im Blut, steigendem CO<sub>2</sub>-Partialdruck und steigender Temperatur.<sup>3</sup>

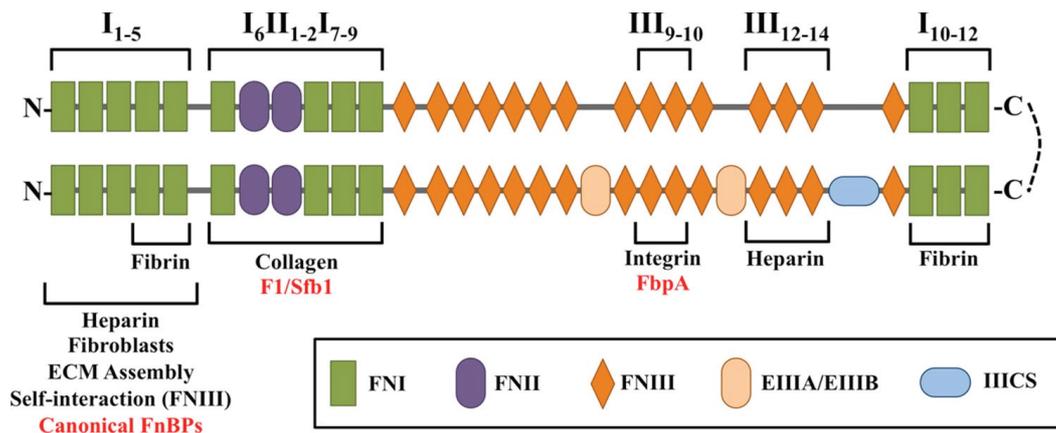


**Abbildung 2.6:** Hämoglobin: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von HGB. Die  $\alpha$ -Domänen sind rot,  $\beta$ -Domänen blau und Die eisenhaltigen Häm-Gruppen sind grün eingefärbt. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 57 © 2017, Springer Nature

#### 2.2.4. Fibronektin

Fibronektin (HFN) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 440 kDa. Es kommt sowohl im Plasma in einer geschlossenen, inaktiven Form vor, als auch in der extrazellulären Matrix, wo es zu unlöslichen Fibronektinfasern selbstassembliert.<sup>58-59</sup> Als Teil der extrazellulären Matrix spielt es eine wichtige Rolle bei Zellwachstum, -migration, -haftung und -differenzierung sowie bei der Interaktion von Zellen untereinander.<sup>58</sup>

HFN ist ein Dimer aus zwei annähernd identischen Strängen, die nahe ihrer C-Termini über Disulfid-Bindungen verbunden sind (Abbildung 2.7). Beide Stränge enthalten eine Vielzahl von Domänen. Aufgrund ihrer strukturellen Homogenität werden sie in die Typen I, II und III unterschieden.<sup>60</sup> Diese Typen bilden globuläre, in Reihe angeordnete Strukturen, welche einerseits zu einer verhältnismäßig großen Konturlänge des Proteins mit 120-160 nm führen. Andererseits sorgen sie für eine Verteilung der Bindungsstellen über die gesamte Länge des Proteins.<sup>59</sup> Im Gegensatz zu Typ III-Domänen werden Typ I- und II-Domänen durch Disulfidbrücken stabilisiert.<sup>58-59</sup> Da in und die Stabilisierung mittels Disulfidbrücken fehlt, ist eine Entfaltung durch mechanische Einwirkungen möglich. Dadurch können vorher verdeckte Bindungsstellen exponiert oder freie Bindungsstellen verdeckt werden. Auf diesem Weg ist eine Änderung der Quartärstruktur



**Abbildung 2.7:** Fibronectin: Schematische Darstellung der Multidomänenarchitektur eines zellulären Fibronectin-Heterodimers, bestehend aus 12 FN Typ I Wiederholungen (FNI), 2 FN Typ II Wiederholungen (FNII) und 15 FN Typ III Wiederholungen (FNIII). Der untere Zweig enthält Spleißvarianten des HFN-Strangs, die zwei alternativ gespleißten FNIII-Domänen (EIIIA/EIIB) und ein FNIII-Verbindungssegment (IICCS). Das Vorhandensein und die Anordnung der Domänen sind für die Interaktion mit bakteriellen Fibronectinbindeproteinen (FnBPs; rot) und Wirtsproteinen (schwarz) verantwortlich. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 60 © 2016 Hymes and Klaenhammer

des Proteins und somit eine Beeinflussung seiner Funktion und seiner Reaktivität möglich.<sup>59</sup> Aufgrund alternativen Splittings kann es zu unterschiedlichen Variationen des Fibronectins kommen, wie in Abbildung 2.7 angedeutet.<sup>58-59</sup> Alternatives Splicing bezeichnet einen Vorgang bei der Proteinsynthese, der es ermöglicht, aus einem Gen verschiedene Proteine zu synthetisieren.<sup>61</sup> Dies ermöglicht die Anpassung der Proteineigenschaften an verschiedene Ansprüche im Organismus, z. B. Veränderung der Bindungsaffinität bestimmter Zellen oder die Löslichkeit im Blutplasma.<sup>58-59</sup>

Durch die strangartige Domänenanordnung weist HFN eine Vielzahl an Funktionen und Bindungsmöglichkeiten auf, wie schematisch in Abbildung 2.7 gezeigt.<sup>62-63</sup> Diese Anordnung begünstigt ebenfalls die Assemblierung von HFN-Molekülen zu Fasern. Dabei lagern sich die Moleküle versetzt an, wodurch die ersten FNI-Domänen mit FNIII-Domänen benachbarter HFN-Moleküle wechselwirken. Neben zahlreichen Bindungsmöglichkeiten für Integrine, die Rezeptoren der Zelloberfläche, die die Zelle mit der extrazellulären Matrix verbinden, besitzt HFN diverse Bindungsstellen für andere wichtige Proteine, unter anderem für Fibrin. Diese heißen Fibrin I und Fibrin II und sind an den Enden lokalisiert (Abbildung 2.7).<sup>62-63</sup> Somit ermöglicht HFN die Zellmigration im Fibringerinnsel, die sich bei Entzündung oder Trauma bilden und die Blutzirkulation stören können. Möglicherweise ist HFN an der Beseitigung von Fibrinnetzwerken beteiligt.<sup>58</sup>

## 3. Stand des Wissens

Um den von der Natur inspirierten Ansatz des Bottom-up-Prinzips mittels Selbstassemblierung für die Herstellung von neuen Materialien zu nutzen, ist es essentiell Wege und Methoden zur Kontrolle und Beeinflussung der Selbstassemblierung zu finden. Da in der Natur Proteine in selbstassemblierten Strukturen als Grundbausteine fungieren, versucht man diesen Ansatz auch auf neuartige proteinbasierte Biomaterialien zu übertragen. Aus diesem Grund untersuchen viele Wissenschaftler den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Selbstassemblierung. Einerseits wird erforscht wie eine strukturierte Oberfläche die Orientierung von adsorbierten Proteinen und deren resultierenden Assemblierungsstrukturen beeinflusst, andererseits wird der Einfluss der Änderung der Umgebungsbedingungen von Proteinen auf deren Selbstassemblierung und die resultierenden Eigenschaften untersucht. Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über den Stand des Wissens in diesen Bereichen.

### 3.1. Organisation von Proteinen auf strukturierten Oberflächen

Die Assemblierung von Proteinen an Grenzflächen ist das Resultat verschiedener Kräfte, welche zwischen der Oberfläche und dem Protein wirken und wiederum von der Oberfläche, der Lösung und der Art der adsorbierten Proteine selbst beeinflusst werden.<sup>13</sup> Auch wenn die Adsorption von Proteinen auf Oberflächen von deren Größe, Ladung und Struktur abhängt,<sup>64</sup> sind es vor allem physikalisch-chemische Oberflächeneigenschaften, welche die Assemblierung auf der Oberfläche steuern können.<sup>13</sup> Neben der Oberflächenchemie und der Benetzbarkeit hat die Oberflächentopographie bzw. die Oberflächenstruktur einen starken Einfluss auf die Organisation und die resultierende Struktur der assemblierten Proteine.

Untersuchungen von Rechendorff *et al.* zeigten, dass eine Änderung der Oberflächeneigenschaften, wie zum Beispiel Rauheit im Nanometerbereich, die Menge an adsorbierten Proteinen beeinflusst.<sup>65</sup> Scopelliti *et al.* berichteten, dass eine Erhöhung der Nanorauheit der Oberfläche mit der Erhöhung der Porengröße im Nanometerbereich korreliert und dadurch die Proteinadsorption und -aggregation erhöht wird.<sup>66</sup> Dabei zeigten Proteine verschiedene charakteristische Schwellenwerte, bei welchen die

Nukleation und die Aggregation eintraten. Eine weitere wichtige Oberflächeneigenschaft ist die Krümmung. So wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass die Proteinkonformation nach der Adsorption von der Oberflächenkrümmung abhängt.<sup>67-69</sup> Beispielsweise bleibt die biologische Aktivität von adsorbiertem Lysin auf 4 nm großen Nanopartikeln erhalten, wohingegen 100 nm große Nanopartikel zum Verlust dieser Aktivität führen.<sup>70</sup> Adsorbiertes Laminin ändert mit Erhöhung des Nanopartikeldurchmessers von 45 auf 209 nm seine Orientierung von „side-on“ zu „end-on“, während HPF bei einer zu hohen Oberflächenkrümmung denaturieren kann.<sup>71</sup>

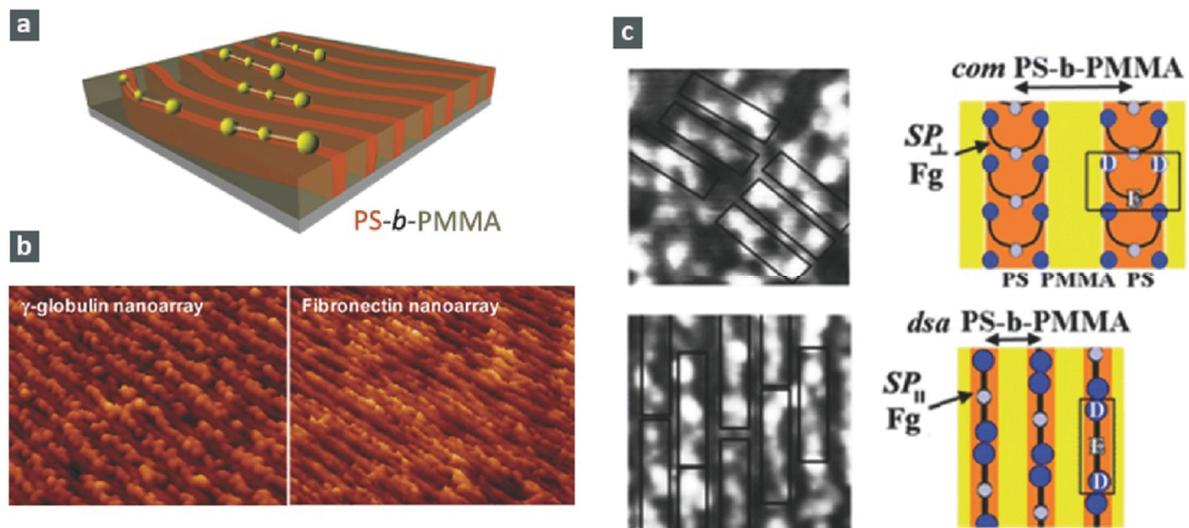
Diese Sensitivität von Proteinen auf die Änderung der Oberflächenstruktur im Nanometerbereich lässt den Schluss zu, dass die Organisation von Proteinen durch eine räumliche Anordnung topographischer Merkmale gesteuert werden kann. In diesem Zusammenhang haben sich polymere Oberflächen mit ihren einstellbaren physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften als besonders wirksam erwiesen, da sie aufgrund gut definierbarer Nanotopographien, also Mustern im Nanometerbereich, die Proteinadsorptionskonformation, Assemblierungspräferenzen, Bedeckungsdichten oder das Desorptionsvermögen beeinflussen können.<sup>13</sup> Hierbei spielen zwei Arten von Polymeren eine besondere Rolle: die Blockcopolymere und teilkristalline Polymere, welche im Folgenden kurz beschrieben werden.

### **3.1.1. Proteinadsorption auf Blockcopolymeren**

Ein Blockcopolymer besteht aus zwei oder mehreren unterschiedlichen Monomeren die in Blöcken identischer Menge angeordnet und über kovalente Bindungen verbunden sind.<sup>72</sup> Aufgrund der physikalischen Inkompatibilität der Blöcke kommt es beim Abkühlen aus der Schmelze zur Mikrophasenseparation. Die dabei entstehende Struktur hängt von verschiedenen Parametern, wie Molekulargewicht, dem Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter  $\chi$  und den Volumenanteilen der verschiedenen Blöcke ab.<sup>73</sup> Bei amorphen Diblockcopolymeren, bestehend aus zwei Blöcken (A und B), reichen diese Strukturen von Sphären, Zylindern oder gyroidalen Strukturen aus Block A bzw. B in der Matrix B bzw. A bis hin zu Lamellen aus A und B.<sup>73</sup> Bei Triblockcopolymeren<sup>74</sup> oder teilkristalline Blockcopolymere werden die resultierenden Strukturen komplexer bzw. es kommt bei der Strukturbildung zum Zusammenspiel von Phasenseparation und Kristallisation.<sup>75-76</sup> Diese verschiedenen Parameter können nun genutzt werden, um

Dünnschichten mit definierten Oberflächennanostrukturen aus Blockcopolymeren herzustellen.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Proteine bevorzugt auf einer der beiden Mikrophasen der chemisch inhomogenen nanostrukturierten Blockcopolymer Oberfläche adsorbieren (Abbildung 3.1a).<sup>77-81</sup> So wurde gezeigt, dass HPF, HFN, Globulin also auch HSA selektiv auf den PS-Domänen eines PS-*b*-PMMA Diblockcopolymer adsorbieren, was durch die hydrophilen/hydrophoben Wechselwirkungen der Proteine mit den polymeren Nanodomänen erklärt werden kann (Abbildung 3.1b).<sup>77</sup> Wie in Abbildung 3.1b ersichtlich, kann dieser Effekt genutzt werden, um die Protein-Hauptachse entlang der entstandenen Nanostruktur zu orientieren. Dies ist besonders gut für HFN mit seiner anisotropen Struktur sichtbar. Kumar *et al.* haben darüber hinaus beobachtet, dass die chemische Grenzfläche zwischen PS- und PMMA-Blöcken die Proteinadsorption und somit deren Orientierung entlang der Grenzfläche fördert.<sup>80</sup>



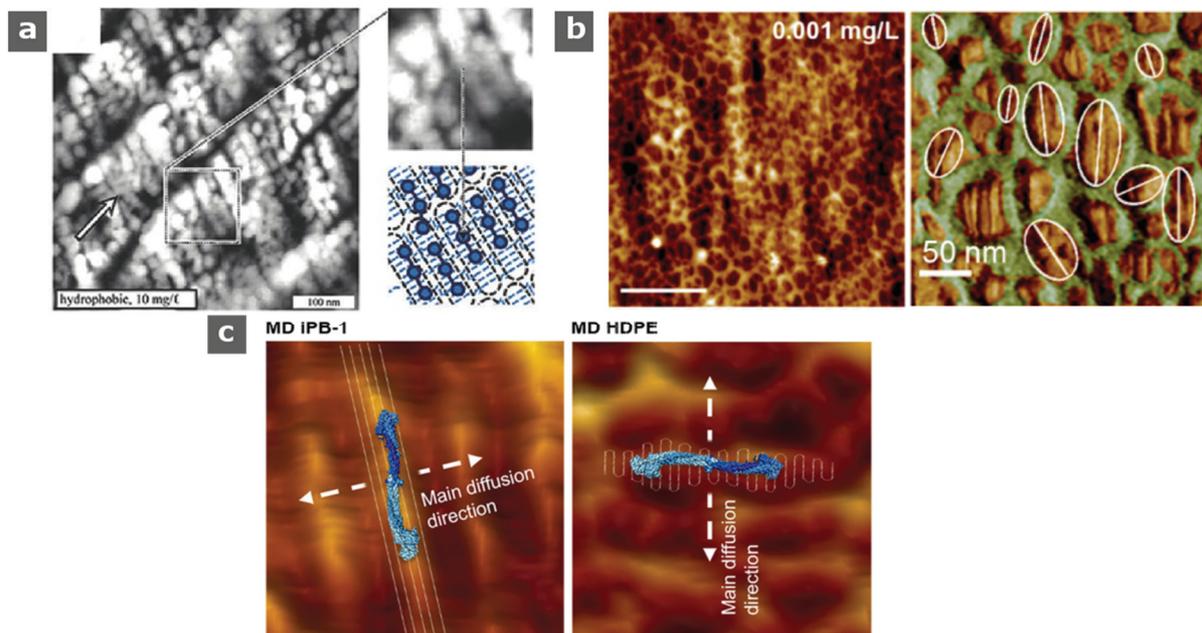
**Abbildung 3.1:** Proteinadsorption auf Blockcopolymeren: a) Schematische Darstellung der bevorzugten Proteinadsorption auf einer Phase des Polystyrol-block-Polymethylmetacrylat (PS-*b*-PMMA) Blockcopolymeres. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 13 © 2017 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim b) AFM-Bilder von selektiv adsorbierten Globulin und HFN auf der PS-Phase von PS-*b*-PMMA, Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 77 © 2010, The Royal Society of Chemistry c) HPF-Konformation in Abhängigkeit der Periodizität der Blockcopolymer-Nanodomänen. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 78 © 2016, American Chemical Society.

Neben der Kontrolle der Proteinorientierung durch Adsorption an der Grenzfläche kann auch die Konformation des adsorbierten Proteins beeinflusst werden, wie für HPF in Abbildung 3.1c gezeigt. Durch Reduzierung der Periodizität und somit der Domänengrößen wurde das HPF-Molekül aufgrund seiner bevorzugten Adsorption auf

der PS-Domäne gezwungen, seine Konfiguration von senkrecht zu parallel zur Lamellenorientierung zu ändern.<sup>81</sup> Somit ist die treibende Kraft der Ausrichtung von Proteinen auf nanostrukturierten Blockcopolymeren die chemische Inhomogenität der Oberfläche.

### 3.1.2. Proteinadsorption auf teilkristallinen Polymeren

Teilkristalline Polymere zeigen interessante Modelloberflächen um den Einfluss chemisch homogener und nanostrukturierter Oberflächen auf die Adsorption und Ausrichtung von Proteinen zu untersuchen. Aufgrund ihres Kristallisationsvermögens bilden sie teilweise hochgeordnete Strukturen auf der molekularen und supramolekularen Ebene. So beeinflusst die regelmäßige Anordnung kristalliner Lamellen eines teilkristallinen UHMWPE-Filmes die Proteinorientierung und -anordnung



**Abbildung 3.2:** Proteinadsorption auf teilkristallinen Polymeren: HPF-Adsorption auf nanostrukturierten teilkristallinen Polymeroberflächen; a) AFM-Höhenbild von HPF auf schmelzgezogenem UHMWPE, wobei die lamellaren Kristalle die HPF-Anordnung steuern (Proteinkonzentration von  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 82 © 2011 American Chemical Society b) AFM-Höhenbild der Netzwerkstruktur von adsorbierten HPF auf schmelzgezogenem iPB-1-Film. Der Skalenbalken entspricht 300 nm. Im rechten Bild ist das HPF-Netzwerk und die „Eyelet“-Struktur grün hervorgehoben und die Orientierung der ellipsenförmigen „Eyelets“ entlang der Nadelkristalle markiert. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 83 © 2017 American Chemical Society c) AFM-3D-Topographiebilder von schmelzgezogenem iPB-1- und HDPE-Oberflächen mit entsprechender HPF-Orientierung und dessen bevorzugter Diffusionsrichtung. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 84 © 2018 American Chemical Society

an der Polymeroberfläche.<sup>82</sup> Keller *et al.* zeigten, dass sich HPF entlang der charakteristischen Oberflächenstruktur aus gestapelten lamellaren Kristallen des UHMWPEs anordnet.<sup>82</sup> Bei einer annähernden Monolagenbedeckung lagert sich HPF bevorzugt mit seiner Hauptachse parallel zur kristallinen Lamelle eines UHMWPE, dessen Dimensionen ähnlich dem des HPF-Moleküls sind, an (Abbildung 3.2a).<sup>82</sup> Die zugrundeliegenden Mechanismen wurden von Kastantin *et al.* untersucht.<sup>85</sup> Sie beobachteten eine langsame anisotrope Diffusion einzelner HPF-Moleküle in einer Proteinschicht auf nanostrukturierten HDPE-Filmen. Einzelne Proteine bewegten sich bevorzugt senkrecht zur Längsachse der Lamellen (Abbildung 3.2c).<sup>85</sup> Sie vermuteten, dass die nanotopographisch induzierte anisotrope Diffusion die Voraussetzung sei, um die Bildung der geordneten Proteinschicht zu induzieren.

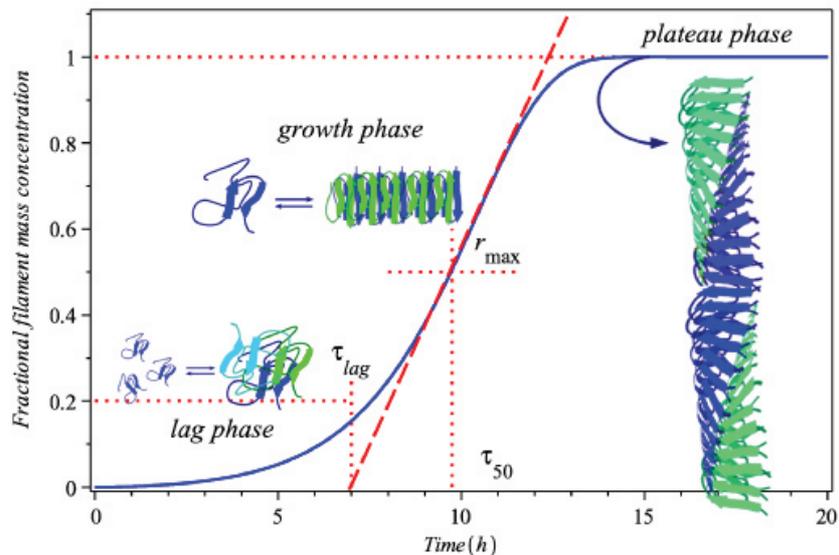
Dass eine kristalline Nanostruktur die Diffusion und Ausrichtung von Proteinen beeinflusst, wurde zusätzlich für nanostrukturierte isotaktische-Polybuten-1 (iPB-1)-Filme gezeigt (Abbildung 3.2b). Zhang *et al.* berichteten eine geordnete Adsorption von HPF auf teilkristallinen iPB-1-Filmen.<sup>83</sup> Sie untersuchten dabei den Einfluss verschiedener chemisch homogener aber topographisch unterschiedlicher nanostrukturierter iPB-1-Filme. Die Änderung der Polymerkristallbreite führte zur Orientierungsänderung des Fibrinogens von „side-on“ zu „end-on“ sowie der Änderung der Packungsdichte auf der Oberfläche.<sup>83</sup> Nadelkristalle mit einer Breite geringer als die Hauptachsenlänge des HPF unterstützten die „side-on“ Adsorption und eine anisotrope Netzwerkbildung. Ist hingegen die Kristallbreite vergleichbar mit der Hauptachsenlänge des HPF kommt es zur Förderung der „end-on“ Konformation und somit zur Unterdrückung der Netzwerkbildung. Auch hier wurde eine anisotrope Diffusion von HPF senkrecht zur Längsachse der Nadelkristalle beobachtet.<sup>84</sup> Zhang *et al.* erklärten dies durch die geordnete Adsorption von HPF parallel zu den iPB-1-Nadelkristallen. Dabei erlaubt die Flexibilität des HPF-Moleküls in dessen Coiled-coil-Region das partielle Ablösen einzelner Bereiche des Moleküls und somit ein Kriechen der Moleküle über die Oberfläche entlang deren Nebenachse (Abbildung 3.2c).<sup>84</sup>

Neben der Anordnung der Kristalle kann auch die Orientierung der Polymerketten in den Kristallen die Orientierung der adsorbierten Proteine auf der Oberfläche beeinflussen. Dies wurde am Beispiel von  $\alpha$ -helikalen Poly(L-Lysin) ( $\alpha$ -PLL) gezeigt, welches als Modellsystem für  $\alpha$ -helix-reiche Proteine wie HSA oder HPF verwendet wurde.<sup>86</sup> Hier zeigten die Autoren, dass die Polymerkettenorientierung in der UHMWPE-

Oberfläche eine molekulare Ausrichtung von  $\alpha$ -PLL induzierte.<sup>86</sup> Dies wurde durch das Verhältnis von intermolekularem Abstand der PE-Ketten und der Steigungshöhe von  $\alpha$ -PLL erklärt. Bisher wurde noch nicht untersucht, ob eine (sub-) Nanostruktur, wie die Oberfläche eines PE-EK, wirklich einen Einfluss auf die Ausrichtung der entsprechenden Proteine hat.

### **3.2. Assemblierung von homogenen Proteinstrukturen**

Neben Oberflächen kann auch die Änderung der Umgebungsbedingungen die Induzierung der Selbstassemblierung von Proteinstrukturen kontrollieren. Die Selbstassemblierung von Proteinen ist ein gängiger Prozess in vielen natürlichen Systemen. Proteine haben die intrinsische Fähigkeit, sich selbst zu Partikeln und langen festen Nanofasern, wie Protein-Nanofasern (PNF), zu assemblieren. Dieses Verhalten kann beispielsweise Teil eines natürlichen Prozesses sein, welcher durch Enzyme gesteuert wird, wie die Bildung des Fibrinnetzwerkes durch die Thrombinaktivierung (Siehe Abschnitt 2.2.1) oder die Kollagenfaserbildung durch die prokollagene Proteinaseaktivierung. Neben diesen nützlichen kann dieser Prozess aber auch zu Strukturen mit unerwünschten Eigenschaften, wie der Bildung von selbstassemblierten Amyloidfasern bzw. -plaques führen. Die Ablagerung dieser aus Prionen (infektiöse Proteine) bestehenden Strukturen wird im menschlichen Körper mit verschiedenen Krankheiten wie Alzheimer, Typ-II-Diabetes und dem Parkinson-Syndrom assoziiert.<sup>87</sup> Meist geht die Bildung dieser amyloiden Strukturen mit einer Fehlfaltung der Proteine einher, welche zur Ausbildung der charakteristischen  $\beta$ -Faltblattstruktur in den Fasern führt. Eine Fehlfaltung der Prionen Amyloid- $\beta$  und Tau beispielsweise führt zur Plaquebildung im menschlichen Gehirn, welche für Oligodendrozyten zytotoxisch ist.<sup>88</sup> Dies ist eine der Hauptursachen für die neurodegenerativen Alzheimer-Erkrankung. Nichtsdestotrotz müssen amyloide Fasern nicht immer schädlich für den Körper sein: Wissenschaftler haben gezeigt, dass meist nur die kleinen Anfangsstadien der Amyloidfaserbildung, Oligomere und Protofibrillen, schädlich sind.<sup>89</sup> Gerade deswegen und wegen der hervorragenden PNF-Materialeigenschaften sind selbstassemblierte Amyloidfaser-ähnliche Strukturen zur Erzeugung biologisch inspirierter Materialien in den Fokus der Wissenschaft gerückt.

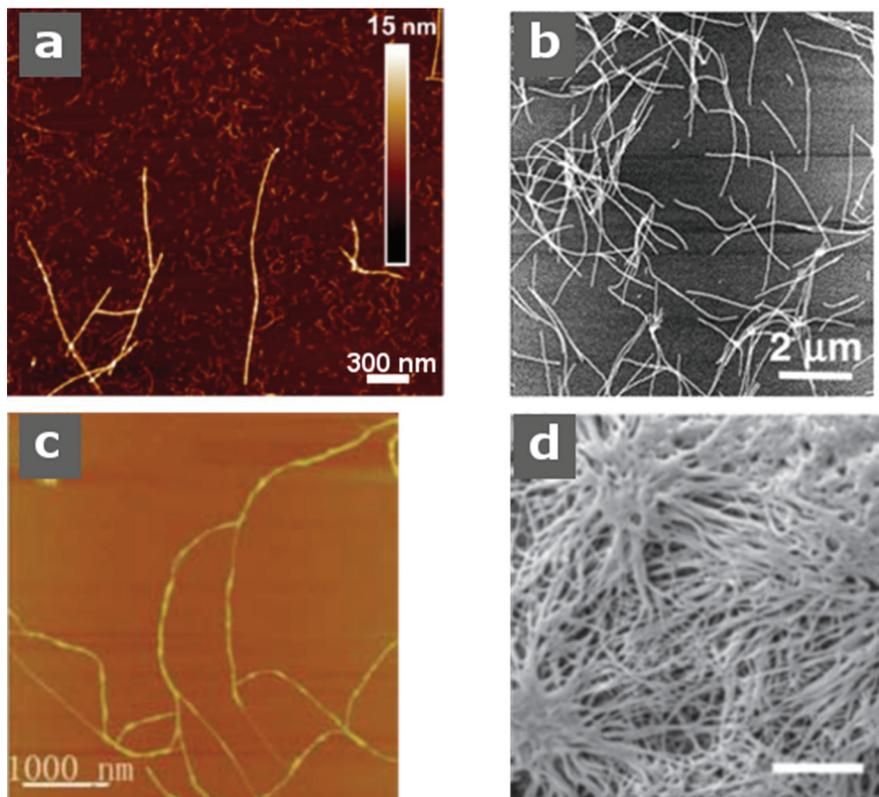


**Abbildung 3.3:** Sigmoidales Massenwachstumsprofil der Fibrillenbildung. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 37 © 1989, CCC Republication.

Es wurde versucht die Kinetik der Amyloidbildung mittels verschiedenster Modelle zu beschreiben. Aufgrund der hohen Vielzahl an Proteinen, deren komplexer Struktur und der daraus resultierenden Vielzahl an möglichen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen und Lösungsmedien, konnte bisher kein allgemein gültiges Modell beschrieben werden. Jedoch erfolgt die Assemblierung immer nach einem ähnlichen Prinzip. Abbildung 3.3 zeigt dies in der zeitlichen Entwicklung des Fasermassenanteils gemessen an der Gesamtmenge an Protein in einer Lösung.<sup>37</sup> Der Verlauf der Kurve lässt sich in drei verschiedene Phasen unterteilen: Der anfangs flache exponentielle Anstieg des Graphen wird als „Lag-Phase“ bezeichnet.<sup>37</sup> Sie ist definiert als der Zeitraum, in dem keine messbare Aggregat- bzw. Faserbildung auftritt.<sup>37</sup> Es ist anzunehmen, dass in der „Lag-Phase“ die Aktivierung der Proteine stattfindet, also die Entfaltung und/oder Dissoziation einzelner Proteine zu reaktiven Monomeren. Diese sind in der Lage, durch Agglomeration Keime zu bilden, die die Energie des Systems verringern und so als Ausgangspunkt für die Faserbildung dienen.<sup>37</sup> Weil die charakteristischen  $\beta$ -Faltblattstrukturen über intermolekulare H-Brücken miteinander wechselwirken, besteht die Möglichkeit, dass sich die Proteine gegenseitig stabilisieren und folglich anordnen. Anschließend ist ein annähernd lineares Wachstum zu beobachten, wobei die maximale Wachstumsgeschwindigkeit bei 50 % Monomerumsatz erreicht ist. Zum Ende der Faserbildung flacht die Kurve ab und nähert sich einem Grenzwert an, bei dem theoretisch 100 % der Monomere in Fasern bzw. Aggregaten eingebaut sein sollten.<sup>37</sup> Wie die einzelnen Schritte genau ablaufen, ob sie irreversibel oder Gleichgewichtsreaktionen sind, inwiefern sekundäre Prozesse eine

Rolle spielen und ob die aufgestellten Theorien systemübergreifend gelten, konnte noch nicht endgültig geklärt werden.<sup>37</sup> Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die Zugabe eines zweiten Proteins die „Lag-Phase“ verkürzen und somit die Assemblierung beschleunigen kann. So kann die Zugabe von vorgeformten Nanofasern die Selbstassemblierung des N-Terminus und der mittleren Region des eukaryontischen Translations-Freisetzungsfaktors, Sup35p, des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae* erzeugen und somit dessen Aggregation beschleunigen (Abbildung 3.4b).<sup>90</sup>

Um die amyloide Faserbildung auf andere Proteine zu übertragen, wurde das Potential verschiedener Methoden zur Induzierung entsprechender Konformationsübergänge, wie der  $\beta$ -Faltblattbildung, und somit zur Selbstassemblierung von Proteinmolekülen untersucht. Dabei zeigte sich, dass z.B. ein niedriger pH-Wert,<sup>91, 94-95</sup> Temperaturänderung,<sup>96</sup> Änderung der Ionenkonzentration<sup>97</sup> und Zugabe von Denaturierungsmittel<sup>92</sup> dies ermöglichen kann. Der weitaus größte Teil der bisherigen



**Abbildung 3.4:** Selbstassemblierte PNF: AFM Höhenbilder von PNF (a) aus Ovalbumin gebildet bei pH 2 und 90 °C; Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 91 © 2012 American Chemical Society (b) aus Sup35p nach Zugabe von Nanofasern als Keime Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 90 © 2003 National Academy of Sciences; und (c) aus HPF gebildet in 80 Vol.% Ethanol bei 37 °C. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 92 © 2008 The Royal Society of Chemistry. (d) REM-Aufnahmen eines Fibrinogen-Gerüsts nach Zugabe von 2,5-fach übersättigter phosphatgepufferter Salzlösung. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 93 © 2009, CCC Republication

Forschung an PNF konzentriert sich, neben Prionen, unter anderem auf Proteine wie Lysozym,  $\beta$ -Lactoglobulin und Seidenproteine. So berichteten Krebs *et al.* über die Bildung von amyloiden Nanofasern aus dem Wildtyp-Lysozym von Hühnern bei einem pH von 2,0.<sup>94</sup> Arnaudov *et al.* untersuchten die Auswirkungen der Temperatur auf die Entfaltung der Proteinstruktur eines anderen Hühnereiweiß-Lysozyms bei einem pH-Wert von 2 und dessen Einfluss auf die Bildung von Nanofasern.<sup>95</sup> Dabei fanden sie heraus, dass ein niedriger pH-Wert in Kombination mit Temperaturen nahe der Mittelwerttemperatur für die Proteinentfaltung, also einer partiellen Entfaltung, die Bildung von PNF fördert. Akkermans *et al.* berichteten über die Bildung von  $\beta$ -Lactoglobulin-Nanofasern durch Inkubation der Proteinlösungen mit einem pH von 2,0 bei 80 °C für etwa 20 Stunden.<sup>98</sup> Ähnliches wurde auch von Lara *et al.* für das Ovalbumin bei pH 2 und 90 °C berichtet.<sup>91</sup> Sie beobachteten, dass die Salzkonzentration der Lösung und die Assemblierungszeit sowohl die äußere, als auch die innere PNF-Struktur und somit auch die Bildung von amyloiden Strukturen beeinflusst. Die Änderung der inneren Struktur resultierte in der Änderung der mechanischen Eigenschaften. Die Studien von Lara *et al.* und Arnaudov *et al.* deuten darauf hin, dass die Bildung von PNF durch den pH-Wert und die Metallionenkonzentration in der Lösung beeinflusst wird (Abbildung 3.4a).<sup>91, 95</sup> Dies wurde unter anderem von Usov *et al.* bestätigt, der die amyloide Faserbildung für Albumin beobachtete.<sup>99-100</sup> Die Struktur der entstandenen PNF konnte über die Assemblierungszeit gesteuert werden. So bildeten sich anfangs flexible verdrehte Bandstrukturen, welche sich durch Anlagerung weiterer Proteine zu festen nanoröhrenartigen Strukturen formten.<sup>101</sup> PNF können aber auch durch die Zugabe verschiedener Proteindenaturierungsmittel wie Ethanol, Trifluorethanol (TFE)<sup>102</sup> und Natriumdodecylsulfat<sup>103</sup> zur Proteinlösung erzeugt werden.

Die Selbstassemblierung zu PNF wurde auch für Proteine berichtet, die unter physiologischen Bedingungen eine enzymatische Aktivierung benötigen. So wurde gezeigt, dass die Zugabe von Ethanol<sup>92</sup>, die Reduktion des pH-Wertes auf 2<sup>104</sup> oder aber die Kontrolle der Konzentration an Salzionen<sup>93</sup> die natürliche Faserbildung von HPF auch in Abwesenheit von Thrombin induziert (Abbildung 3.4c-d). Hierbei wird vermutet, dass die partielle Entfaltung des HPF ähnlich fungiert wie das Enzym Thrombin. Vergleichbares wurde für Fibronectin beobachtet.<sup>105</sup> Hier führte eine partielle Entfaltung durch Ethanol zur Assemblierung der Proteine zu PNF. Weiterhin berichteten Dong *et al.*

über ein Verfahren zur Herstellung von Kollagen-Nanofasern vom Typ II durch Nachahmung der Selbstassemblierung von Kollagen in simulierter Körperflüssigkeit.<sup>106</sup>

Auch die Indizierung von Scherkräften in nativen Proteinlösungen kann die Selbstassemblierung von Proteinen zu Fasern über Ausrichtungsprozesse hervorrufen. Dieser Mechanismus wird beispielsweise für die Herstellung von Proteinfasern mittels eines Extrusionsverfahren verwendet. So berichteten Raoufi *et al.*, dass sowohl HFN-, als auch Kollagen- oder HPF-Fasern auf diese Weise hergestellt werden können.<sup>20</sup> Dies geschah, indem sie die nativen Proteine durch eine nanoporöse anodische Aluminiumoxidmembran (Porengröße: 20 und 200 nm) pressten. Sie zeigten, dass Scherspannungen eine partielle Entfaltung des HFNs induzieren und somit intermolekulare Wechselwirkungen hervorrufen, welche zu einer seitlichen Anordnung und schließlich zur Faserbildung führen.<sup>20</sup> Alle diese Studien zeigen, dass die Selbstassemblierung ein grundlegendes Phänomen für Proteine und die vorherrschende Methode zur Bildung von PNF ist. Die Arbeiten zeigen weiter, dass eine Faserbildung im nativen Zustand, wie bei HPF, HFN oder Kollagen, keine Voraussetzung für die Selbstassemblierung von Proteinen darstellt.

### **3.3. Assemblierung von heterogenen Proteinfasern**

Um die Eigenschaften und Funktionen von PNF zu erweitern, ist die Erzeugung heterogener PNF durch gleichzeitige Assemblierung verschiedener Proteine, die Koassemblierung, eine vielversprechende Methode. Die Koassemblierung von Proteinen ermöglicht es durch Integration verschiedener Proteine in einer Faser deren Funktionen und Eigenschaften zu kombinieren. Forscher entwickelten verschiedene Methoden zur Herstellung von PNF aus mehr als einem Protein, wie zum Beispiel Elektrosponnen oder Extrusionen, die zur Bildung von faserigen Suprastrukturen führten. Der Mechanismus der Selbstassemblierung wurde ebenfalls intensiv untersucht. In diesem Abschnitt werden die zwei verschiedenen Methoden zur Herstellung von heterogenen Proteinfasern kurz vorgestellt und anschließend wird auf den aktuellen Stand der Forschung im Bereich der Selbstassemblierung von hPNF eingegangen.

### 3.3.1. Elektrosponnen von heterogenen Proteinfasern

Mit dem Elektrosponnverfahren wurden zunächst Polymerfasern mit einem Durchmesser im Mikrometerbereich hergestellt. Die Literatur beschreibt zwei verschiedene Hauptprinzipien des Elektrosponnens, das Nass- und das Schmelzspinnen. Für beide Prinzipien sind die Hauptkomponenten des Aufbaus ähnlich, eine Spinndüse, eine Spritzenpumpe, eine Gleichstromversorgung und ein geerdeter Kollektor. Die Prinzipien basieren auf elektrischen Kräften, die für die Faserbildung verantwortlich sind. Durch Einstellen der Spannung, des Düsendurchmessers, des Abstandes zwischen Spinndüse und Kollektor sowie der Konzentration in der Lösung ist es möglich, den Faserdurchmesser zu steuern.

Es wurde gezeigt, dass es möglich ist, natürliche matrixbildende Proteine wie Kollagen,<sup>107</sup> Elastin und HPF oder das gebräuchlichste Beispiel für natürliche Proteinfasern, Spinnenseide, zu verwenden. Dass Proteine, welche zum Elektrosponnen verwendet werden, auch im nativen Zustand Fasern bilden, ist keine Voraussetzung. Dies wurde durch das Spinnen von globulären Proteinen wie HSA, HGB oder Myoglobin gezeigt.<sup>14, 108</sup>

Seit der Einführung des Elektrosponnens zur Herstellung von Gerüsten im Tissue Engineering auf Basis von Biopolymeren und/oder Proteinen versuchten Forscher, die sich variierende Zusammensetzung der ECM nachzuahmen.<sup>14, 109-111</sup> Zu den ersten Forschern auf diesem Gebiet gehören Boland *et al.* und später Buttafoco *et al.*, die das Elektrosponnen von heterogenen Nanofasern aus einer Kollagen-Elastin-Mischung beschrieben. Sie beobachteten homogene Fasern mit Durchmessern im Bereich von 200 bis 800 nm, abhängig vom Gewichtsverhältnis von Kollagen zu Elastin in der Spinnlösung.<sup>109, 111</sup> Eine direkte Unterscheidung zwischen verschiedenen Proteinen in den Fasern war weder mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM)<sup>84</sup> noch mit dem Rasterelektronenmikroskop<sup>86</sup> möglich. Beide kamen zu dem Schluss, dass die Zusammensetzung der Fasern gleich der Verteilung der Proteine in der Mischlösung ist. Dies wurde jedoch nicht bewiesen. Zur Stabilisierung der gebildeten Fasern war nach dem Spinnen ein Vernetzungsschritt mit Glutaraldehyd oder Carbodiimid / N-Hydroxysuccinimid (NHS) erforderlich, da sich die Fasern sonst sofort in Wasser gelöst hätten.<sup>111</sup> Der Vernetzungsschritt zeigt, dass während des Spinnvorgangs keine kovalenten Bindungen gebildet werden. Darüber hinaus schlugen Buttafoco *et al.* vor,

dass die Anordnung der Proteine auf hydrophoben Wechselwirkungen basiert, die durch das verwendete Natriumchlorid in der Spinnlösung erzeugt werden. Es ist jedoch zu beachten, dass die verwendete Hochspannung und damit die höhere Temperatur sowie die verwendeten Lösungsmittel 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol (HFIP) oder 10 mM Salzsäure die Sekundärstruktur der Proteine beeinflussen, was zu einer teilweisen Entfaltung führen könnte. Diese Veränderungen können außerdem für die Anordnung der Proteine in den Fasern verantwortlich sein, da HFIP die Bildung von  $\alpha$ -helikalen Strukturen oder die Freilegung von verdeckten Wechselwirkungsregionen induziert.<sup>112</sup>

Weitere Proteine wurden mittels Elektrospinnens kombiniert. Mehrere Studien konzentrierten sich auf das gut untersuchte Seidenfibroin für welches koassemblierte faserige Strukturen mit Elastin<sup>113</sup> und Kollagen<sup>114</sup> berichtet wurden. Um stabile faserige Strukturen aus der Mischung von Seidenfibroin und Elastin zu bilden, war eine Vernetzung mittels Genipin erforderlich.<sup>113</sup> Für die Bildung von koassemblierten Fasern aus Kollagen und Seidenfibroin wurde dagegen kein Vernetzungsmittel benötigt. In diesem Fall wurden die koassemblierten Fasern aus einer Lösung mit beiden Proteinen hergestellt.<sup>114</sup> Ein Entstehungsmechanismus wurde jedoch nicht beschrieben. Ausgehend von den Entstehungsbedingungen war eine Entfaltung und Veränderung der Sekundärstruktur zu erwarten, ähnlich der bisherigen Beschreibungen für die Bildung heterogener Kollagenfasern. Für beide Studien wurde die Koassemblierung nicht direkt bestätigt, jedoch angenommen. Nach Zugabe des zweiten Proteins war die Identifizierung verschiedener sowie einzelner Proteinmoleküle innerhalb der Fasern nicht möglich. Allerdings sind die Fasereigenschaften, wie Durchmesser und Länge, abhängig von der Zusammensetzung und dem Verhältnis der Proteine zueinander.<sup>113-114</sup> Beide Beispiele zeigen, dass die Zusammensetzung die resultierende Struktur oder Fasereigenschaft beeinflusst.

Ein weiteres interessantes System wurde von Ravichandran *et al.* beschrieben, die die Koassemblierung von drei verschiedenen Proteinen zeigten.<sup>115</sup> Sie strebten die Herstellung einer ECM-ähnlichen faserigen Gerüststruktur auf Basis von HGB, Gelatine und HPF an. HGB und Gelatine wurden in TFE gelöst und mit dem in HFIP gelösten HPF vermischt. Die resultierenden Faserstrukturen wurden mittels Phytinsäure vernetzt. In diesem Fall findet die Vernetzung auf der Grundlage der Bindung zwischen Phytinsäureanionen und Kationen der Proteine statt.<sup>115</sup> Die Vernetzung beeinflusste den Faserdurchmesser und erhöht ihn von  $290 \pm 130$  nm für 1 % Phytinsäure auf

337 ± 113 nm für 5 % Phytinsäure. Somit ist der Vernetzer in den Proteinfasern enthalten, welcher die Fasern oder die daraus resultierenden Eigenschaften der Gerüststruktur beeinflussen kann. Ein negativer Effekt der Vernetzung zur Biokompatibilität und Zellproliferation wurde jedoch nicht beobachtet. Weiterhin wurde davon ausgegangen, dass die hohe Sauerstoffbindungsfähigkeit des HGBs in den Fasern für die Regeneration des ischämischen Myokards verantwortlich ist und somit als Gerüst für myokardiales Tissue Engineering geeignet ist.<sup>115</sup> Auch die anderen Beispiele zeigen, dass die Koassemblierung von zwei verschiedenen Proteinen zu einer Faser die resultierenden Eigenschaften beeinflusst. Die Integration von Elastin in Seidenfibroinfasern beschleunigte die Reepithelisierung und den Wundverschluss der resultierenden Gerüststrukturen. Darüber hinaus erhöhte die Integration von Kollagen in Seidenfibroin die Adhäsion von menschlichen Brust-Epithelzellen im Vergleich zu reinem Seidenfibroin signifikant und verbesserte so die Zell-ECM-Interaktionen in konstruierten 3D-Gewebemodellen.<sup>114</sup>

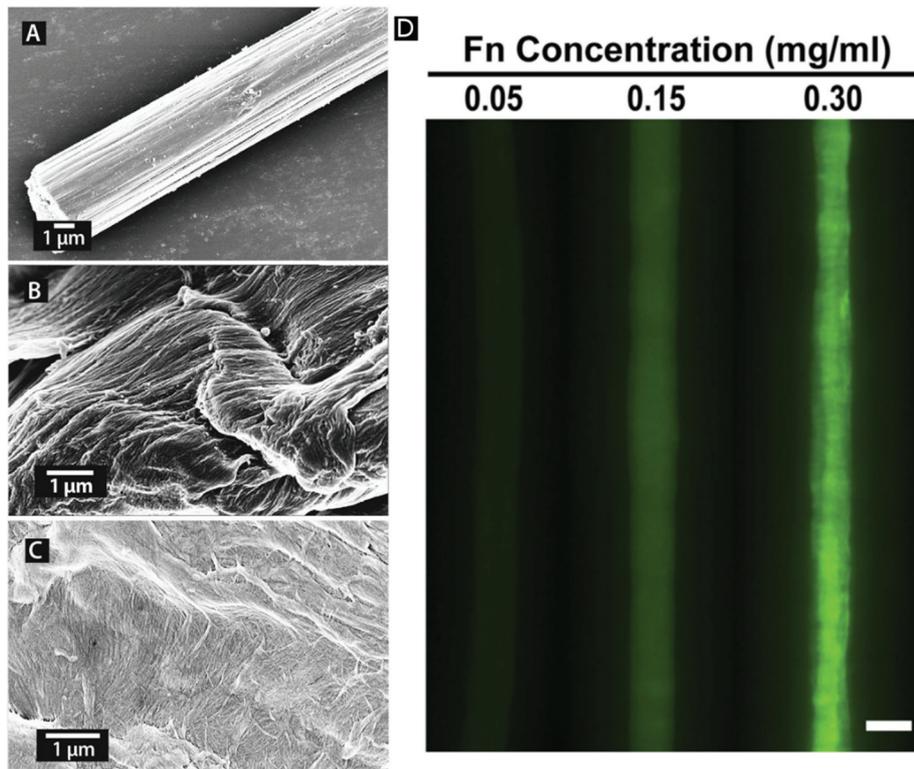
Zusammenfassend lässt sich Elektrospinnen als geeignetes Werkzeug zur Koassemblierung verschiedener Proteine zu Faserstrukturen beschreiben. Darüber hinaus sind die Eigenschaften der resultierenden Struktur durch Variation der Zusammensetzung steuerbar. Häufig wird jedoch ein Vernetzer benötigt, um die verschiedenen Moleküle in den resultierenden Faserstrukturen zu stabilisieren und zu binden. Oftmals fehlt jedoch der direkte Nachweis der heterogenen Zusammensetzung der Proteinfaser.

### **3.3.2. Extrusion von koassemblierten Proteinfasern**

Eine weitere Technik zur Herstellung faseriger Strukturen aus (ko-)assemblierten Proteinen ist die Extrusion, welche dem Elektrospinnen ähnelt. Anstelle eines elektrischen Feldes, welches die Proteine in der Faser ausrichtet, wird eine proteinhaltige Lösung durch eine Nadel auf ein Substrat oder in ein Koagulationsbad gedrückt. Die daraus resultierende Scherspannung, welche beim Passieren der Nadel aufgrund der zunehmenden Strömungsgeschwindigkeit innerhalb der Proteinlösung entsteht, führt zu einer einachsigen Ausrichtung der Proteinmoleküle innerhalb der Faserstruktur. Underwood *et al.* berichteten in einer der ersten Studien über die Koassemblierung von HPF und HFN zu "Kabeln" mittels Extrusion. Eine HPF und HFN enthaltende Pufferlösung,

welche zusätzlich Harnstoff enthält, wurde durch eine Spinndüse in ein Koagulationsbad mit einem pH-Wert von 2 gepresst. Der zugesetzte Harnstoff führte zu einer teilweisen Entfaltung von HFN<sup>116</sup> sowie HPF.<sup>117</sup> Diese partielle Entfaltung ermöglicht die Aggregation der Proteine im Koagulationsbad. Der niedrige pH-Wert des Koagulationsbades bewirkt zudem die Interaktion beider Proteine, was die Selbstassemblierung von Proteinen induziert, wie in Abschnitt 3.2 unter anderem für HPF gezeigt.<sup>91, 99, 104, 118-119</sup> Es wird erwartet, dass die Konformationsänderungen in den Proteinen für die Selbstassemblierung verantwortlich sind. Daher ist es schwierig zu bestimmen, welche Faktoren dieser Extrusionstechnik für die Koassemblierung verantwortlich sind. Insbesondere, da Raoufi *et al.* über die Bildung von HFN-Fasern durch Extrusion ohne Koagulationsbad oder Harnstoff berichteten (siehe Abschnitt 3.2).<sup>20</sup> Solche scherspannungsinduzierten Veränderungen können auch für die Erzeugung von koassemblierten Proteinfasern genutzt werden (Abbildung 3.5A-C). So wurden beispielsweise heterogene Fasern aus Kollagen und HFN, Kollagen und Elastin sowie Myosin und Aktin hergestellt.<sup>19</sup> Mit der Variation der Proteinkonzentration und der Membranporengröße war es möglich, den Durchmesser der resultierenden Faserstrukturen in Bereichen zwischen 15 nm bis 151 nm zu kontrollieren. Sich bildende Einzelfasern lagern sich direkt nach der Extrusion zu größeren Faserbündeln im Mikrometerbereich zusammen. Die Existenz von Kollagen und HFN wurde in einem solchen Faserbündel mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Es war jedoch nicht möglich zu bestimmen, ob sich wirklich beide Proteine in einer Faser befinden und wie die Proteinmoleküle verteilt sind.<sup>19</sup> Jedoch ist die Existenz einer heterogenen Faser sehr wahrscheinlich. Um diese Annahme zu belegen, ist jedoch eine Analyse der unbekannt inneren Faserstruktur erforderlich.

Die Bildung von heterogenen Fasern aus Seidenfibroin und HFN wurde von Jacobsen *et al.* gezeigt. Diese heterogenen Fasern wurden mittels Nassspinnen in Kombination mit einem Koagulationsbad (70 % Methanol) hergestellt.<sup>18</sup> Jacobsen *et al.* nahmen an, dass eine Kombination verschiedener Wechselwirkungen zur Koassemblierung führte. Neben ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen sollte HFN intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter mit Seidenfibroinketten bilden, was zu einer physikalischen Vernetzung führte. Weiterhin wurde davon ausgegangen, dass sich Verschlaufungen des HFN-Moleküls in das Seidenfibroin-Gitter binden. Der heterogene Fasercharakter wurde mittels Fluoreszenzbildgebung nachgewiesen (Abbildung 3.5D).



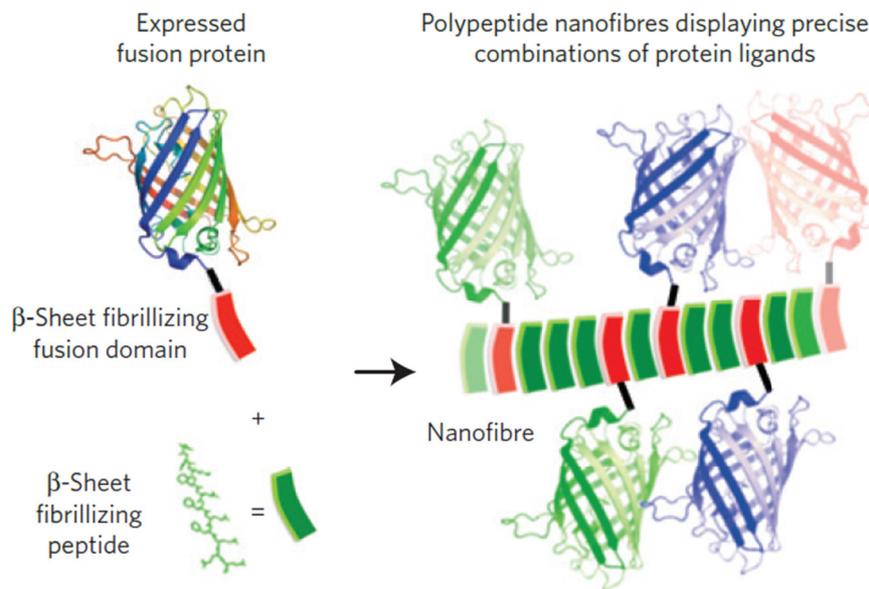
**Abbildung 3.5:** Extrudierte hPNF: REM-Aufnahmen von extrudierten heterogenen PNF: (A) Faserbündel aus einer Kollagen-HFN-Mischung, (B) Fasernanordnung aus einer Kollagen-Elastin-Mischung, (C) nanofaserige Anordnung einer Aktin-Myosin-Mischung. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 19 © 2016, The Royal Society of Chemistry. (D) Grün fluoreszenzmarkiertes HFN in einer Seidenfibroinfaser; mit steigender Dotierkonzentration werden größere Mengen an HFN in die heterogene Faser eingebracht. Die Skala beträgt 15 µm. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 18 © 2017, Nature Publishing Group.

Dafür wurde das HFN vor der Faserbildung mit Alexa Fluor 633 markiert. Die durchschnittliche volumetrische Fluoreszenz steigt mit steigendem HFN-Gehalt, was der Beweis für den heterogenen Charakter ist. Darüber hinaus konnten die Eigenschaften von Seidenfibroin-Fasern durch die Integration des HFN optimiert werden. Interessanterweise wurde die mechanische Integrität der Fasern durch das hinzugefügte HFN nicht beeinflusst, was für die physikalische Vernetzung beider Proteine spricht. Darüber hinaus verbesserte HFN die Biokompatibilität der Faserstrukturen. Auf den Fasern wurde eine verbesserte Zellanbindung und Lebensfähigkeit von Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen beobachtet.<sup>18</sup> Obwohl die Faserdurchmesser wieder im Bereich von Mikro- statt Nanometern lagen, ist es ein gutes Beispiel für die synergistische Wirkung der koassemblierten Proteine.

### 3.3.3. Selbstassemblierung von heterogenen Peptid-Proteinfasern

Die zuvor beschriebenen Techniken zur Bildung von heterogenen Proteinfasern hatten alle gemeinsam, dass die Faserbildung durch die Ausrichtung der Moleküle mit einer äußeren Kraft, z.B. einem elektrischen Feld oder einer Scherbeanspruchung, induziert wurde. Daraus resultierten oftmals Fasern mit Durchmessern im Bereich von mehreren Mikrometern. Somit ist eines der Hauptmerkmale von Nanostrukturen, ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis, für diese Fasern nicht gegeben. Dies ist aber für oberflächeninduzierte Prozesse von Vorteil. Deswegen ist der Selbstassemblierungsmechanismus zur Herstellung von hPNF eine interessante Variante. Hier sind die Herausforderungen einerseits die Protein-Konformation und andererseits die nanoskalige Assemblierung zu kontrollieren und nachzuweisen. Daher ist die Herstellung solcher hierarchischen Strukturen ein sehr anspruchsvolles Ziel.<sup>120</sup> Ein Ansatz zur Lösung dieses Problems ist die Kombination von Protein- und Peptid-Assemblierung. Peptide können so angepasst werden, dass sie mit bestimmten Proteinen interagieren, deren Konformationsänderungen fördern und ihre Zusammensetzung steuern, so dass sie ihre Funktion und Struktur anpassen können. Eine Möglichkeit, Proteine in eine peptidbasierte Amyloidfaser zu integrieren, besteht darin, das Protein mit einem zusätzlichen Peptid zu funktionalisieren, welches sich leicht in die Peptidfaser integrieren lässt. Hudalla *et al.* funktionalisierten ein GFP-Protein mit zwei verschiedenen amyloidbildenden Peptiden, dem  $\beta$ tail- und dem Q11-Peptid (Abbildung 3.6). Während Q11 eine schnelle  $\beta$ -Faltblatt- und Fibrillenbildung zeigte, hatte  $\beta$ tail einen langsamen Übergang von  $\alpha$ -Helix zu  $\beta$ -Faltblatt und somit eine wesentlich langsamere Aggregation. Basierend auf der langsamen Aggregation von  $\beta$ tail können mit diesem Peptid modifizierte Proteine in selbstassemblierende Q11-Nanofasern integriert werden. Durch die Variation des Protein-Peptid-Verhältnisses ist es möglich, die Proteinintegration präzise zusteuern. Die Koassemblierung ist nicht nur auf Q11 beschränkt, auch andere  $\beta$ -Faltblatt bildende Peptide wie KFE8, RADA16 und HK-Q11 koassemblieren mit  $\beta$ tail-funktionalisierten Proteinen. Die Integration in koassemblierte Fasern wurde durch Immunogold-Markierung und Fluoreszenzspektroskopie basierend auf den Fluoreszenzeigenschaften von GFP nachgewiesen. Die Zirkuläre Dichroismus-Spektroskopie zeigte die Bildung von gemischten  $\beta$ -Faltblattstrukturen, wie sie für die

heterogene Zusammenstellung von entworfenen Peptidpaaren mit unterschiedlich geladenen Regionen beobachtet wurden.<sup>121</sup>



**Abbildung 3.6:** Selbstassemblierte heterogene Peptid-Proteinfasern: schematische Darstellung von künstlich hergestellten Fusionsproteinen mit einer fibrillenbildenden  $\beta$ -Faltblatt-Domäne, die sich in Q11-Nanofasern integriert. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 126 © 2014, Springer Nature

Darüber hinaus gibt es weitere Arbeiten, welche unter Verwendung von Protein-Peptid-Mischungen direkt die Selbstassemblierung erzeugten. Inostroza-Brito *et al.* beispielsweise nutzten die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Peptid aufgrund ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte (pIs) aus.<sup>120</sup> Andererseits kann ein so genanntes „Template-Peptid“ verwendet werden, welches selbst bereits amyloide Fasern bildet. Dies berichtete, unter anderem, Rigdley *et al.* für ein amyloid haltiges hydrophobes „Template-Peptid“ aus Gliadin in Kombination mit  $\alpha$ -helikalen Proteinen ( $\alpha$ -Kasein,  $\alpha$ -Lactalbumin, Amylase, Hämoglobin, Insulin und Myoglobin).<sup>122</sup> Das hydrophobe Peptid initiiert im Protein einen Konformationsübergang von  $\alpha$ -Helix zu  $\beta$ -Faltblatt durch Interaktion mit den hydrophoben Bereichen innerhalb der  $\alpha$ -Helix. Die resultierenden Fasern liegen jedoch im Mikrobereich und haben eine hierarchische Struktur.<sup>122-124</sup> Ähnliches wurde für Serumalbumin mit einem Peptid des A $\beta$ -Proteins, dem Fragment der toxischen Region, gezeigt.<sup>125</sup>

### 3.3.4. Selbstassemblierung von heterogenen Proteinfasern

Die Selbstassemblierung von heterogenen Proteinnanofasern kann aber auch ohne Zugabe von Peptiden stattfinden. In der Literatur gibt es mehrere Berichte, die sich mit der durch Selbstassemblierung induzierten Koaggregation verschiedener krankheitsrelevanter Proteine zu amyloiden Strukturen befassen. Ein Fokus liegt insbesondere auf der Koaggregation von Prionen, welche zur Bildung von heterogenen Amyloidfasern führen.

Ein intensiv untersuchtes Prion ist das  $\alpha$ -Synuclein, das im Zusammenhang mit dem frühen Ausbruch von Parkinson steht. Ein tieferes Verständnis des Amyloidbildungs- und Aggregationsverhaltens von  $\alpha$ -Synuclein kann bei der Entwicklung neuer Behandlungsansätze helfen. Über  $\alpha$ -Synuclein ist bekannt, dass es unter definierten Bedingungen amyloide Strukturen bildet.<sup>127-129</sup> Des Weiteren kann das Hinzufügen von Keimen die „Lag-Phase“ der Amyloidbildung reduzieren oder auch eliminieren. Wood *et al.* beobachteten, dass die Zugabe eines Homomutanten  $\alpha$ -Synucleinkeims (A53T) zu einem Wild-Typ von  $\alpha$ -Synuclein die Amyloidfaserbildung beschleunigte.<sup>127</sup> Dies zeigt, dass die pathogene A53T-Mutante als heterogener Keim wirkt und die Amyloidbildung des eigentlich löslichen Wildtyps  $\alpha$ -Synuclein hervorruft, was der erste Schritt zur Selbstassemblierung von heterogenen Strukturen ist. Dieses Ergebnis war aufgrund der strukturellen Unterschiede in den Mutanten- und Wildtypfasern unerwartet.<sup>127</sup> Neben einer mutierten Version des  $\alpha$ -Synucleins induziert auch eine verkürzte Version dieses Proteins die Amyloidfaserbildung.<sup>129-131</sup> Liu *et al.* simulierten einen unvollständigen Abbau des  $\alpha$ -Synucleins und testeten den Einfluss von trunziertem  $\alpha$ -Synuclein auf das volle  $\alpha$ -Synuclein. Thioflavin T-Studien zeigten, dass die trunzierten Proteine die vollständige  $\alpha$ -Synuclein-Protofibrillenbildung beschleunigen.<sup>129</sup> Die Existenz einer zusammengesetzten Faser wurde durch die Verwendung von ungekürztem und HIS-markiertem  $\alpha$ -Synuclein in Verbindung mit Gelfiltrationschromatographie nachgewiesen. Ein Bildungsmechanismus und die damit verbundenen intermolekularen Wechselwirkungen wurden jedoch nicht vorgeschlagen. Horvath *et al.* zeigten, dass Prionen verschiedener Krankheiten auch miteinander wechselwirken können und berichteten von einer Koaggregation zwischen  $\alpha$ -Synuclein und dem mit Typ-2-Diabetes assoziierten Inselamyloid-Polypeptid (IAPP). Beide Proteine zeigten Unterschiede in ihrer Aggregationskinetik. IAPP assembliert sich in wenigen Minuten zu Amyloiden,

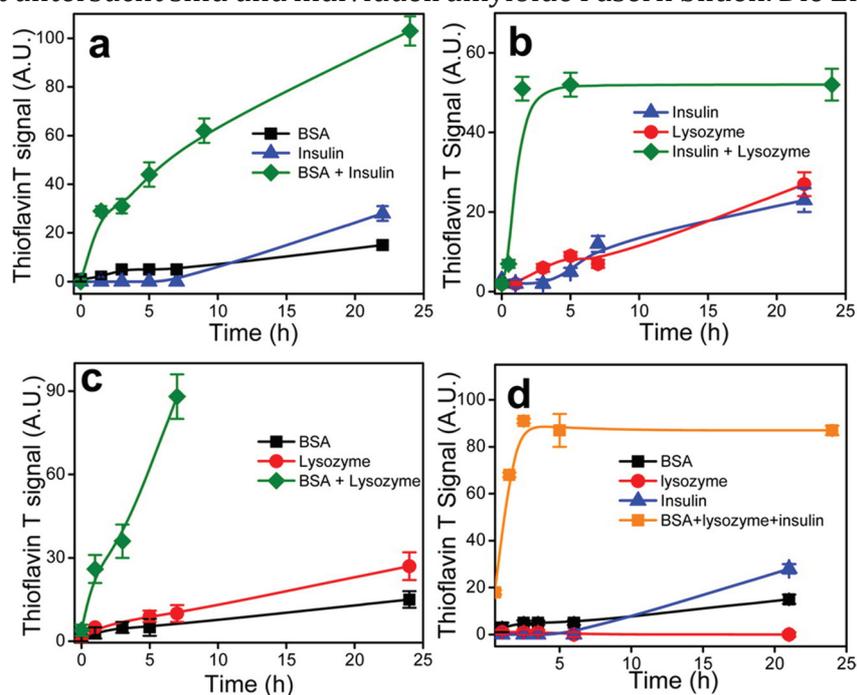
während  $\alpha$ -Synuclein Stunden benötigte. Horvath *et al.* nahmen die Existenz heterogener Fasern aufgrund ihrer unterschiedlichen Einflüsse als Keime an, indem sie die Proteinassemblierung beschleunigten bzw. hemmten.<sup>132</sup> Die Autoren behaupteten auch, dass zusätzliche komplementäre Methoden, wie z.B. die Immunogold-Markierung, für einen echten Nachweis der Koaggregation (Koassemblierung) notwendig seien.<sup>133</sup>

Einen detaillierten Überblick über weitere Studien zur Koaggregation von Prionen gaben Bondarev *et al.*<sup>134</sup> Sie unterteilten die Koaggregation in vier Klassen: Titration, Sequestrierung, axiale und laterale Koaggregation. Titration tritt auf, wenn lösliche Proteine mit bereits gebildeten Fasern oder in diesem Fall Amyloide über bestimmte Bindungsstellen interagieren. Wenn die Interaktionen nicht auf bestimmten Bindungsstellen basieren, spricht man von Sequestrierung. Weiterhin beschreibt die axiale Koaggregation das Aneinanderreihen verschiedener Proteinmoleküle entlang der Faserachse einer (Amyloid-)Faser. In einer solchen koaggregierten Faser können die Proteine statistisch, abwechselnd, mit einem Gradienten oder als Blöcke angeordnet werden.<sup>134-135</sup> Wenn verschiedene Arten von homogenen Amyloidfasern, die nur aus einem Protein bestehen, durch Wechselwirkungen zwischen ihren Seitenflächen koaggregieren, wird dies als laterale Koaggregation bezeichnet. In dieser Klassifizierung entspricht nur die dritte Klasse, die axiale Koaggregation, heterogenen nanofaserigen Strukturen, bei denen mindestens zwei Proteine in eine Faser eingebaut sind.

Basierend auf den experimentellen Daten verschiedener Studien und den darin fehlenden Nachweisen der heterogenen Zusammensetzung auf der Nanoebene ist eine Unterscheidung zwischen Klasse drei und vier nicht möglich. Mehrere Studien berichteten nur von einer Koaggregation oder einer Kreuzreaktion der Keime verschiedener Proteine, ohne die Molekülanordnung zu bestimmen. Insbesondere die Überprüfung der axialen Koaggregation ist eine der anspruchsvollsten Aufgaben.<sup>134</sup> Für einige Prionen wie Sup35 mit Rnq1,<sup>136-140</sup> csgA mit csgB<sup>141-142</sup> und Rip1 mit Rip3 wurde jedoch die axiale Koaggregation gezeigt.<sup>143</sup> Nach Kreuzreaktionsexperimenten von Sup35-Fasern mit Rnq1-Keimen wurde das Rnp1 durch Immunogold-Markierung in den gebildeten Fasern nachgewiesen.<sup>136</sup> Andere Studien bewiesen indirekt die axiale Koaggregation durch Zellaufnahmeexperimente und die daraus resultierende Überexpression von Markermolekülen.<sup>137-138, 140</sup> Die Koassemblierung für diese Kombinationen wird durch mehrere Bindungsstellen in beiden Proteinen angetrieben. Es wird davon ausgegangen, dass das Blockieren einer entscheidenden Bindungsstelle

ausreichen könnte, um die auftretenden Wechselwirkungen zu verändern.<sup>139</sup> Für *csgA* und *csgB* wurde die axiale Zusammenstellung ebenfalls indirekt nachgewiesen.<sup>144</sup> Beide Proteine sind Teil der Curli-Faserbildung, die an der Zelladhäsion und -aggregation sowie der Biofilmbildung von Bakterien beteiligt ist.<sup>145</sup> Die Zugabe von *csgB* zu löslichem *csgA* bewirkt die Amyloidbildung. *CsgB*, das amyloidogen ist, beginnt schnell Oligomere zu bilden. Basierend auf fünf Wiederholungseinheiten von *csgB*, die fünf Wiederholungseinheiten von *csgA* ähneln, ist *csgB* ein perfekter Keimbildner für *csgA* und induziert somit die Aggregation.<sup>141</sup> Hammer *et al.* erwähnten, dass die Natur in diesem Fall die Keimbildungs- und Dehnungseigenschaften in zwei verschiedene Moleküle trennt, um Ort und Zeitpunkt der Interaktion zu bestimmen.<sup>141</sup>

Inspiziert von den Arbeiten der Koaggregation über Prionen und Amyloid  $\beta$  - Oligomere, wollten Dubey *et al.* das aktuelle Wissen erweitern, indem sie erstmals die zugrunde liegenden Prinzipien der Koaggregation für verschiedene globuläre, nicht krankheitsrelevante Proteine untersuchten.<sup>96</sup> Als geeignetes Modellsystem wählten sie vier verschiedene Proteine, Rinderserumalbumin (BSA), Lysozym, Insulin und Cytochrom C, welche gut untersucht sind und individuell amyloide Fasern bilden. Die Erwärmung der



**Abbildung 3.7:** Koaggregationsstudien mittels Thioflavin T-Fluoreszenz für verschiedene globuläre Proteine in PBS bei  $\sim 70$  °C: (a) Koaggregation von Albumin (BSA) und Insulin; (b) Koaggregation von Insulin und Lysozym; (c) Koaggregation von BSA und Lysozym; (d) Koaggregation von BSA, Lysozym und Insulin. Alle Studien zeigen eine starke Zunahme des Fluoreszenzsignals und somit eine schnellere Aggregation für die Proteinmischungen als für die einzelnen Proteine. Nachdruck mit Genehmigung von Ref. 96 (<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi501333q>). Copyright 2014, American Chemical Society.

einzelnen Proteine auf 70 °C, nahe ihrer Schmelztemperatur, führte zur Amyloidfaserbildung mit ihrer typischen Bildungskinetik einschließlich einer „Lag-Phase“. Das Mischen dieser Proteine bei 70 °C führt nun zu einer drastisch reduzierten „Lag-Phase“ und einer schnellen Koaggregation, unabhängig von der Zusammensetzung (Abbildung 3.7). Die Temperaturreduzierung verhinderte die Koaggregation und Amyloidbildung. Interessanterweise identifizierte die bioinformatische Analyse keine signifikanten Ähnlichkeiten in den Proteinsequenzen.<sup>96</sup> Dies widerspricht frühen Berichten, worin behauptet wurde, dass Proteinsequenzen mit mehr als 70 % Ähnlichkeit die Aggregation begünstigen und dass weniger als 30-40 % Ähnlichkeit die Aggregation nicht erleichtern.<sup>146</sup> Dies zeigt die wichtige Rolle der partiellen Entfaltung bei der Koassemblierung von Proteinen. Dubey *et al.* gingen davon aus, dass die Koaggregation und auch Kreuzreaktionen verschiedener Keime mehr von den Zwischenstadien der partiell entfalteten Spezies und weniger von deren Sequenzidentitäten abhängt. Darauf aufbauend trafen sie zwei interessante Schlussfolgerungen. Erstens gibt es einen Nettogewinn an zusätzlichen intermolekularen Interaktionen während der Aggregation und zweitens gibt es einige Regionen innerhalb der Sequenzen des Proteins, die seine individuelle Selbstassemblierung behindern.<sup>96</sup> Eine ähnliche Schlussfolgerung wurde von Oki *et al.* gezogen, die die Koaggregation von  $\beta$ -Lactoglobulin und Lysozym untersuchten.<sup>147</sup> Beide Proteine koaggregierten bei einer Temperatur von 70 °C und mehr. Neben der bereits erwähnten partiellen Entfaltung und hydrophoben Wechselwirkung koaggregieren diese Proteine aufgrund der unterschiedlichen pIs von 5,1 für  $\beta$ -Lactoglobulin und 10,7 für Lysozym und der dadurch entstehenden elektrostatischen Wechselwirkungen. Oki *et al.* identifizierten hydrophobe Wechselwirkungen, elektrostatische Affinität und Entfaltung von Proteinen als beteiligte Faktoren an der Koaggregation und Keimbildung, indem sie verschiedene Additive zusetzten, um eine dieser Wechselwirkungen zu eliminieren. Darüber hinaus kamen sie zu dem Schluss, dass die Keimbildung durch eine partielle Entfaltung ausgelöst wird.<sup>147</sup> Diese Arbeiten zeigten, dass die Koaggregation auf andere Proteine übertragen werden kann, aber nicht ob dies zur Bildung von heterogenen PNF führt und welchen Einfluss ein möglicher heterogener Charakter auf die PNF-Eigenschaften hat.

Wie bereits erwähnt, findet sich auch in der Natur eine heterogene Proteinfaserstruktur, z.B. in der heterogenen Struktur der ECM. Eines der ersten Experimente, das einen der Koselbstassemblierung ähnlichen Prozess für zwei

verschiedene Proteine beschreibt, wurde 1999 von Underwood *et al.* beschrieben.<sup>148</sup> Die Proteinfasern, welche als Proteinkabel bezeichnet wurden, entstanden dabei in einer HPF- und HFN-Lösung mit einem pH-Wert zwischen 4,0-4,5. Die Absenkung des pH-Wertes führt zu einer feinen Fällung, die durch sanfte Bewegung aggregiert und feine Proteinfasern bildet. Diese Fällungsfasern wurden langsam aus der Lösung nach oben

**Tabelle 3.1:** Zusammenfassung selbstassemblierter hPNF

Protein 1	Protein 2	Assemblierungsbedingungen	Direkter Nachweis heterogene Zusammensetzung	Ref.
α-Synuclein	Homomutantes α-Synuclein (A53T)	α-Synuclein Keimerzeugung unter ständigem Schütteln bei 37 °C für 3 d Aggregation durch Mischen der Keime mit zweitem Protein in Tris-gepufferter Kochsalzlösung + 0,05 % Natriumazid	Nein	127, 128
	Trunkiertes α-Synuclein	20 mM-Phosphatpuffer auf Eis für 1 h, anschließendes Zentrifugieren bei 16.000x g	Ja, mittels Gelfiltrationschromatographie	129
	Inselamyloid-Polypeptid	Schwenken in Tris-gepufferter Kochsalzlösung bei 37 °C für 60 h	Nein	132, 133
Sup35	Rnq1	100 mM Kaliumphosphatpuffer mit 150 mM PBS (pH = 7,4) bei 25 °C unter partiellem Schwenken	Ja, mittels Immunomarkierung	136
		100 mM Natriumphosphat (pH = 7,3), 4 M Urea und 1 M NaCl bei 30 °C unter partiellem Schwenken für 48 h	Nein, aber Expression von	137
		In Guanidinhydrochlorid bei 4 °C, 25 °C und 37 °C (Puffer ähnlich Ref. 137)	Markermolekülen	139
csgA	csgB	Partielles Schwenken bei RT	Nein	141
		50 mM KPO <sub>4</sub> bei 4 °C > 30 d		142
Rip1	Rip3	10 min in 8 M Urea bei 95 °C, bzw. der Komplex mit 150 mM NaOH; anschließend Verdünnung mit natürlichem Puffer bei 25 °C	Ja, mittels Immunomarkierung	143
Lysozym	β-Lactoglobulin	10 mM Natriumcitrat, 10 mM Natriumphosphat und 10 mM Natriumborat mit einem pH von 6, 7 oder 8 bei 60-70 °C für 30 min	Nein	147
	Insulin	PBS bei etwa 70 °C	Nein	96
Rinder Serumalbumin	Lysozym			
	Insulin			
	Lysozym+ Insulin			
Fibrinogen	Fibronektin	0,1 M HCl mit pH von 4,0-4,5; anschließend leichtes rühren und nach oben ziehen der Lösung	Nein	148

gezogen, was die Anordnung kleiner Fasern in Zugrichtung zu größeren Bündeln, den Proteinkabeln, induzierte. Es wurde angenommen, dass isoelektrische Kräfte zur Ausfällung und somit zur Wechselwirkung zwischen den Proteinen und den feinen Fasern führen. Der Durchmesser des gebildeten Faserbündels lag im Bereich von 200  $\mu\text{m}$ . Ein solches Bündel bestand jedoch aus mehreren kleinen Fasern mit einem Durchmesser von etwa 1  $\mu\text{m}$ , die sich noch nicht im Nanobereich befinden.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeiten sind in Tabelle 3.1 kurz zusammengefasst. Hier ist ersichtlich, dass die Koassemblierung von Proteinen nicht nur bei Prionen auftritt, sondern auch bei anderen Proteinen, welche nicht mit Krankheiten assoziiert sind, z. B. Albumin oder Insulin. Jedoch ist es auffällig, dass es in diesem Bereich bisher nur wenige Arbeiten gibt. Dabei ist die Selbstassemblierung von Proteinen zu Fasern ein vielversprechender Ansatz, um beispielsweise das einzigartige Gerüst der ECM nachzuahmen, da es den Grundstein für künstlich geschaffene Organe legen könnte. Jedoch müssen hierzu noch grundlegende Fragen geklärt werden. Beispielsweise ist der Nachweis des heterogenen Charakters auf der Nanoebene immer noch eines der größten Probleme in der Wissenschaft. Darüber hinaus wurde der Einfluss der verschiedenen Proteine auf die Struktur der selbstassemblierten hPNF und deren Eigenschaften bisher nicht betrachtet.



## 4. Offene Fragen und Ziel der Arbeit

Die Selbstassemblierung von Proteinen ist ein essentieller Vorgang in der Natur und beschäftigt viele Forscher seit Jahrzehnten. Auf Oberflächen von Biomaterialien kann die Selbstassemblierung von Proteinen beispielsweise zur Abstoßung oder Integration dieser führen. Da die entstehenden Strukturen verschiedenste Eigenschaften und Funktionen aufweisen können, steht die Untersuchung der Selbstassemblierung von Proteinen und deren Beeinflussung im Fokus dieser Arbeit. Die Bildung solcher Assemblierungsstrukturen beruht auf dem Bottom-Up-Prinzip. Daher ist eine Strategie, den ersten Schritt der Proteinasssemblierung mittels strukturierter Oberflächen zu steuern. Nicht nur die Anordnung der Proteine, sondern auch die Integration verschiedener Proteine und somit die resultierenden Eigenschaften können kontrolliert werden. Einige Arbeiten zeigten die Koaggregation verschiedener Proteine, was die Erzeugung selbstassemblierter hPNF ermöglichte. Der direkte Nachweis dieser Strukturen stellt jedoch ein großes Problem dar, weswegen dieser auch meist nicht durchgeführt wird. Die Erzeugung einer Proteinfaser aus zwei verschiedenen Proteinen kann einen synergistischen Effekt auf die PNF-Eigenschaften haben, wie es für elektrogewebene und extrudierte Proteinfasern gezeigt wurde. Jedoch stellt sich die Frage, inwiefern dies auf selbstassemblierte Strukturen übertragen werden kann. Basierend darauf ergeben sich für diese Arbeit folgende drei Schwerpunkte:

1. Untersuchung des Einflusses einer im sub-Nanometerbereich strukturierten hydrophoben PE-EK-Oberfläche auf die Selbstassemblierung von HPF unter verschiedenen Umgebungsbedingungen
2. Erzeugung und Nachweis selbstassemblierter heterogener Proteinfasern bestehend aus zwei verschiedenen Plasmaproteinen
3. Untersuchung des Einflusses des Zweitproteins auf die PNF-Eigenschaften

In den bisherigen wissenschaftlichen Studien wurde meist der Einfluss von nanostrukturierten (Polymer-)Oberflächen mit Größen im Bereich einzelner Proteinmoleküle untersucht. Jedoch stellt sich die Frage, ob Strukturen, welche kleiner als einzelne Proteine sind, einen ähnlichen Einfluss haben. Mit dieser Thematik beschäftigten sich bisher nur zwei Arbeiten. So zeigten Keller *et al.*, dass die Kristallstruktur an der Oberfläche verschiedener Kristallfacetten die Anordnung von HPF beeinflusst.<sup>149</sup> Darüber

hinaus berichteten Reichert *et al.*, dass sich HPF entlang von Nanostufen auf hochorientiertem pyrolytischen Graphit anlagert und sich zu Fasern assembliert.<sup>150</sup> Die Frage ist nun, ob sich dies auf die Oberflächenstruktur eines PE-EK übertragen lässt. Frühere Arbeiten zeigten zwar, dass sich einerseits stäbchenförmige Tellurkristalle auf PE-EK abscheiden und ausrichten lassen, andererseits das PE orientiert durch die Kettenfaltungsstruktur kristallisieren kann.<sup>151-152</sup> Für Proteine wurde dies jedoch nicht untersucht.

Verschiedenste Studien beschäftigten sich mit der Koaggregation von Prionen und der Entstehung von heterogenen Strukturen (Abschnitt 3.3.4). Jedoch gibt es nur zwei Arbeiten, die diesen Prozess bei weiteren Proteinen betrachteten. Einerseits untersuchten Oki *et al.* die Koaggregation von  $\beta$ -Lactoglobulin und Lysozym bei 70 °C<sup>147</sup>, andererseits zeigten Dubey *et al.* unter anderem die Koaggregation der Plasmaproteine Albumin und Insulin in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei 70 °C.<sup>96</sup> Voraussetzung hierfür war nur die Entfaltung der Proteinstruktur aufgrund erhöhter Temperatur. Ein direkter Nachweis des heterogenen Charakters auf der Nanoebene war in diesen Arbeiten nicht vorhanden bzw. möglich (Abschnitt 3.3.4). Dies zeigt die Notwendigkeit neuer Nachweismethoden der Zusammensetzung heterogener PNF auf der Nanoebene. In diesem Teil stellen sich zwei Fragen: erstens, ist es möglich hPNF aus den Plasmaproteinen HSA und HGB mittels Ethanol- und Temperatur-induzierter Selbstassemblierung zu erzeugen und zweitens, ob Proteine anhand spezifischer Marker in der PNF mittels nanospektroskopischer Verfahren identifiziert werden können.

Die Möglichkeit zur Steuerung der Zusammensetzung von Proteinfasern und somit der resultierenden Eigenschaften und Charakteristika wurde in der Literatur für die Verfahren des Elektrosplennens und des Extrudierens gezeigt. So berichteten sowohl Boland *et al.* als auch Buttafoco *et al.* über die Erzeugung von Proteinfasern aus Kollagen und Elastin.<sup>109, 111</sup> Darüber hinaus zeigten Jacobsen *et al.* die Möglichkeit, Fasern aus Spinnenseide und HFN zu erzeugen, welche sowohl die guten mechanischen Eigenschaften der Spinnenseide als auch die Biokompatibilität des HFN besaßen.<sup>18</sup> Dieser Aspekt wurde bisher für selbstassemblierte bzw. koaggregierte hPNF nicht betrachtet. Daraus ergibt sich die Frage für den dritten Teil dieser Arbeit, inwiefern die Veränderung der Proteinverhältnisse in den hPNF die Charakteristika und Eigenschaften der heterogenen selbstassemblierten PNF beeinflusst.

## 5. Experimentelles

### 5.1. Herstellung von Polyethylen-Einkristallen

HDPE (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) wurde in Konzentrationen unter 0,1 Gew.% bei 120 °C in p-Xylol (Synthese Grad, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Basierend auf der Literatur wird in solch verdünnten Lösungen die Bildung von PE-EK durch isotherme Kristallisation bei einer Kristallisationstemperatur ( $T_c$ ) induziert. Da eine optimale  $T_c$  im Temperaturintervall zwischen 80 und 90 °C liegt, wurde die isotherme Kristallisation für sieben Tage bei 85 °C durchgeführt. Die entstandenen PE-EK wurden anschließend auf feste Oberflächen übertragen, indem je 100 µl der kristallisierten Polymerlösung auf 1 cm × 1 cm große Stücke eines Siliziumwafers getropft wurden. Anschließend wurde das Lösungsmittel in einem Exsikkator verdampft.

### 5.2. Adsorption von Fibrinogen auf Polyethylen-Einkristallen

Carbonatpufferlösung (CPL) mit einem pH-Wert von 9,2 wurde mittels Auflöserns von Calciumcarbonat (Merck KGaA Darmstadt, Deutschland) in Reinstwasser hergestellt. Anschließend wurden HPF-Stammlösungen (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) (1 mg/ml) mit PBS mit einem pH-Wert von 7,4 (Biochrom AG, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) oder CPL hergestellt. Für die Proteinadsorption wurde die Stammlösung auf Konzentrationen von 0,5, 2 und 5 µg/ml in PBS oder CPL verdünnt. Vor der Proteinadsorption wurden die PE-EK-Proben und die Proteinlösungen auf 37 °C erhitzt. Die PE-EK-Proben wurden nach Erreichen der 37 °C mit 2 ml der jeweiligen HPF-Lösung bedeckt und 2 Stunden bei 37 °C in einem Ofen inkubiert, um quasi-physiologische Bedingungen während der Adsorption sicherzustellen. Danach wurden die PE-EK-Proben mit dem verwendeten Puffer (PBS oder CPL) und zweimal mit Reinstwasser gespült, um nicht-adsorbiertes HPF sowie die Reste des verwendeten Puffers zu entfernen. Abschließend wurden die Substrate vorsichtig mit Druckluft getrocknet. Die getrockneten Proben wurden mittels AFM charakterisiert.

### 5.3. Charakterisierung der Oberfläche

Die zuvor hergestellten PE-EK-Proben wurden vor und nach der Proteinadsorption mittels AFM im Tapping-Mode charakterisiert. Für die AFM-Messungen wurden ein Dimension 3100 und ein MultiMode (beide von Digital Instruments, Veeco, Santa Barbara, Kalifornien, USA) verwendet, welche mit einem Nanoscope IV-Controller ausgestattet waren. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur mit Standard Tapping-Mode Silizium-Cantilevern von Bruker (Modell RTESP, Veeco, Santa Barbara, Kalifornien, USA) mit einer Resonanzfrequenz im Bereich von 315 bis 364 kHz, einer Federkonstante im Bereich von 20-80 N/m und einem typischen Spitzenradius von weniger als 10 nm (typische 7 nm) an Luft durchgeführt. Topographie- und Phasenbilder der PE-EK-Proben wurden aufgenommen und analysiert. Die mittlere quadratische Rauigkeit der PE-EK-Oberfläche vor ( $R_{q,PE-EK}$ ) und nach ( $R_{q,CPL-HPF}$ ) HPF-Adsorption sowie des darunterliegenden Siliziumsubstrats ( $R_{q,Si}$ ) wurden über eine Fläche von 500 nm × 500 nm bestimmt ( $n = 5$ ).

### 5.4. Analyse der Ausrichtung von adsorbierten Fibrinogen-Molekülen

AFM-Höhenbilder der PE-EK-Proben nach der Proteinadsorption wurden zuerst in eine binäre Form umgewandelt und anschließend analysiert, um die Orientierung von HPF-Molekülen, Agglomeraten und Fasern in Bezug auf die PE-EK-Oberfläche zu bewerten. Die Orientierung wurde als Winkel zwischen der Längsachse einer Proteinstruktur und einer Referenzachse des PE-EKs, die kurze Diagonale B, definiert (Abbildung 2.2B). Die Analyse wurde durch zwei geometrische Überlegungen vereinfacht:

(i) Die Oberfläche eines PE-EKs kann in vier Sektoren (I-IV) unterteilt werden, wobei die Orientierung der Kettenfaltungen in Sektor I und III sowie Sektor II und IV ähnlich sind (siehe 2.1.1, Abbildung 2.2).

(ii) Da das HPF-Molekül symmetrisch ist und eine trinodulär-Stabform hat, kann jeder Orientierungswinkel zwischen  $180^\circ$  und  $360^\circ$  in einen Winkel zwischen  $0^\circ$  und  $180^\circ$  umgewandelt werden.

Faserverzweigungen, die länger als ein einzelnes Molekül waren, wurden als Einzelfasern gezählt. Die resultierenden Winkelverteilungen wurden grafisch dargestellt.

## 5.5. Herstellung von selbstassemblierten Proteinfasern

### 5.5.1. Herstellung von Albumin-Hämoglobin Proteinfasern

Zur Herstellung von selbstassemblierten Nanofasern bestehend aus HSA-HGB wurden als erstes Stammlösungen beider Proteine, HSA (66,5 kDa) und HGB (65 kDa), in Reinstwasser hergestellt und anschließend auf 100 µg/ml verdünnt. Die Konzentration der Proteine wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmt (Spektrometer: LAMBDA 35 UV/Vis, von PerkinElmer). Hierzu wurde das Lambert-Beersche Gesetz (I) für eine Wellenlänge von 280 nm verwendet.

$$c = \frac{E_{280 \text{ nm}}}{\epsilon_{280 \text{ nm}} * d} \quad (I)$$

Hierbei sind  $E_{280 \text{ nm}}$  die Adsorption für eine Wellenlänge von 280 nm,  $\epsilon_{280 \text{ nm}}$  der Abschwächungskoeffizient des entsprechenden Proteins bei einer Wellenlänge von 280 nm (Tabelle A 1) und  $d$  die Weglänge des Lichtes im Material.

Zur Induzierung der Assemblierung von heterogenen Proteinfasern wurden die verschiedenen Proteinlösungen in einem Volumenverhältnis von 1:0, 1:1 und 0:1 gemischt und nachfolgend hochreines Ethanol zugegeben, um eine Konzentration von 50 Vol.% zu erreichen. Die HSA- und HGB-enthaltenden Lösungen wurden in einem Ofen bei 65 °C für unterschiedliche Zeiträume gelagert. Nach Assemblierungszeiten von 2, 6, 10, 12, 18 und 24 Stunden, sowie 2 bis 7 Tagen wurden 10 µl der Proteinlösung auf mit O<sub>2</sub>-Plasma gereinigte Siliziumsubstrate für die AFM-Charakterisierung, sowie auf gereinigte Deckgläser für Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (TERS)-Messungen aufgebracht.

### 5.5.2. Herstellung von Fibronektin-Fibrinogen Proteinfasern

Protein-Stammlösungen aus HFN (EMD Biosciences, Inc., San Diego, USA) und HPF (Merck Biosciences, Läfelfingen, Schweiz) wurden durch Auflösen der Proteine in Reinstwasser bei 37 °C hergestellt. Die Anfangskonzentration wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie wie in Abschnitt 5.5.1 bestimmt und die Konzentration jeder Lösung auf 20 µg/ml mit Reinstwasser eingestellt. Im nächsten Schritt wurden die HFN- und HPF-Stammlösungen gemischt, um Proteinlösungen mit den in Tabelle 5.1 dargestellten

molaren Proteinverhältnissen zu erhalten. Danach wurde hochreines Ethanol zugegeben, bis eine Ethanolkonzentration von 80 Vol.% erreicht wurde. Die Ethanol/Protein-Mischungen wurden 4 Stunden lang in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl der Faserdispersion auf gereinigte Polystyrol (PS)-Substrate getropft und im Exsikkator getrocknet. Nach der Trocknung wurde die Morphologie der PNF mittels AFM untersucht.

**Tabelle 5.1:** Molverhältnisse von HFN zu HPF in den Ausgangslösungen

Probe	HFN 00	HFN 33	HFN 50	HFN 66	HFN 100
HFN:HPF (mol/mol)	0:1	1:2	1:1	2:1	1:0

## 5.6. Charakterisierung der selbstassemblierten Proteinfasern

Um die Morphologie der selbstassemblierten PNF zu charakterisieren, wurden die mit PNF beschichteten Substrate mittels AFM im Tapping-Mode wie in 5.3 untersucht. Zusätzlich wurden die selbstassemblierten PNF aus HFN und/oder HPF mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) (Zetasizer Nano ZS; Malvern Instruments, Worcestershire, UK) untersucht, um deren hydrodynamischen Radius ( $R_H$ ) und somit die Dimensionen der PNF in der Dispersion zu bestimmen. Des Weiteren wurde das Zeta-Potenzial der PNFs in der Assemblierungslösung bestimmt, was uns Aussagen über die Oberflächenladung der PNF erlaubt und somit deren Aggregationsverhalten.

## 5.7. Zirkuläre Dichroismus-Spektroskopie

Um die Sekundärstruktur sowie die Aggregationsdynamik von HSA und HGB zu untersuchen, wurden Ultraviolett-Zirkuläre Dichroismus (CD)-Spektren mittels eines Jasco-CD-Spektrometers J-715, unter Verwendung einer Küvette mit einer Weglänge von 1 mm (Hellma Analytics, Deutschland), aufgenommen. Die zuvor hergestellte Stammlösung, wie in 5.5.1 beschrieben, wurde auf Konzentrationen von jeweils 4 µM für HSA und HGB verdünnt und anschließend 50 Vol.% Ethanol hinzugegeben. Die Spektren der Lösungen mit und ohne Protein wurden im Bereich von 195-300 nm bei 65 °C aufgenommen. Zur Messung der Kombination wurden 4 µM HSA und 4 µM HGB in einem Volumenverhältnis von 1:1 gemischt und anschließend 50 Vol.% Ethanol hinzugegeben.

Für 24-Stunden-Messungen wurden die hergestellten HSA-, HGB- und HSA-HGB-Lösungen unmittelbar nach Zugabe von Ethanol auf 65 °C erhitzt. Nachdem eine konstante Temperatur erreicht wurde, erfolgte stündlich die Aufnahme eines Spektrums.

## **5.8. Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie**

Zur Charakterisierung der Zusammensetzung der HSA-HGB-hPNF und HSA-PNF wurden Raman Spektren mit einer Ortsauflösung von wenigen Nanometern aufgenommen. Die TERS-Spektren wurden unter Verwendung eines Nanowizard III (JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland) aufgenommen, das auf einem inversen Mikroskop (Olympus IX70, Hamburg, Deutschland) montiert und mit einem Konfokalspektrometer (SP2750A, Acton Advanced, Princeton Instruments, Roper Scientific, USA) sowie einer CCD-Kamera (Pixis 256, Princeton Instruments, Roper Scientific, USA) ausgestattet ist. Folgendes Objektiv wurde verwendet: Ölimmersion, 60x, NA = 1,45 (Olympus, Hamburg, Deutschland). Die TERS-Spitzen wurden durch Abscheiden von 25 nm Silber auf handelsüblichen AFM-Cantilevern (Tap190Al-G, Budget Sensors, Germany) hergestellt, die bis zur Verwendung unter Argonatmosphäre gelagert wurden. Die Proben wurden mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 532$  nm bei einer Leistung von  $P = 360$   $\mu$ W für HSA-HGB-hPNF und  $P = 720$   $\mu$ W für reine HSA-PNF beleuchtet. Die Erfassungszeit betrug  $t_{acq} = 1$  s. Es wurden 1700 Spektren der Faseroberfläche von 8 verschiedenen HSA-HGB-hPNF und 1200 Spektren der Faseroberfläche von 6 verschiedenen HSA-PNF aufgenommen. Die seitliche Schrittweite variierte zwischen 1 bis 5 nm. Die minimale Schrittweite, die zum Auftreten verschiedener Banden in den detektierten Spektren führte, betrug 2 nm und entspricht somit der minimalen räumlichen Auflösung der TERS-Messung in dieser Arbeit.

## **5.9. Kraftspektroskopie**

Um kraftspektroskopische Messungen, welche eine Untersuchung der mechanischen Eigenschaften erlauben, an den selbstassemblierten HSA-HGB-hPNF durchzuführen, wurden diese kovalent an die AFM-Spitzen und Substrate gebunden. Hierzu wurden die Silizium-AFM-Spitzen (DNP S10, Bruker, Santa Barbara, CA, USA) und

Siliziumsubstrate wie folgt modifiziert: Reinigung für 30 Minuten mit frisch zubereiteter Piranha-Lösung ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ : 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 7:3, v/v) und anschließendes Waschen mit Reinstwasser (3x) und Ethanol (99 %) (2x). Die gereinigten AFM-Spitzen und Substrate wurden danach 15 Minuten lang in eine Mischlösung aus 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) und Thiethoxychlorosilan (TTCS) (1 % in Toluol, APTES:TTCS, 1:4, v/v) eingetaucht, anschließend zweimal mit Reinstwasser und einmal mit Ethanol (99 %) gewaschen. Diese Waschschrte wurden dreimal wiederholt. Danach wurden die AFM-Spitzen und Substrate für eine Stunde in Polyethylenglycol (PEG)-NHS-Esterdisulfid (0,1 mg/ml) überführt, um das PEG-NHS-Esterdisulfid an die AFM-Spitze und das Substrat zu binden. Im letzten Schritt wurden die AFM-Spitzen für 30 Minuten in eine HSA-PNF- bzw. HSA-HGB-hPNF-Lösung eingetaucht, um die Bindung von (h)PNF an die Spitzen zu fördern. Die (h)PNF-modifizierten AFM-Spitzen wurden mit Reinstwasser erneut gewaschen, um nicht kovalent adsorbiertes (h)PNF zu entfernen.

Die einzelnen Kraft-Abstand-Kurven der (h)PNF wurden in Wasser mit dem BioScope Catalyst aufgenommen, welches mit einem Nanoscope VIII Controller (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) ausgestattet war. Die AFM-Cantilever DNP-S10, welche mit den hPNF modifiziert wurden, besitzen vier verschiedene Cantilever. Zur Messung der Kraft wurden nur die Cantilever B und D mit Federkonstanten von 0,12 N/m bzw. 0,06 N/m verwendet. Um die Bindung der (h)PNF auf dem Siliziumsubstrat zu induzieren, wurde eine Verweilzeit von 30 s der PNF auf der Oberfläche gewählt. Die Abzugs- bzw. Bruchkraft wurde als maximale Kraft bestimmt, die benötigt wurde, um die modifizierte Spitze vom Substrat zurückzuziehen.

## 5.10. Stabilitätstests in Wasser und PBS

Die Stabilität der (h)PNF aus HFN und HPF wurde in zwei verschiedenen Medien untersucht, Reinstwasser bzw. PBS. Das Verhalten der Fasern wurde zum einen *in-situ* über DLS und zum anderen *ex-situ* mittels AFM, durch Vergleichsmessungen der abgeschiedenen Fasern vor und nach der Exposition gegenüber Reinstwasser bzw. PBS untersucht. Für die *in-situ*-Messung in PBS wurde die PNF-Dispersion 1:1 mit handelsüblichem PBS gemischt, gefolgt von einer Langzeitmessung des  $R_H$  der PNF. Es ist zu beachten, dass der Ethanol nicht vollständig entfernt wurde. Der verbleibende Ethanolgehalt der untersuchten Dispersion lag bei 40 Vol.%. Komplementär wurden zu

Beginn und nach 2 Stunden 10 µl der PNF-Dispersion entnommen und auf PS-Substrate getropft, vorsichtig gespült, Vakuum-getrocknet und mittels AFM charakterisiert.

Bei der *in-situ*-Untersuchung in Reinstwasser wurde die Küvette offengelassen, so dass der Ethanol während der Messung langsam verdunsten konnte. Wenn der Füllstand unter den für die Messung erforderlichen kritischen Füllstand fiel, wurde die Küvette mit Reinstwasser nachgefüllt. Anschließend wurde eine neue Messung gestartet, um den  $R_H$  in nahezu vollständiger Abwesenheit von Ethanol zu bestimmen.

*Ex-situ*-Messungen wurden durchgeführt, indem mit PNF bedeckte PS-Substrate in PBS bzw. Reinstwasser eingetaucht wurden. Nach 5 min bzw. nach 24 h wurde das Reinstwasser bzw. das PBS entfernt und die Fasern mittels AFM charakterisiert. In einem weiteren Versuch wurden 2 µl Reinstwasser auf die PNF-bedeckten PS-Substrate getropft. Zur Verhinderung des Abspülens der Fasern vom Substrat, wurden die Substrate bis zum Verdampfen bei Raumtemperatur gelagert ( $t < 5$  min) und mit dem AFM charakterisiert.

## **5.11. Immunogold-Markierung**

### **5.11.1. Heterogene Albumin-Hämoglobin Nanofasern**

Zum Nachweis von HSA und HGB in den hPNF wurden Immunogold-Markierungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurde als erstes eine TRIS-gepufferte Lösung (TBS) als Block- und Markierungspuffer hergestellt, indem TRIS (1,5 g) und NaCl (2,19 g) in Reinstwasser gelöst wurden. Die Lösung wurde durch Zugabe von 1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Abschließend wurde die Pufferlösung mit Reinstwasser auf 250 ml aufgefüllt. Außerdem wurde 0,1 Gew.% Gelatine aus Kaltwasserfischhaut zugegeben (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland).

Ein 10 µl Tropfen der hergestellten HSA-HGB hPNF-Dispersion wurde auf einen Parafilm aufgetragen und ein sauberes, mit einem Kohlenstofffilm beschichtetes Cu-Transmissionselektronmikroskopie (TEM)-Gitter für 30 s in die Lösung eingetaucht. Anschließend wurde das Gitter zweimal für 5 Minuten in die Blocklösung mit 0,1 Gew.% Gelatine inkubiert. Das TEM-Gitter wurde danach für 1 Stunde bei Raumtemperatur in die primäre Antikörperlösung eingetaucht. Um die Proteine zu markieren, wurden

Kaninchen-Antikörper gegen HGB (sc-21005 von Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) und Schaf-Antikörper gegen HSA (ab8940 von Abcam, Cambridge, Großbritannien) verwendet. Nach weiteren Waschschrritten mit 0,1 Gew % Gelatine in TBS für 5 Minuten wurde das Gitter in einer sekundäre Antikörperlösung mit 0,1 Gew % Gelatine in TBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für HGB wurden Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper von der Ziege, welche mit Goldnanopartikeln (AuNP) mit einem Durchmesser von 15 nm modifiziert waren (EM.GAR15 von BBI Soutions, Cardiff, Großbritannien), und für HSA Anti-Schaf-Sekundärantikörper vom Esel, welche mit AuNP mit einem Durchmesser von 10 nm modifiziert waren (EM.DAS10 von BBI Soutions, Cardiff, Großbritannien), verwendet. Die mit Immunogold markierten Proben wurden vier weitere Male mit 0,1 Gew % Gelatine in TBS für 5 Minuten und zwei weitere Male in destilliertem Wasser gewaschen. Die immunmarkierten Fasern wurden mittels Rastertransmissionselektronenmikroskopie (STEM) an einer AURIGA 60 CrossBeam® Workstation (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) charakterisiert und die Durchmesser der AuNP entlang der hPNF mittels ImageJ analysiert.

### **5.11.2. Heterogene Fibronektin–Fibrinogen Nanofasern**

Für den Nachweis von HFN und HPF in den assemblierten PNF und hPNF wurde das Immunmarkierungsverfahren modifiziert. Zunächst wurde eine indirekte Markierung mit Primärantikörpern vom Kaninchen gegen HFN (sc-9068 von Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) und von der Maus gegen HPF (sc-69775 von Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) durchgeführt. Zur Markierung der Primärantikörper gegen HFN wurden sekundäre Anti-Kaninchen-Antikörper von der Ziege, die mit Au-NPs mit einem Durchmesser von etwa 15 nm (zwischen 12,6 nm und 18,2 nm; EM.GAR15 von BBI Solutions, Cardiff, Großbritannien) konjugiert waren, verwendet. Die Primärantikörper gegen HPF wurden mittels sekundären Anti-Maus-Antikörpern der Ziege, die mit Au-NPs mit einem Durchmesser von etwa 10 nm (zwischen 8,1 nm und 12,1 nm; EM.GMHL10 von BBI Solutions, Cardiff, Großbritannien) konjugiert waren, markiert.

Die assemblierten HFN-HPF-PNF wurden durch Auftropfen von 2 µl Protein-dispersion auf einem sauberen und mit einem Kohlenstofffilm beschichteten TEM-Gitter abgeschieden, welches anschließend für 5 min in TBS-Gelatine Blockpuffer inkubiert wurde. Anschließend wurde das TEM-Gitter für eine Stunde in einem TBS-Gelatine-

Primärantikörperlösungsgemisch (Verhältnis 50:2) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimalig mit TBS-Gelatine für 5 min gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Analog dazu wurden die sekundären Antikörper hinzugefügt, indem die TEM-Gitter für 30 min in einer TBS-Gelatine-Sekundärantikörperlösung (50:2) eingetaucht wurden. Abschließend wurden die TEM-Gitter dreimal in TBS-Gelatine und zweimal in PBS für je 5 min gewaschen. Die Analyse erfolgte wie in 5.11.1 beschrieben.

## **5.12. Statistik**

Alle Messwerte der Experimente sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Ergebnisse der Kraftspektroskopie, der bestimmten HPF-HFN-PNF-Charakteristika sowie die Ergebnisse der Stabilitätstests wurden mittels One-Way ANOVA hinsichtlich ihrer statistischen Unterschiede untersucht. Alle statistischen Tests wurden mit dem Softwarepaket Sigmaplot 13.0 (Stystat Software Inc.) durchgeführt.



## 6. Ergebnisse und Diskussion

### 6.1. Proteinadsorption auf Polyethylen-Einkristallen<sup>1</sup>

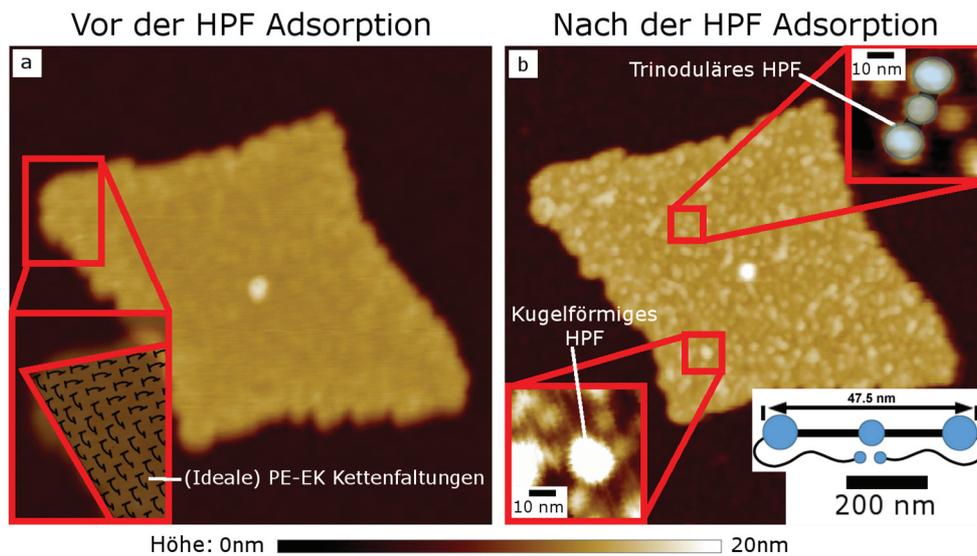
Das Ziel des ersten Teils der Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der Oberflächenstruktur von PE-EK auf die Assemblierungseigenschaften und Orientierung von HPF-Molekülen und Assemblierungsstrukturen. Dazu wurde zunächst die Eignung von PE-EK-Oberflächen für Proteinadsorptionsstudien untersucht. Daraufhin wurde die Anordnung adsorbierter HPF-Moleküle auf den PE-EK-Oberflächen in Abhängigkeit von Konzentration und pH-Wert der Proteinlösung charakterisiert. Nachfolgend wurde der Einfluss der PE-EK-Oberflächennanostruktur auf die Orientierung von HPF-Anordnungen analysiert.

#### 6.1.1. Polyethylen-Einkristalle vor und nach der Proteinadsorption

Zunächst wurde untersucht, ob die Rauheit der hydrophoben nanostrukturierten PE-EK-Oberflächen gering genug ist um einzelne HPF-Moleküle oder kleine HPF-Strukturen in AFM-Höhenbildern zu erkennen. PE-EK-Proben wurden dafür vor und nach der HPF-Adsorption mittels AFM charakterisiert. Abbildung 6.1 zeigt die AFM-Höhenaufnahmen desselben PE-EKs vor (Abbildung 6.1a) und nach Adsorption von HPF aus CPL-Lösung (Abbildung 6.1b). Die quadratische Rauigkeit der PE-EK-Oberfläche ( $R_{q,PE-EK}$ ) und des darunterliegenden Siliziumsubstrats ( $R_{q,Si}$ ) wurde mit  $0,43 \pm 0,02$  nm bzw.  $0,13 \pm 0,01$  nm berechnet. Die nativen PE-EK-Oberflächen haben im Vergleich zum darunterliegenden Siliziumsubstrat eine erhöhte Oberflächenrauheit. Dieses Ergebnis lässt sich durch die nanostrukturierte PE-EK Oberflächenmorphologie erklären, welche aus Kettenfaltungen besteht. Eine Abbildung einzelner Kettenfaltungen der PE-EK-Oberfläche war mit dem verwendeten AFM-Setup nicht möglich. Die Morphologie und Kettenfaltungsorientierung der PE-EK-Oberfläche unter den gewählten Bedingungen ist

---

<sup>1</sup> Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits in abgewandelter Form veröffentlicht, in: C. Helbing, R. Stößel, D.A. Hering, M.M.L. Arras, J. Bossert, K.D. Jandt. pH-dependent ordered fibrinogen adsorption on polyethylene single crystals. *Langmuir*; 32; 11868-11877 ©2016 American Chemical Society.



**Abbildung 6.1:** AFM-Höhenbild eines PE-EK vor (a) und nach (b) der HPF-Adsorption aus einer CPL-Lösung mit einem pH von 9,2 und einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Der PE-EK besitzt eine glatte Oberfläche vor der Adsorption (a). Die Vergrößerung in (a) zeigt eine schematische Zeichnung der idealen nanostrukturierten PE-EK-Kettenfaltungsoberfläche (nicht maßstabsgetreu). Nach der HPF-Adsorption konnten trinodulär-stabförmige und kugelförmige Strukturen auf der Oberfläche identifiziert werden (b). Die Einschübe zeigen Vergrößerungen einer kugelförmigen (unten links) und einer hervorgehobenen trinodulär-stabförmigen Struktur (oben) sowie ein schematisches trinodulär-stabförmiges HPF-Molekül (unten rechts).

jedoch in der Literatur gut beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die Kettenfaltungen parallel zu den Rändern der Raute ausgerichtet sind und somit die (001)- oder (112)-Ebene bilden. Im Fall der (112)-Ebene bildet sich während der Kristallisation eine hohle Pyramide, welche nach dem Abscheiden des PE-EK auf einem Substrat zusammenbricht. Dies führt zu einem Riss in der Mitte der Pyramide. Ein solcher Riss war auf den untersuchten PE-EK-Oberflächen nicht sichtbar, daher sind die Kettenfaltungen in der (001)-Ebene ausgerichtet. Darüber hinaus wurden in mehreren früheren Studien Kettenfaltungen auf der Oberfläche von PE-EK abgebildet<sup>153</sup>, und es wurde gezeigt, dass 75 % der Oberfläche durch eine scharfe Faltung (benachbarter Wiedereintritt) in Richtung der geschlossenen gepackten Kristallebene ([110]) gebildet werden.<sup>31</sup> Aufgrund detaillierter Literaturanalyse wird für die gebildeten PE-EKs eine identische Oberflächen-Nanostruktur erwartet.

Anschließend wurden die PE-EK-Proben für die HPF-Adsorptionsexperimente verwendet. Nach der HPF-Adsorption erhöhte sich die mittlere quadratische Rauheit ( $R_{q, \text{CPL-HPF}}$ ) auf  $0,87 \pm 0,05 \text{ nm}$ . Darüber hinaus wurden trinodulär-stabförmige Strukturen auf der Oberfläche des PE-EK nach der HPF-Adsorption beobachtet, wie in der Vergrößerung in Abbildung 6.1b gezeigt. Die ausgeprägte Form dieser Strukturen zeigt

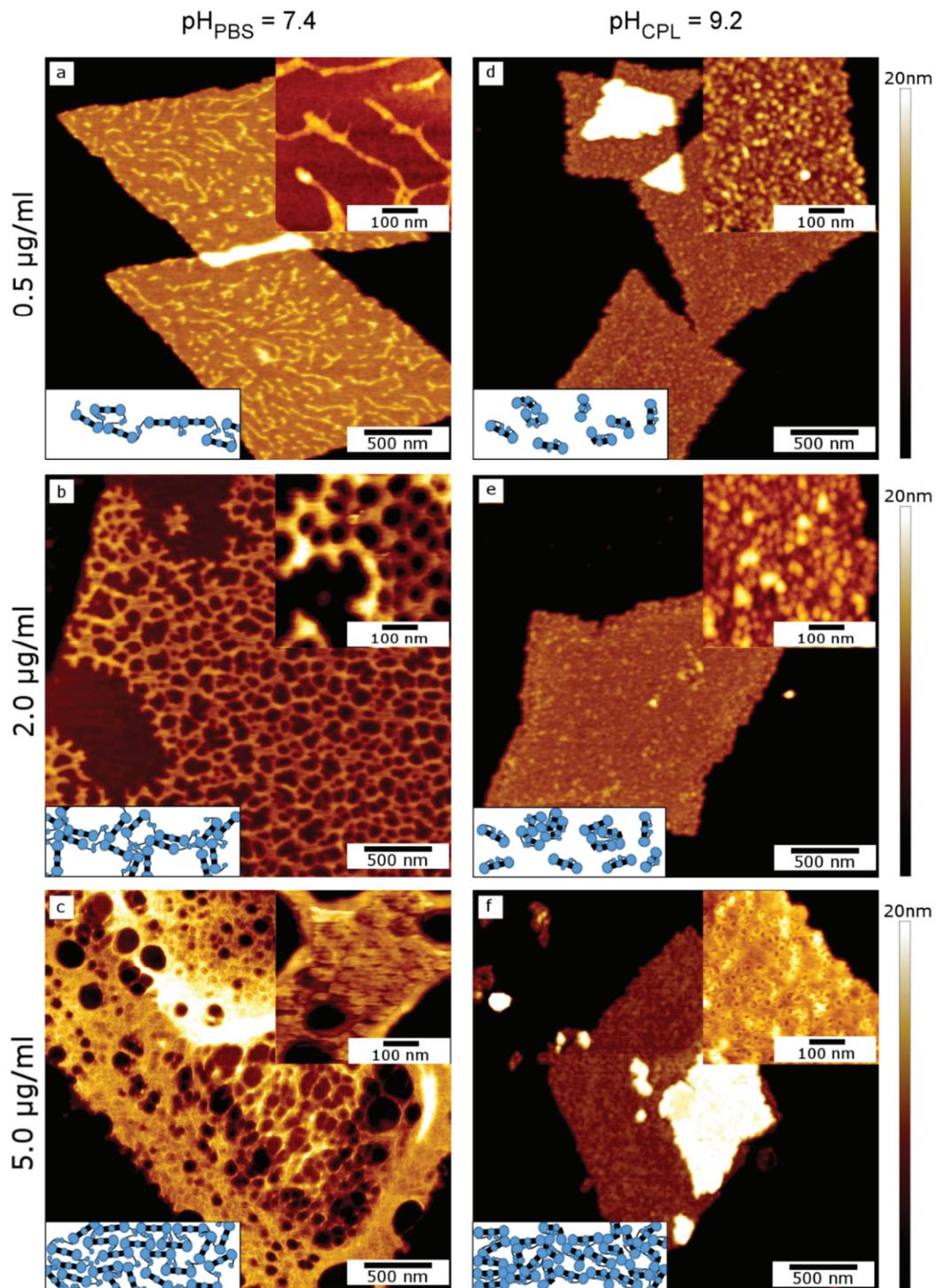
das Vorhandensein von einzelnen trinodulär-stabförmigen HPF-Molekülen auf der PE-EK-Oberfläche. Die Abbildung einzelner HPF-Moleküle wurde durch die geringe Rauigkeit der PE-EK ( $R_q, \text{PE-EK} = 0,43 \pm 0,02 \text{ nm}$ ) ermöglicht, die niedriger ist als die Höhe einzelner HPF-Moleküle ( $h_{\text{HPF}} = 1,4 \pm 0,4 \text{ nm}$ ).<sup>82</sup> Die Beobachtung der charakteristischen trinodulär-stabförmigen HPF-Moleküle auf PE-EK (Abbildung 6.1b) zeigt, dass PE-EK-Oberflächen glatt genug sind, um Protein-Protein-Wechselwirkungen auf der Oberfläche und Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen in Abhängigkeit der Adsorptionsbedingungen zu untersuchen.

Daraufhin wurde die Anordnung von HPF-Molekülen auf der Oberfläche der glatten nanostrukturierten hydrophoben PE-EK in Abhängigkeit von den Adsorptionsbedingungen, der HPF-Konzentration und dem Puffer der HPF-Lösung, untersucht.

### **6.1.2. Einfluss der Adsorptionsbedingungen auf die Fibrinogenassemblierung auf Polyethylen-Einkristallen**

Die HPF-Adsorptionsexperimente wurden unter verschiedenen Adsorptionsbedingungen, HPF-Konzentrationen (0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 2,0  $\mu\text{g/ml}$  und 5,0  $\mu\text{g/ml}$ ) und Puffer der Proteinlösung (PBS mit  $\text{pH}_{\text{PBS}} = 7,4$  und CPL mit  $\text{pH}_{\text{CPL}} = 9,2$ ), durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss von Protein-Protein- und Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen auf die HPF-Assemblierung auf den PE-EK-Oberflächen untersucht. Repräsentative AFM-Höhenbilder für jede Adsorptionsbedingung sind in Abbildung 6.2 dargestellt.

HPF-Adsorption aus PBS-Lösung ( $\text{pH}_{\text{PBS}} = 7,4$ ) führt zur Bildung von (i) fibrillenartigen Strukturen (Abbildung 6.2a, 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), (ii) Netzwerken aus fibrillenartigen Strukturen (Abbildung 6.2b, 2,0  $\mu\text{g/ml}$ ) oder (iii) schwammartigen Strukturen (Abbildung 6.2c 5,0  $\mu\text{g/ml}$ ). Die Abmessungen der HPF-Strukturen sind in Tabelle 6.1 aufgeführt. Die Größe und Form der fibrillenartigen HPF-Strukturen sowie der HPF-Fibrillen-Netzwerkstrukturen deuten darauf hin, dass diese aus mehreren miteinander verbundenen HPF-Molekülen bestehen. Die Ausbildung von HPF-Fibrillen und Fibrillennetzwerken auf hydrophoben Oberflächen ist in der Literatur gut beschrieben und stimmt mit den Beobachtungen in dieser Arbeit überein.<sup>12, 82, 149</sup> Bildung und Wachstum können durch eine Kombination von Protein-Oberflächen- und Protein-Protein-Wechselwirkungen während des Adsorptionsprozesses bei einem



**Abbildung 6.2:** AFM-Höhenbilder von HPF-Strukturen nach der Inkubation mit verschiedenen HPF-Konzentrationen ( $0,5$ ,  $2,0$  und  $5,0 \mu\text{g/ml}$ ) aus PBS (a-c) und aus CPL (d-f). Die Einschübe zeigen Vergrößerungen der HPF-Strukturen und ein geometrisches Modell der angeordneten HPF-Moleküle. Nach der Adsorption aus  $0,5 \mu\text{g/ml}$  HPF aus PBS (a) bildeten sich fibrillenartige Strukturen, aus  $2,0 \mu\text{g/ml}$  HPF aus PBS (b) bildete sich ein Netzwerk aus fibrillenartigen Strukturen und aus  $5,0 \mu\text{g/ml}$  aus PBS (c) bildete sich ein dichter Film. Nach der Adsorption aus  $0,5 \mu\text{g/ml}$  (d) und  $2,0 \mu\text{g/ml}$  (e) aus CPL bildeten sich trinodulär-stabförmige und kugelförmige Strukturen und nach der Adsorption aus  $5,0 \mu\text{g/ml}$  (f) bildete sich ein dichter Film.

physiologischen pH-Wert von 7,4 erklärt werden.<sup>12, 149</sup> Eine weitere Erhöhung der HPF-Konzentration erhöhte die Wahrscheinlichkeit von Protein-Protein-Wechselwirkungen und förderte somit die Bildung dickerer und dichter HPF-Schichten auf der PE-EK-Oberfläche. Ähnlich dichte HPF-Schichten wurden auch für die Adsorption von HPF auf hydrophobem UHMWPE und nanostrukturiertem Titanoxid beobachtet.<sup>82, 149</sup>

**Tabelle 6.1:** HPF-Anordnungen auf PE-EK und deren Geometrie für verschiedene Konzentrationen und pH-Werte

HPF Konzentration [µg/ml]	pH					
	7,4 (PBS)			9,2 (CPL)		
		HPF-Morphologie	Dimensionen <sup>a</sup>		HPF-Morphologie	Dimensionen <sup>a</sup>
0,5	i	fibrillenartige Struktur	h = 1,9 ± 0,5 nm b = 30 ± 5 nm l = 100 - 1000 nm <sup>b</sup>	iv	trinodulär-stabförmige Struktur	h = 1,2 ± 0,3 nm b = 18 ± 3 nm l = 51 ± 3 nm
2	ii	Netzwerk aus fibrillenartigen Strukturen	h = 7 ± 3 nm b = 45 ± 10 nm l = 82 ± 25 nm <sup>c</sup>	v	kugelförmige Struktur	h = 2,0 ± 0,4 nm d = 27 ± 6 nm
5	iii	schwammartig e Struktur	h = 6 ± 1 nm <sup>d</sup>	vi	dichter Film	h = 1,5 ± 0,5 nm <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Höhe (h), Breite (b) und Länge (l) oder Durchmesser(d) (n = 30)

<sup>b</sup> Länge der fibrillenartigen Strukturen war nicht einheitlich

<sup>c</sup> Länge zwischen Knotenpunkten

<sup>d</sup> basierend auf der Annahme, dass die Löcher der schwammartigen Struktur die PE-EK Oberfläche repräsentieren

Im Gegensatz zu den PBS-Lösungen fanden wir für die HPF-Adsorption aus einer CPL-Lösung (pH<sub>CPL</sub> = 9.2) ein deutlich unterschiedliches Adsorptionsverhalten von HPF auf den PE-EK-Oberflächen.

Bei Konzentrationen von 0,5 µg/ml (Abbildung 6.2d und Abbildung A 1) und 2,0 µg/ml (Abbildung 6.2e) wurden zwei verschiedene HPF-Strukturen auf der PE-EK-Oberfläche beobachtet: (iv) trinodulär-stabförmige Strukturen und (v) kugelförmige Strukturen. Die trinodulär-stabförmigen Strukturen sind im AFM-Höhenbild in Abbildung A 1 beispielhaft hervorgehoben.

Die Abmessungen des aus CPL adsorbierten HPF sind in Tabelle 6.1 gezeigt. Auf der PE-EK-Oberfläche erhöhte sich die Menge beider HPF-Anordnungen, der Trinodulär-stabförmigen und der kugelförmigen Strukturen, bei einer Konzentration von 2,0 µg/ml (Abbildung 6.2e) im Vergleich zu einer Konzentration von 0,5 µg/ml (Abbildung 6.2d). Die Höhe (2,0 nm ± 0,4 nm) und der Durchmesser (27 nm ± 6 nm) (Tabelle 6.1) der

kugelförmigen HPF-Strukturen entsprechen den Werten für Höhe und Durchmesser einzelner kugelförmiger HPF-Moleküle auf hydrophilen Siliziumoberflächen.<sup>154</sup> Die ausgeprägte geometrische Form der trinodulär-stabförmigen HPF-Strukturen und deren Abmessungen, d.h. Höhe ( $1,2 \text{ nm} \pm 0,3 \text{ nm}$ ), Breite ( $18 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ ) und Länge ( $51 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ ), zeigen ebenfalls die Anwesenheit von HPF-Molekülen mit trinodulär-stabförmiger Konformation<sup>82</sup> (Tabelle 6.1).

Nach der Adsorption aus der CPL-Lösung mit einer HPF-Konzentration von  $5,0 \mu\text{g/ml}$  wurde eine dichte Schicht (Abbildung 6.2f) auf der PE-EK-Oberfläche beobachtet. Die Höhe dieser Schicht von  $1,5 \pm 0,5 \text{ nm}$  (Tabelle 6.1) stimmt mit der Höhe eines einzelnen HPF-Moleküls ( $1,4 \pm 0,4 \text{ nm}$ ) überein.<sup>82</sup> Dies zeigt, dass die HPF-Schicht von einzelnen Molekülen gebildet wurde. Im Vergleich zu den niedrigeren HPF-Konzentrationen ( $0,5 \mu\text{g/ml}$  und  $2,0 \mu\text{g/ml}$ ) der CPL-Lösung waren weder trinodulär-stabförmige Strukturen noch kugelförmige HPF-Strukturen unterscheidbar.

Daraus kann geschlossen werden, dass die CPL-Lösung die Adsorption von einzelnen kugelförmigen und trinodulär-stabförmigen HPF-Molekülen an der PE-EK-Oberfläche anstelle der HPF-Fibrillen oder Fibrillennetze induziert, wie sie nach der HPF-Adsorption aus PBS-Lösung bei ähnlichen HPF-Konzentrationen gefunden wurden. Die unterschiedlichen HPF-Anordnungen können durch pufferabhängige HPF-Protein-Protein-Wechselwirkungen auf den hydrophoben PE-EK-Oberflächen erklärt werden. HPF-Protein-Protein-Wechselwirkungen hängen stark vom Vorhandensein freier  $\alpha\text{C}$ -Domänen ab und sind somit direkt mit der Konformation der HPF verknüpft. Freie  $\alpha\text{C}$ -Domänen eines HPF-Moleküls können an andere HPF-Moleküle binden, was die Bildung von HPF-Anordnungen aus mehreren miteinander verbundenen Proteinen erleichtert.<sup>12, 82, 149</sup> Die HPF-Konformation und die daraus resultierende Verfügbarkeit freier  $\alpha\text{C}$ -Domänen für die HPF-Aggregation können durch (I) die Bedingungen in der Pufferlösung und durch (II) die Wechselwirkungen mit der Oberfläche beeinflusst werden:<sup>12, 82, 149</sup>

(I) Die Bedingungen in der Pufferlösung, d.h. pH-Wert und Ionenstärke, beeinflussen die Konformation sowie die Gesamtladung der HPF-Proteine in der Lösung.<sup>12, 155-156</sup> Ein hoher oder niedriger pH-Wert der Pufferlösung induziert die Bindung der  $\alpha\text{C}$ -Domänen an die zentrale E-Domäne des HPF. Folglich ist die Menge an ungebundenen  $\alpha\text{C}$ -Domänen reduziert und die Wahrscheinlichkeit für HPF-Protein-Protein-Wechselwirkungen nimmt ab.<sup>155, 157</sup> Des Weiteren beeinflussen hohe oder niedrige pH-Werte auch die Gesamtladung der HPF-Moleküle in Lösung. Eine Erhöhung des pH-Werts über den isoelektrischen

Punkt des HPF erhöht dessen Gesamtladung und somit auch die Abstoßungskräfte zwischen den Proteinmolekülen in Lösung. Folglich werden Protein-Protein-Wechselwirkungen reduziert.

(II) Während der Adsorption von HPF-Molekülen auf Oberflächen ändert sich die Konformation. Diese Konformationsänderung wird durch die Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche beeinflusst, welche von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Oberfläche abhängen, d.h. Hydrophilie/Hydrophobie, Oberflächenladung und/oder funktionelle Gruppen.

Die Adsorption von HPF-Molekülen an hydrophilen Oberflächen resultiert aus Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen polaren  $\alpha$ C-Domänen und der polaren Oberfläche. Somit lagern sich  $\alpha$ C-Domänen an die Oberfläche und stehen nicht für die Wechselwirkung mit anderen HPF-Molekülen zur Verfügung.<sup>158</sup> Die Adsorption von HPF-Molekülen an hydrophoben Oberflächen resultiert jedoch aus dem hydrophoben Effekt.<sup>156, 159</sup> Unpolare Regionen der HPF-Moleküle, d.h. die D-Domänen und die zentrale E-Domäne, lagern sich an unpolare Oberflächen an.<sup>12, 32, 160</sup> Polare  $\alpha$ C-Domänen haften somit nicht an der Oberfläche und stehen für Wechselwirkungen mit anderen HPF-Molekülen zur Verfügung.

Folglich wurden bevorzugt auf hydrophilen Oberflächen einzelne HPF-Moleküle beobachtet, wohingegen hydrophobe Oberflächen die Bildung von HFP-Fibrillen und HPF-Fibrillennetzwerken fördern. Einzelne adsorbierte HPF-Moleküle wurden jedoch auf hydrophoben Materialoberflächen berichtet, wenn die Protein-Protein-Wechselwirkungen der HPF-Moleküle stark reduziert waren.<sup>32, 82</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde dies durch die Verwendung von CPL-Puffer mit einem pH-Wert von 9,2 erreicht. Es wird davon ausgegangen, dass der erhöhte pH-Wert die Deprotonierung von HPF-Molekülen in Lösung erleichtert. Infolgedessen wurde die trinodulär-stabförmige Konformation destabilisiert und somit weitere Konformationsänderungen ermöglicht. So adaptierte ein Teil der HPF-Moleküle eine globuläre Konformation, während die trinoduläre Stab-Konformation für die restlichen HPF-Moleküle erhalten blieb. Neben der Konformationsänderung inaktivierte die Deprotonierung auch die  $\alpha$ C-Domänen, welche dadurch an die zentrale E-Domäne gebunden blieben (Modell Abbildung 6.2d und e). Aufgrund der Inaktivierung der  $\alpha$ C-Domänen wurde die Wahrscheinlichkeit für Protein-Protein-Wechselwirkungen stark verringert und die Aggregation mehrerer HPF-Moleküle gehemmt. In der Folge adsorbierten einzelne globuläre oder trinodulär-

stabförmige HPF-Moleküle anstelle von Fibrillen oder Fibrillennetzwerken auf der PE-EK-Oberfläche.

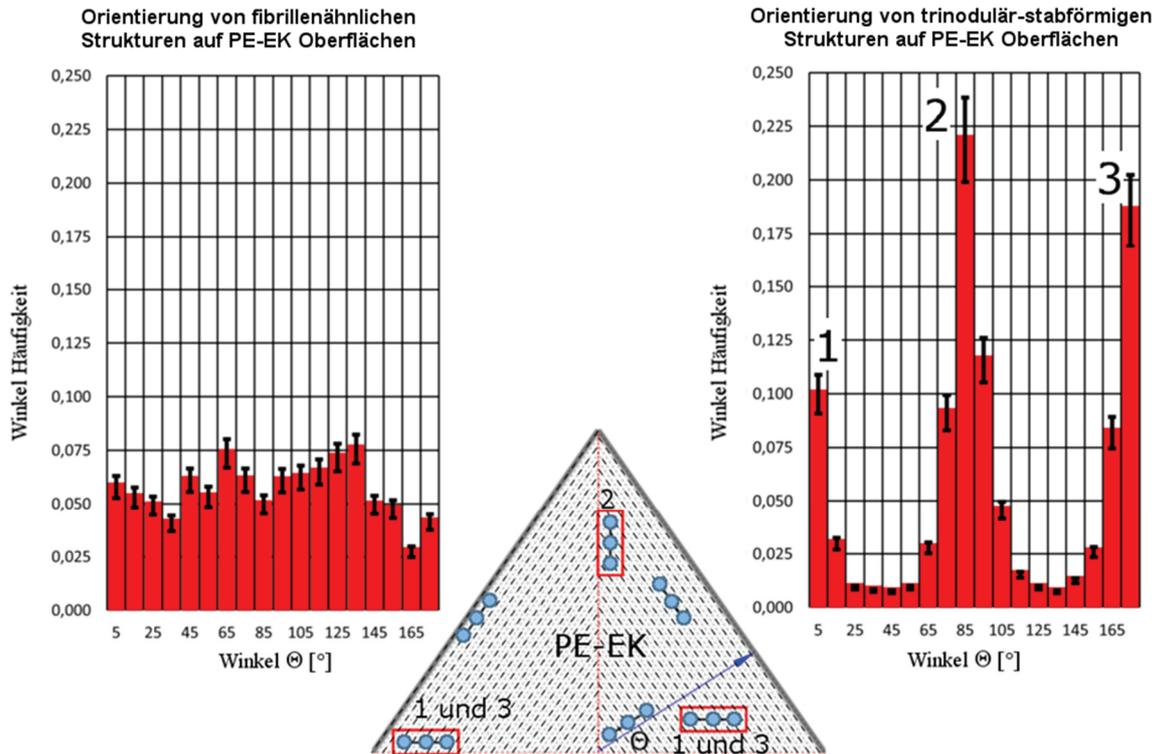
Sowohl HPF-Fibrillen als auch einzelne trinodulär-stabförmige-HPF haben eine anisotrope Form, d.h. sie sind länger als breit. Die Vorzugsrichtung einer nanostrukturierten Oberfläche kann die Orientierung dieser anisotropen Objekte während der Adsorption beeinflussen. Im Folgenden wurde der Einfluss der hydrophoben PE-EK-Oberflächennanostruktur auf die Orientierung von HPF-Fibrillen und einzelnen HPF-Molekülen untersucht.

### **6.1.3. Orientierung der Fibrinogenassemblierungen auf nanostrukturierten Polyethylen-Einkristall-Oberflächen**

Der PE-EK hat eine anisotrope Oberflächennanostruktur, wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben (Abbildung 2.2), welche durch die Kristallgitterparameter und Kettenfaltungen bestimmt wird. Um den Einfluss dieser PE-EK-Oberflächennanostruktur auf die Orientierung von HPF-Anordnungen zu untersuchen. Dafür wurden die aus der PBS-Lösung adsorbierten fibrillenähnlichen Strukturen und die aus der CPL-Lösung adsorbierten trinodulär-stabförmigen Strukturen ausgewählt, da die Orientierung dieser Strukturen mit Hilfe des AFMs sinnvoll bestimmt werden konnte. Dies war für die anderen Strukturen wie Netzwerke und dichten Schichten nicht möglich. Die Orientierung beider Strukturen, fibrillär- und trinodulär-stabförmig, wurde durch den Winkel zwischen der Längsachse der Proteinstrukturen und der kurzen Diagonale B des PE-EK bestimmt (Abbildung 2.2B).

Abbildung 6.3a zeigt die statistische Analyse der Winkelverteilung der fibrillenartigen Strukturen. Die Häufigkeit der kategorisierten Orientierungswinkel  $\theta$  reicht von 2,5 % für  $165^\circ \pm 5^\circ$  bis 7,5 % für  $135^\circ \pm 5^\circ$ . Maxima wurden für  $\theta_1^{max} = 135^\circ \pm 5^\circ$  und  $\theta_2^{max} = 65^\circ \pm 5^\circ$  und Minima für  $\theta^{min} = 165^\circ \pm 5^\circ$  identifiziert. Ein statistischer Beweis für eine bevorzugte Orientierung der adsorbierten fibrillenähnlichen Strukturen kann aufgrund der geringen Winkelhäufigkeitsunterschiede von 5 % zwischen  $\theta_{1\text{und }2}^{max}$  und  $\theta^{min}$  nicht abgeleitet werden.

Nach der Adsorption von CPL-Lösungen ( $\text{pH}_{\text{CPL}} = 9,2$ ) bei  $0,5 \mu\text{g/ml}$  und  $2,0 \mu\text{g/ml}$  HPF wurden trinoduläre-stabförmige Strukturen auf der PE-EK-Oberfläche beobachtet



**Abbildung 6.3:** Orientierung von Fibrinogenassemblierungen auf PE-EK: Winkelverteilung von fibrillenähnlichen (links) und trinodulär-stabförmigen (rechts) Strukturen auf PE-EK-Oberflächen. Für trinodulär-stabförmige Strukturen wurden die Maxima  $\theta_1^{max} = 0^\circ \pm 5^\circ$ ,  $\theta_2^{max} = 85^\circ \pm 5^\circ$  und  $\theta_3^{max} = 175^\circ \pm 5^\circ$  gefunden. Die Illustration (unten) zeigt die Winkelmessung und verschieden orientierte einzelne HPF-Moleküle. Die Maxima der trinodulär-stabförmigen Strukturen sind hervorgehoben.

(siehe Abbildung 6.1b und Abbildung 6.2d, e). Abbildung 6.3b zeigt die statistische Analyse der Winkelverteilung der trinodulären-stabförmigen Strukturen in Bezug auf die kurze Diagonale B des PE-EK. Die Häufigkeit der kategorisierten Orientierungswinkel  $\Theta$  liegt im Bereich von 1 % bis 22 %. Im Vergleich zu den PBS-Adsorptionsexperimenten wurden drei verschiedene Maxima  $\theta_1^{max} = 0^\circ \pm 5^\circ$ ,  $\theta_2^{max} = 85^\circ \pm 5^\circ$  und  $\theta_3^{max} = 175^\circ \pm 5^\circ$  identifiziert. Aufgrund der Symmetrie des HPF-Moleküls entspricht  $\theta_1^{max}$  dem  $\theta_3^{max}$ , so dass es nur zwei Vorzugsrichtungen gibt. Insgesamt wiesen 87 % der 1513 analysierten einzelnen HPF-Moleküle eine Orientierung in den Winkelbereichen von  $70^\circ$  bis  $110^\circ$  und von  $160^\circ$  bis  $20^\circ$  auf. Diese Beobachtung zeigt, dass die Oberflächennanostruktur des PE-EK die Orientierung einzelner adsorbierter HPF-Moleküle beeinflusst, aber interessanterweise nicht die Orientierung von HPF-Fibrillen.

Die Orientierung einzelner adsorbierter HPF-Moleküle kann durch die verschiedenen Oberflächenkettendichten der kristallographischen Richtungen der PE-EK-Oberfläche erklärt werden. Die maximalen Orientierungswinkel von  $\theta_1^{max} \sim 90^\circ$

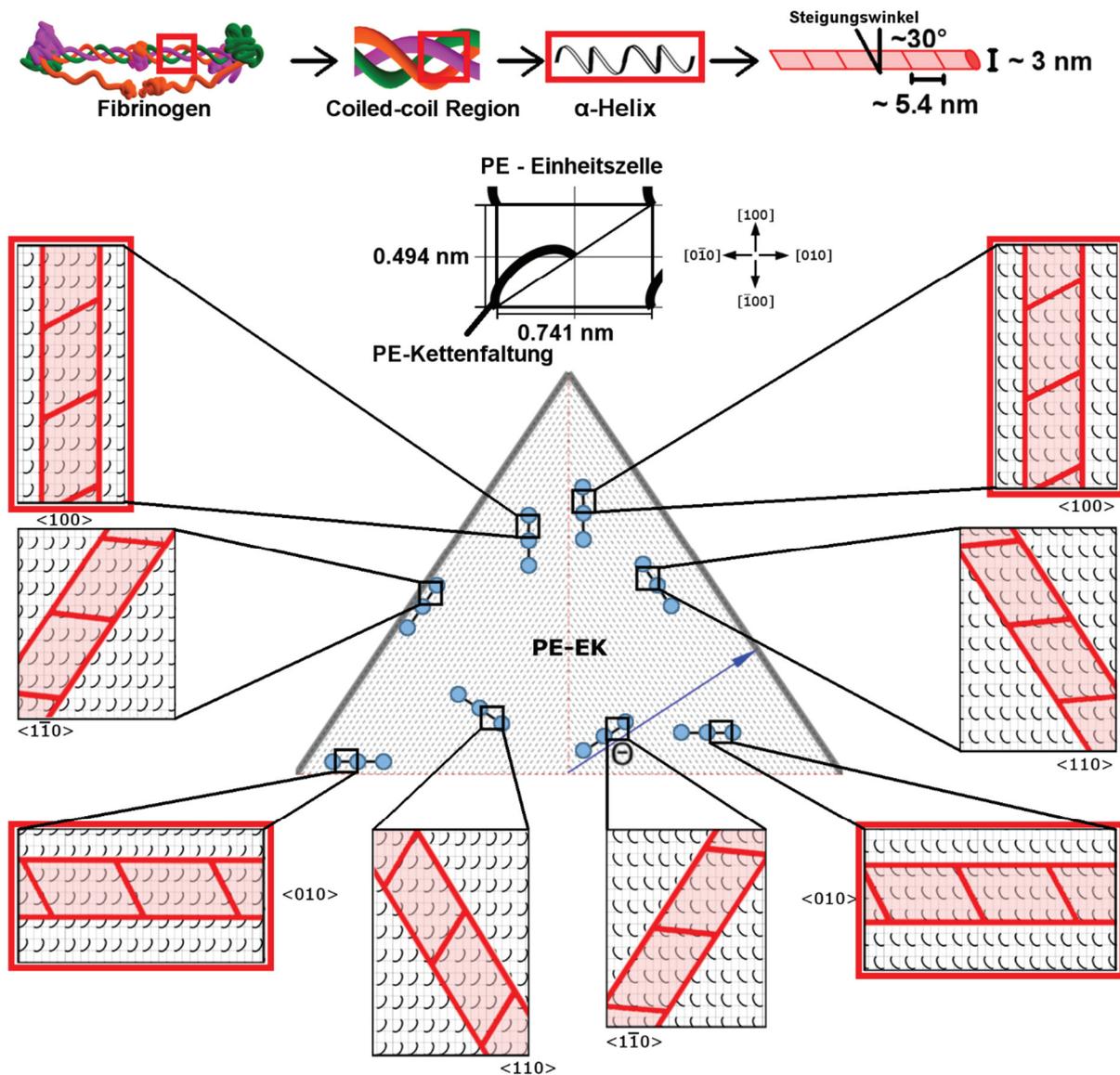
und  $\theta_2^{max} \sim 180^\circ$  entsprechen einer Orientierung einzelner HPF-Moleküle entlang der [100]- und [010]-Richtung des PE-EK. Sowohl die [100]- als auch die [010]-Richtung besitzen erhöhte lineare Oberflächenkettendichten (OKD) im Vergleich zu anderen kristallographischen Richtungen der PE-EK-Oberfläche. Die OKD wird hier als die Anzahl der Kettenfaltungsstartpunkte pro Entfernung (nm) in Bezug auf die kristallographische Richtung definiert. Basierend auf dieser Annahme hat die [010]-Richtung die höchste OKD mit 2,02 Kettenfaltungsstartpunkte pro nm ( $2,02 \text{ nm}^{-1}$ ). Auch die [100]-Richtung weist mit  $1,35 \text{ nm}^{-1}$  eine höhere OKD auf als die [110]-Richtung mit  $1,12 \text{ nm}^{-1}$ . Durch hohe OKD können die HPF-Moleküle entlang dieser kristallographischen Richtungen vermehrt intermolekulare Bindungen eingehen, welche somit eine Orientierung des Proteins bewirken. Dieser Effekt erklärt auch die bevorzugte Adsorption von HPF an den kristallinen Lamellen von teilkristallinem PE im Vergleich zu den amorphen PE-Bereichen.<sup>82</sup>

Diese beobachtete Orientierung von trinodulär-stabförmigen HPF-Molekülen auf PE-EK unterscheidet sich von der anderer in der Literatur beschriebenen stabartiger Strukturen. So zeigten Tellur-Nanostäbchen und aufgedampfte PE-Nanostäbchen (beides stabähnliche Kristalle) auf PE-EK-Oberflächen eine Orientierung vorzugsweise entlang der [110]-Richtung.<sup>151-152</sup> Im Vergleich zu den HPF-Molekülen wurde angenommen, dass die Orientierung der kleinen PE-Moleküle und der stabähnlichen Tellur-Kristalle durch kurze intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Kettenfaltungen und den Molekülen angetrieben wird. In beiden Fällen wurde die Orientierung durch die Ausrichtung der Ketten (PE) und der anisotropen Kristallisationskeime (Te) während der Kristallisation entlang oder senkrecht zur Kettenfaltenrichtung induziert.<sup>151-152</sup>

Während der Adsorption an hydrophoben Oberflächen beginnen sich die E- und D-Domänen eines HPF-Moleküls auszubreiten, um die Kontaktfläche zu vergrößern.<sup>32, 160</sup> Somit müssen die Strukturen, welche die E- und D-Domänen bilden, ihre Orientierung ändern.<sup>85</sup> Auf hydrophoben Oberflächen wie dem PE-EK sind  $\alpha$ -Helix-Strukturen dominant.<sup>161</sup> Eine Region im HPF-Molekül, die vorwiegend aus  $\alpha$ -Helix-Strukturen besteht, ist die Coiled-coil-Region. Diese Strukturen sind aber auch in den E- und D-Domänen vorhanden, wo sie sich in den äußeren Bereichen befinden.<sup>85</sup> Die beobachteten Orientierungen von trinodulär-stabförmigem HPF-Molekülen auf PE-EK können wie folgt erklärt werden: Die  $\alpha$ -Helix-Strukturen der Ketten, die sich im äußeren Teil des Proteins befinden<sup>85</sup>, beeinflussen die Orientierung, da die Abmessungen (Breite und

Steigungslänge) und der Steigungswinkel der  $\alpha$ -Helix denen der PE-Einheitszelle ähneln.<sup>161-162</sup> Die  $\alpha$ -Helix hat einen Steigungswinkel, der Winkel zwischen Steigung und Helix-Querachse, von etwa 30 °. Dies entspricht in etwa dem Winkel der [010]- und [110]-Richtungen, welcher 33,7 ° beträgt. Die helikalen Strukturen von HPF-Molekülen, welche entlang der [010]-Richtung orientiert sind, richten sich vermutlich parallel zu den PE-EK-Kettenfaltungen aus, wodurch ihre freie Gibbs-Energie minimiert wird. Unter dieser Annahme ist die Orientierung der  $\alpha$ -Helix-Ketten identisch mit den in früheren Untersuchungen gefundenen PE- und Tellur-Nanostäbchen.<sup>151-152</sup> Darüber hinaus sind die Abmessungen (Breite und Steigungslänge) einer  $\alpha$ -Helix in der gleichen Größenordnung wie die der PE-Einheitszelle (Abbildung 6.4). Das Modell in Abbildung 6.4 zeigt, dass sich die Windungen einer  $\alpha$ -Helix zwischen zwei Kettenfaltungen in Richtung [010] von Sektor I und [100] von Sektor IV stapeln lassen. Diese Richtungen ähneln der beobachteten bevorzugten Orientierung einzelner HPF-Moleküle (Abbildung 6.3). Das Stapeln wird durch die ähnliche Ausrichtung der Kettenfaltungen auf der PE-EK-Oberfläche und der Ketten in der Helix erleichtert. Eine Änderung der  $\alpha$ -Helix-Orientierung führt zum „Entstapeln“ der Windungen. Ferner deckt eine in [010]-Richtung ausgerichtete Helix die höchste Anzahl von Kettenfaltungen (Abbildung 6.4) ab und weist auch die höchste OKD auf, so dass die meisten intermolekularen Wechselwirkungen ausgebildet werden. Neben der [010]-Orientierung wurden HPF-Moleküle beobachtet, welche entlang der [100]-Richtung orientiert waren. Diese Richtung hat die zweithöchste OKD, wie in Abbildung 6.4 dargestellt. Dies führt zu einer Zunahme der gebildeten intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Kettenfaltungen und der  $\alpha$ -Helix-Kette. Beide Effekte zusammen, die beiden höchsten OKD und die mögliche Stapelung der  $\alpha$ -Helix-Kette zwischen den Kettenfaltungen in Abhängigkeit vom Sektor des PE-EK, können offensichtlich die Orientierung von HPF-Molekülen beeinflussen. Die Beobachtung von HPF-Molekülen ohne die bevorzugte Orientierung kann durch Defekte der PE-EK-Oberfläche, z.B. lose Schleifen, erklärt werden. Diese Defekte führen zu einer Änderung der Orientierung der PE-Kettenfaltungen und beeinflussen somit die Orientierung einzelner HPF-Moleküle.

Der beschriebene Orientierungseffekt wurde jedoch nur für einzelne HPF-Moleküle beobachtet, welche auf der nanostrukturierten PE-EK-Oberfläche adsorbierten. Hingegen wiesen HPF-Fibrillen keine bevorzugte Orientierung auf und bildeten sich aufgrund von Konformationsänderungen einzelner adsorbierter HPF-Moleküle auf der hydrophoben



**Abbildung 6.4:** Modell (maßstabsgerecht) für die Orientierung von  $\alpha$ -Helixstrukturen in Abhängigkeit der kristallographischen Richtungen. Oben: Fibrinogenmodell, in welchem die  $\alpha$ -Helix-reiche Region, die Coiled-coil-Region, hervorgehoben ist. Die  $\alpha$ -Helix ist als einfacher Zylinder mit einer Breite von  $\sim 3$  nm (Aminosäurereste nicht berücksichtigt) und einer Steigungslänge von  $\sim 5,4$  nm dargestellt;<sup>1</sup> die Windungen der Spirale sind markiert (Steigungswinkel  $\sim 30^\circ$ ). Unten: Die PE-Einheitszelle mit den Dimensionen  $a = 0,494$  nm und  $b = 0,741$  nm.<sup>2</sup> Die Mitte zeigt die Sektoren I und IV eines PE-EK mit unterschiedlich orientierten HPF-Molekülen. Die Ausschnitte am Rand zeigen mögliche Ausrichtungen einer entsprechenden  $\alpha$ -Helix. Die beobachteten Vorzugsorientierungen sind rot hervorgehoben.

PE-EK-Oberfläche. Diese Beobachtung kann durch die erhöhten Protein-Protein-Wechselwirkungen bei der Adsorption aus PBS-Lösung ( $\text{pH}_{\text{PBS}} = 7,4$ ) im Vergleich zur CPL-Lösung ( $\text{pH}_{\text{CPL}} = 9,2$ ) erklärt werden. Wie zuvor erwähnt, erhöht der niedrigere pH-Wert die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den adsorbierten benachbarten HPF-Molekülen und induziert somit die Fibrillenbildung. Der Bildungsprozess selbst beeinflusste demnach die Orientierung der Fibrillen stärker als die erhöhte OKD

bestimmter kristallographischer Richtungen. Aufgrund der erhöhten Molmasse der HPF-Fibrillen ist die Oberflächendiffusion, im Vergleich zur Oberflächendiffusion von einzelnen HPF-Molekülen, erschwert. Eine Kombination aus oberflächeninduzierter Fibrillenbildung und einer begrenzten Oberflächendiffusion dieser HPF-Fibrillen hemmt somit ihre Orientierung.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die laterale Diffusion von Proteinen auf Oberflächen stark durch Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie die Oberflächenhydrophilie/ -hydrophobie beeinflusst wird. Bei der Adsorption von BSA auf PMMA-Oberflächen wurde eine signifikant niedrigere Oberflächendiffusionsgeschwindigkeit aufgrund der vorherrschenden Protein-Protein-Wechselwirkungen beobachtet.<sup>163</sup> Für HPF, welches auf nanostrukturierten, schmelzgezogenen PE-Filmen adsorbierte, wurde eine abnehmende Oberflächendiffusion der Moleküle mit zunehmenden Protein-Protein-Wechselwirkungen beobachtet. Außerdem werden die bereits schwächeren Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen durch Erhöhung der Protein-Protein-Wechselwirkungen weiter verringert.<sup>1, 164</sup> Darüber hinaus führen die erhöhten Protein-Protein-Wechselwirkungen zu längeren Verweilzeiten von HPF-Molekülen auf der Oberfläche.<sup>85</sup>

In früheren Studien wurde die bevorzugte Orientierung von Proteinen entweder durch eine heterogene Oberflächenchemie, z.B. durch Verwendung von amphiphilen Diblockcopolymeren,<sup>77</sup> oder durch eine definierte Oberflächentopographie mit Abmessungen im Bereich des Proteins, wie z.B. gewellten Strukturen,<sup>165</sup> induziert. Bei Diblockcopolymeren wurde festgestellt, dass Proteine bevorzugt auf hydrophoben Domänen adsorbieren.<sup>77</sup> Im Gegensatz dazu wurde bei gewellten Siliziumsubstraten gezeigt, dass die Orientierung adsorbierter einzelner HPF-Moleküle von der Wellenlänge der Oberflächenstruktur abhängt, da mit zunehmender Oberflächenkrümmung die Adsorptionsenergie abnimmt.<sup>165</sup> Des Weiteren wurde eine Orientierung von HPF-Molekülen sowie von HPF-Nanofibrillen an Nanostufen von hochorientierten pyrolytischen Graphit-Schichten beobachtet.<sup>150</sup> In den vorangegangenen Studien lagen die verwendeten Strukturen in der Größenordnung von 50 nm. In der vorliegenden Arbeit wurde die Orientierung der HPF-Moleküle jedoch durch die sub-nanoskalige Oberflächenstruktur der PE-EK induziert. Der PE-EK hat eine chemisch homogene Oberfläche mit einer anisotropen Topographie unterhalb der Längenskala der Proteindimension. Die einzelnen HPF-Moleküle auf der PE-EK-Oberfläche orientieren

sich entlang kristallographischer Richtungen mit einer erhöhten OKD, um möglicherweise die Anzahl an intermolekularen Bindungen zwischen Oberfläche und Protein zu vergrößern. Eine bevorzugte Ausrichtung von HPF-Fibrillen wurde jedoch nicht beobachtet und kann im Vergleich zu einzelnen HPF-Molekülen durch erhöhte Protein-Protein-Wechselwirkungen und eine verminderte Proteindiffusion erklärt werden.

#### **6.1.4. Kapitelzusammenfassung**

Nanostrukturierte Polymeroberflächen haben das Potential die Adsorption von Proteinen auf Biomaterialoberflächen zu verstehen und zu steuern. Ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung von Proteinwechselwirkungen und deren Anordnung auf Oberflächen sind hydrophobe PE-EK, die eine definierte und durch PE-Kettenfaltungsbögen gebildete Oberflächen-Nanostruktur aufweisen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich HPF-Moleküle auf diesen chemisch homogenen Oberflächentopographien, welche um eine Größenordnung kleiner sind als die niedrigste Dimension des Proteins, ausrichten können. Durch die Orientierung der Kettenfaltungsbögen an der PE-EK-Oberfläche steigern die einzelnen HPF-Moleküle die Anzahl intermolekularer Oberflächenproteinbindungen entlang kristallographischer Richtungen mit erhöhter OKD was die Orientierung der einzelnen Moleküle zur Folge hat. Zusätzlich unterstützen die ähnlichen Abmessungen der  $\alpha$ -Helix und der Kettenfaltungsbögen ein ineinandergreifen der Strukturen und somit deren Ausrichtung. Die stärkeren Protein-Protein-Wechselwirkungen, welche durch die Verringerung des pHs auftraten induzierten die Assemblierung von HPF zu Fasern und faserartigen Netzwerken. Die sich assemblierenden HPF-Strukturen zeigten keine bevorzugte Orientierung. Als Grund wird eine verminderte Oberflächendiffusion angenommen. Das Verständnis von Proteinaufbau und -orientierung ist entscheidend für die Anwendung von Biomaterialien in Kontakt mit einem biologischen System. In dieser Arbeit wurde im Weiteren eine Strategie zur Kontrolle und Orientierung von Proteinen auf nanostrukturierten polymeren Biomaterialien vorgestellt, um die Oberflächenfunktionalitäten wie Zelladhäsion zukünftiger Implantate und Biosensoren zu steuern.

## 6.2. Selbstassemblierte Proteinfasern aus Albumin und Hämoglobin<sup>II</sup>

Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war die erstmalige Erzeugung neuartiger selbstassemblierter heterogener Plasmaproteinnanofasern mittels Ethanol- und Temperatur-induzierter Strukturänderung. Die Änderung der selbstassemblierten hPNF-Morphologie wurde nach verschiedenen Assemblierungszeiten mit Hilfe des AFM bestimmt. Im folgenden Schritt wurde die Änderung der Sekundärstruktur sowie die Assemblierungskinetik untersucht. Erstmals wurde TERS verwendet um den heterogenen Charakter der neuartigen hPNF nachzuweisen. Dieser wurde zusätzlich mittels Immunogold-Markierung bestätigt. Basierend auf den gewonnenen Struktureigenschaften-Beziehungen wurde ein Modell zur Entstehung der Strukturen entwickelt, welches die Vorhersage neuer potentieller hPNF erlaubt.

### 6.2.1. Herstellung und Charakterisierung von selbstassemblierten heterogenen Proteinfasern

Inspiziert von der Arbeit von Juárez *et al.*, die zeigten, dass HSA selbstassemblierte PNF in 50 Vol.% Ethanol und bei 65 °C bilden, wurde dies auch als Selbstassemblierungsbedingung für HSA und HGB (Gewichtsverhältnis 1:1) gewählt.<sup>33</sup> HSA wurde als eine Modellkomponente gewählt, da dessen Selbstassemblierungsmechanismus bekannt ist.<sup>55, 100</sup> Darüber hinaus ist bekannt, dass die Zugabe verschiedener Moleküle wie Zucker oder Proteine die HSA-Faserbildung sowohl fördern als auch hemmen kann.<sup>96, 166-167</sup> Für HGB wurde bereits über die Bildung von koassemblierten Peptid-HGB-Fasern berichtet.<sup>122</sup>

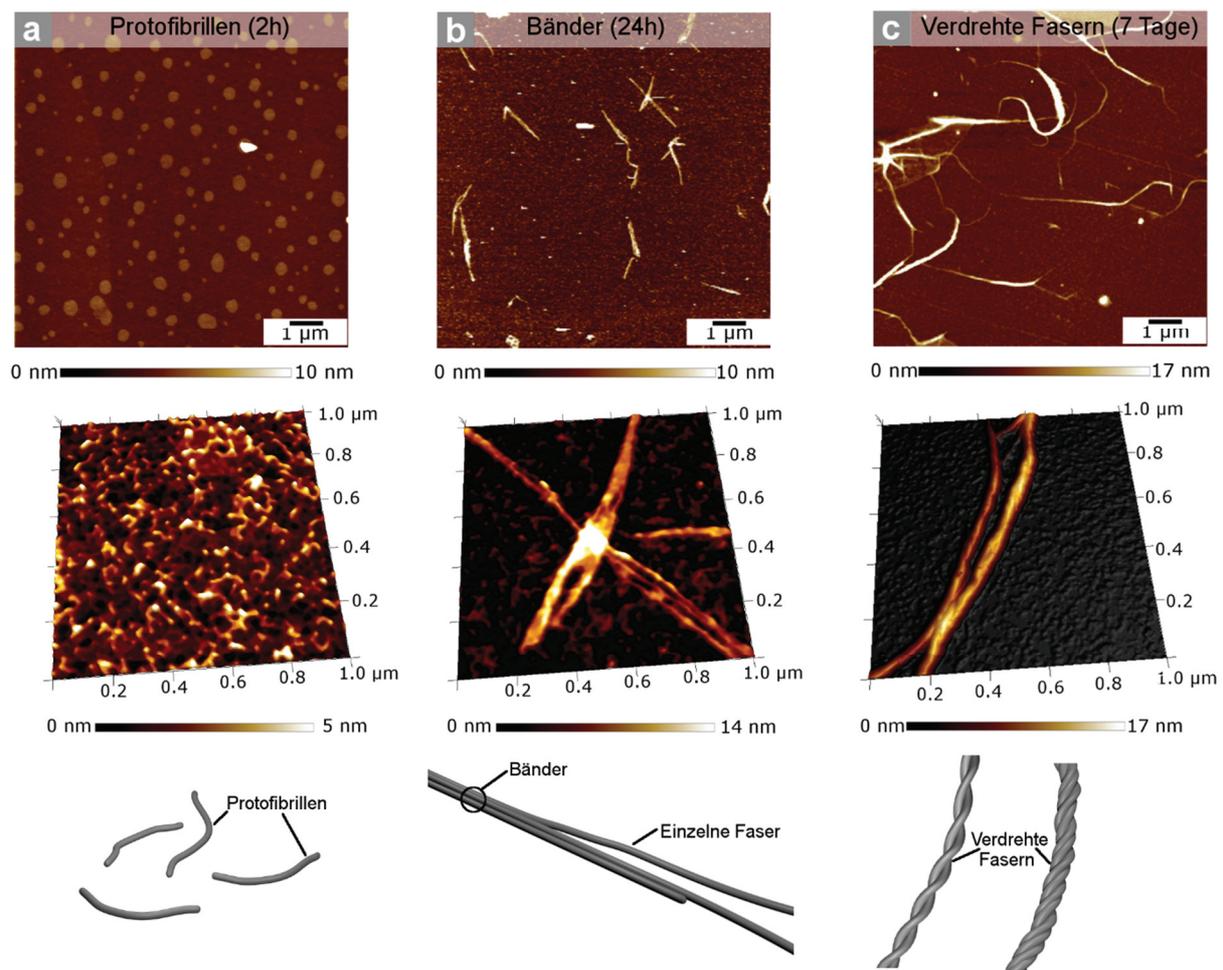
Um den Einfluss von HGB auf die Faserbildung zu testen, wurde die HSA-HGB-Lösung nach verschiedenen Assemblierungszeiten auf plasma-gereinigte Siliziumwafer abgeschieden und mit dem AFM charakterisiert. Abbildung 6.5 zeigt typische HSA-HGB-

---

<sup>II</sup> Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits in abgewandelter Form veröffentlicht, in: C. Helbing, T. Deckert-Gaudig, I. Firkowska-Boden, G. Wei, V. Deckert, K. D. Jandt. Protein Handshake on the Nanoscale: How Albumin and Hemoglobin Self-Assemble into Nanohybrid Fibers. *ACS Nano*; 12; 1211-1219; ©2018 American Chemical Society.

Assemblierungsstrukturen und ihren zeitabhängigen Polymorphismus, d.h. die Änderung von Protofibrillen über Bandstrukturen zu verdrehten Fasern. Eine ähnliche Art von zeitabhängigem Polymorphismus wurde in früheren Studien für reine HSA-Nanofasern bei einem pH-Wert von 2 berichtet und diskutiert.<sup>55, 100</sup> In der vorliegenden Arbeit war der Anfangszustand der Faserbildung die Bildung von Protofibrillen, die innerhalb der ersten zwei Stunden stattfand (Abbildung 6.5a). Die Protofibrillen waren etwa 1 nm hoch und einige hundert nm lang.

Der intermediäre Zustand (6-24 Stunden) umfasst die Einzelfaserbildung und deren bevorzugte Side-by-Side-Ausrichtung zu Bandstrukturen, wie schematisch in Abbildung 6.5b dargestellt. Laut Literatur wird die Faseranordnung zu Bändern durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einzelnen Proteinfasern angetrieben.<sup>168</sup> Ähnliche Wechselwirkungen zwischen einzelnen Nanofasern durch Ethanol induzierte Exposition von hydrophoben Seitenketten und polaren Gruppen sind



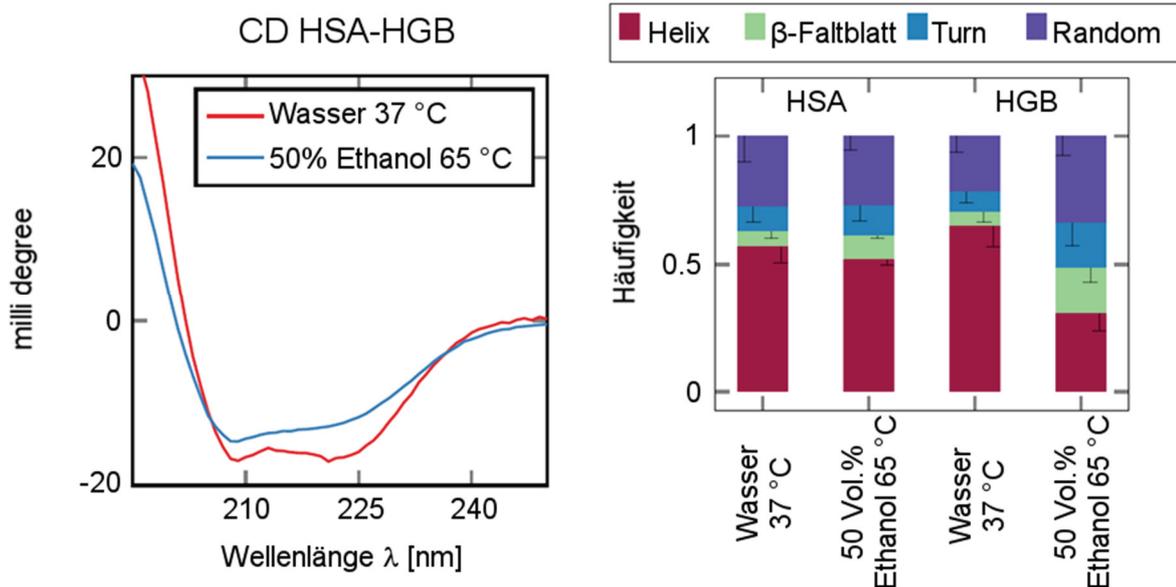
**Abbildung 6.5:** HSA-HGB-hPNFs: Übersichts- (oben) und Detail-AFM-Höhenbilder (Mitte) von assemblierten HSA-HGB-Strukturen und deren schematische Darstellung (unten) nach verschiedenen Assemblierungszeiträumen (2 h, 24 h und 7 Tage) (100 µg/mL HSA/HGB (1:1, w/w), 50 % Ethanol und 65 °C)

im hier genutzten System möglich.<sup>55, 169</sup> Die charakteristische Länge der Bandstrukturen lag nach 6 bzw. 24 Stunden im Bereich von 611 bis 985 nm. Interessanterweise betrug die Breite einzelner Nanofasern  $22 \pm 4$  nm, was etwa der doppelten Breite entspricht, die in der Literatur für reine HSA-Fasern unter ähnlichen Wachstumsbedingungen berichtet wurde.<sup>55</sup> Diese Diskrepanz ist der erste Hinweis darauf, dass die HSA-Faserbildung durch das zweite Protein beeinflusst wird und auf eine heterogene Proteinfaserbildung hindeutet.

Durch die Verlängerung der Assemblierungszeit auf mehrere Tage entwickelten sich die Bandstrukturen zu verdrehten Nanofasern mit einer Breite von  $59 \pm 10$  nm und wuchsen auf eine Länge von bis zu 6  $\mu$ m (Abbildung 6.5c). Das Aspektverhältnis stieg mit der längeren Assemblierungszeit von 7 Tagen auf bis zu 100. Gedrehte Faserstrukturen wurden für verschiedene Proteine beobachtet, einschließlich HSA, Insulin und Ovalbumin.<sup>91, 101, 170</sup> Für verdrehte Insulin-Nanofasern wurde vermutet, dass die Bildung überwiegend durch carboxylreiche Bereiche an der Oberfläche beeinflusst und somit die Orientierung bei der Anlagerung durch die vorhandenen Bereiche der Oberfläche induziert wird.<sup>170</sup> Ein ähnlicher Mechanismus könnte für die Bildung der verdrehten und flachen Fibrillen verantwortlich sein, die im hier beschriebenen HSA-HGB-System beobachtet wurden.

### **6.2.2. Bestimmung der Sekundärstruktur von Albumin, Hämoglobin und heterogenen Albumin-Hämoglobin Proteinfasern**

Zur Bestimmung der Sekundärstrukturen in den HSA-HGB-PNF bzw. den HSA-HGB-Dispersionen wurden CD-Messungen durchgeführt. In Abbildung 6.6 sind die resultierenden Spektren für HSA-HGB in Wasser bei 37 °C und in 50 Vol.% Ethanol bei 65 °C dargestellt. Die sichtbaren Unterschiede im Signal entsprechen einer Veränderung der Sekundärstruktur. Die Bestimmung der genauen Anteile verschiedener Sekundärstrukturen war in der Mischproteinlösung nicht möglich. Die Minima bei 208 und 221 nm deuten jedoch darauf hin, dass Proteine in der Lösung (Wasser bei 37 °C) hauptsächlich aus helikalen Strukturen bestehen.<sup>55</sup> Eine Erhöhung der Temperatur auf 65 °C und die Erhöhung der Ethanolkonzentration auf 50 Vol.% führten zu einer Abnahme



**Abbildung 6.6:** Sekundärstruktur HSA-HGB, HSA und HGB: links: CD-Spektroskopie von HSA-HGB-Mischungen in Wasser bei 37 °C (rot) und in 50 Vol.% Ethanol bei 65 °C (blau). Rechts: Anteil der Sekundärstrukturen in HSA und HGB in Wasser bei 37 °C und in 50 Vol.% Ethanol bei 65 °C.

der Helixstrukturen, was dem Verschwinden des Minimums bei 221 nm und der Verschiebung der anderen Minima von 208 nm zu niedrigeren Wellenlängen entspricht (Abbildung 6.6).<sup>55</sup> Dies zeigt weiter, dass der Anteil von  $\beta$ -Faltblatt- und Turn-Strukturen zunimmt. Um diese Annahmen zu bestätigen, wurden CD-Messungen der einzelnen Proteine unter den PNF-Bildungsbedingungen (50 Vol.% Ethanol, 65 °C) und in quasi-nativen Bedingungen (Wasser, 37 °C) durchgeführt. Ihre Sekundärstrukturen unter den ausgewählten Bedingungen sind in Abbildung 6.6 dargestellt. In 50 Vol.% Ethanol bei 65 °C zeigte HSA eine geringfügige Änderung des Gehalts an Helixstrukturen von 57 % (nativ) auf 52 %. Darüber hinaus veränderte sich der Anteil der  $\beta$ -Faltblattstrukturen leicht von 6 % (nativ) auf 9 % (50 Vol.% Ethanol, 65 °C). Im Gegensatz dazu zeigte HGB einen stärkeren Anstieg der  $\beta$ -Faltblattstrukturen im Vergleich zu HSA von 5 % (nativ) auf 19 % (50 Vol.% Ethanol 65 °C). Darüber hinaus sank der Gehalt der  $\alpha$ -helikalen Strukturen von 65 % (nativ) auf 30 % (50 Vol.% Ethanol 65 °C). Beide Proteine bestehen unter nativen Bedingungen aus überwiegend helikalen Strukturen, was in guter Übereinstimmung mit den CD-Ergebnissen für die HSA-HGB-Lösung ist. Die einzelnen Proteine zeigten jedoch einen Rückgang der  $\alpha$ -Helixstrukturen und einen Anstieg der  $\beta$ -Faltblätter und Turns unter PNF-Bildungsbedingungen, was die Rückschlüsse aus dem Spektrum der HSA-HGB-Lösung bestätigt. Interessanterweise zeigten die Untersuchungen der einzelnen Proteine, dass beide unter Assemblierungsbedingungen immer noch einen großen Anteil an helikalen Strukturen haben. Was im Gegensatz zu

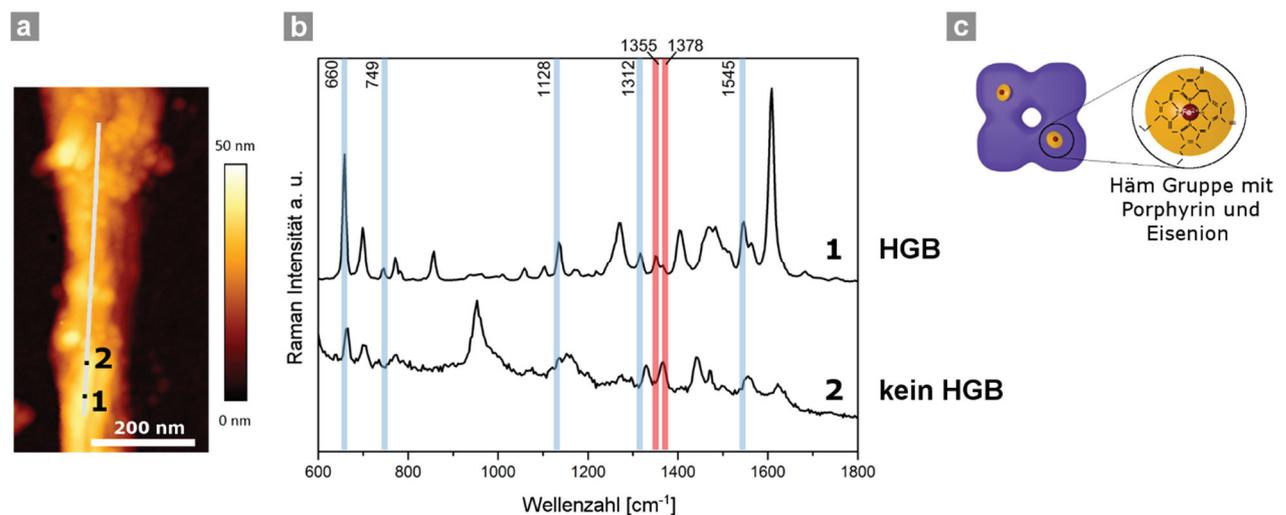
amyloiden Strukturen steht, welche hauptsächlich aus  $\beta$ -Faltblattstrukturen bestehen.<sup>9</sup> Weiterhin führt die Zugabe von Ethanol, wie von Juárez *et al.* berichtet, insbesondere bei HGB zur Destabilisierung der Proteinstrukturen durch die Verringerung von Wasserstoffbrückenbindungen und attraktiven hydrophoben Wechselwirkungen.<sup>55</sup> Diese Destabilisierung kann sowohl die Proteinaggregation als auch die Interaktion zwischen HSA- und HGB-Molekülen erleichtern.

### **6.2.3. Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie – optische Eigenschaften von heterogenen Proteinfasern**

Wie aus bestehenden Studien zu heterogenen Proteinsystemen hervorgeht, bleibt die Validierung der Wechselwirkung verschiedener Proteine und somit der heterogenen Faserzusammensetzung eine große Herausforderung.<sup>18-19, 122</sup> Die nanoskaligen Dimensionen der Proteine und PNF erfordern ein nicht-invasives, aber hochempfindliches Instrument mit hoher räumlicher Auflösung, um die heterogene Natur von PNF zu überprüfen. Die Kombination von AFM- und Raman-Spektroskopie, bekannt als TERS, hat sich bei der Charakterisierung kleiner Biomoleküle, z.B. von Proteinen, als sehr hilfreich erwiesen.<sup>170-174</sup> Die Anwendung von TERS ist in der vorliegenden Arbeit möglich, da Raman-aktive Schwingungsmodi in den vier Häm-Gruppen (Porphyrinring mit Eisen (Fe)-Ionen) des HGB-Moleküls vorhanden sind (siehe Tabelle A 2, Abbildung A 2 und Abbildung 6.7b). Die Häm-Resonanz-Raman-Spektren werden von den Banden bei  $660\text{ cm}^{-1}$ ,  $749\text{ cm}^{-1}$ ,  $1128\text{ cm}^{-1}$ ,  $1312\text{ cm}^{-1}$ ,  $1545\text{ cm}^{-1}$  (Tabelle A 2)<sup>175-177</sup> dominiert, einschließlich der Banden, die sich auf Eisenschwingungen bei  $1355\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{Fe}^{2+}$ ) und  $1378\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Tabelle A 2) beziehen.<sup>177</sup> HSA gehört zu einer Proteinfamilie, welche keine Häm-Gruppe besitzt.<sup>178-179</sup> Somit kann das Raman-Spektrum im direkten Vergleich zu HGB unterschieden werden. Die Nachweisbarkeit hämhaltiger Proteine durch Raman-Spektroskopie und TERS wurde bereits früher berichtet.<sup>177, 180</sup> So konnten beispielsweise durch die gewonnenen Strukturinformationen Oxidationsprozesse auf einer Kristalloberfläche<sup>177</sup> oder ein Elektronentransfer identifiziert werden.<sup>181</sup> Mit TERS wurden über mehrere nm ortsaufgelöste Raman-Spektren gesammelt, um das Vorhandensein von HGB in den assemblierten PNF zu bestimmen. Dies würde auf eine heterogene HSA-HGB-Faserbildung hinweisen. Abbildung 6.7b zeigt zwei repräsentative TERS-Spektren aus Abbildung A 2, welche an einer einzelnen HSA-HGB-hPNF

aufgenommen wurden. Spektrum 1, das an Position 1 gesammelt wurde, zeigt einen charakteristischen HGB-Fingerabdruck, nämlich Porphyrin (blau markiert) und Eisenionenbanden (rot). Im Gegensatz dazu sind in Spektrum 2 keine HGB-bezogenen Banden vorhanden, was auf das Fehlen einer Häm-Gruppe und damit auf HSA hinweist. Weiterhin kann der Unterschied in der Intensität zwischen den aufgezeichneten Spektren auf die photoverstärkende Eigenschaft der Häm-Gruppe zurückgeführt werden.<sup>182</sup> Die sehr geringe Signalstärke in Spektren 24-49 der Abbildung A 2 kann somit durch das Fehlen des photoverstärkenden Effektes erklärt werden. Neben den erwarteten Protein-bezogenen Banden wurden in den TERS-Messungen auch Banden zwischen 1710 und 1745  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet (Abbildung A 2), welche für Proteine untypisch sind. Diese können Estergruppen zugeordnet werden, die vermutlich aus einer unerwarteten Nebenreaktion zwischen Ethanol (Lösungsmittel) und den Carboxylgruppen der Proteine stammen.

Insgesamt konnten in 4 % der analysierten TERS-Spektren ( $n = 526$ ) sowohl alle Porphyrinbanden mit und ohne Eisenbanden, als auch vier von fünf Porphyrinbanden in Kombination mit den Eisenbanden erfolgreich identifiziert werden. Das native HGB-Molekül hat einen Durchmesser von 5 nm und besitzt 4 Häm-Gruppen.<sup>183</sup> Unter Berücksichtigung der denaturierten und damit entfalteten Struktur des HGB in der



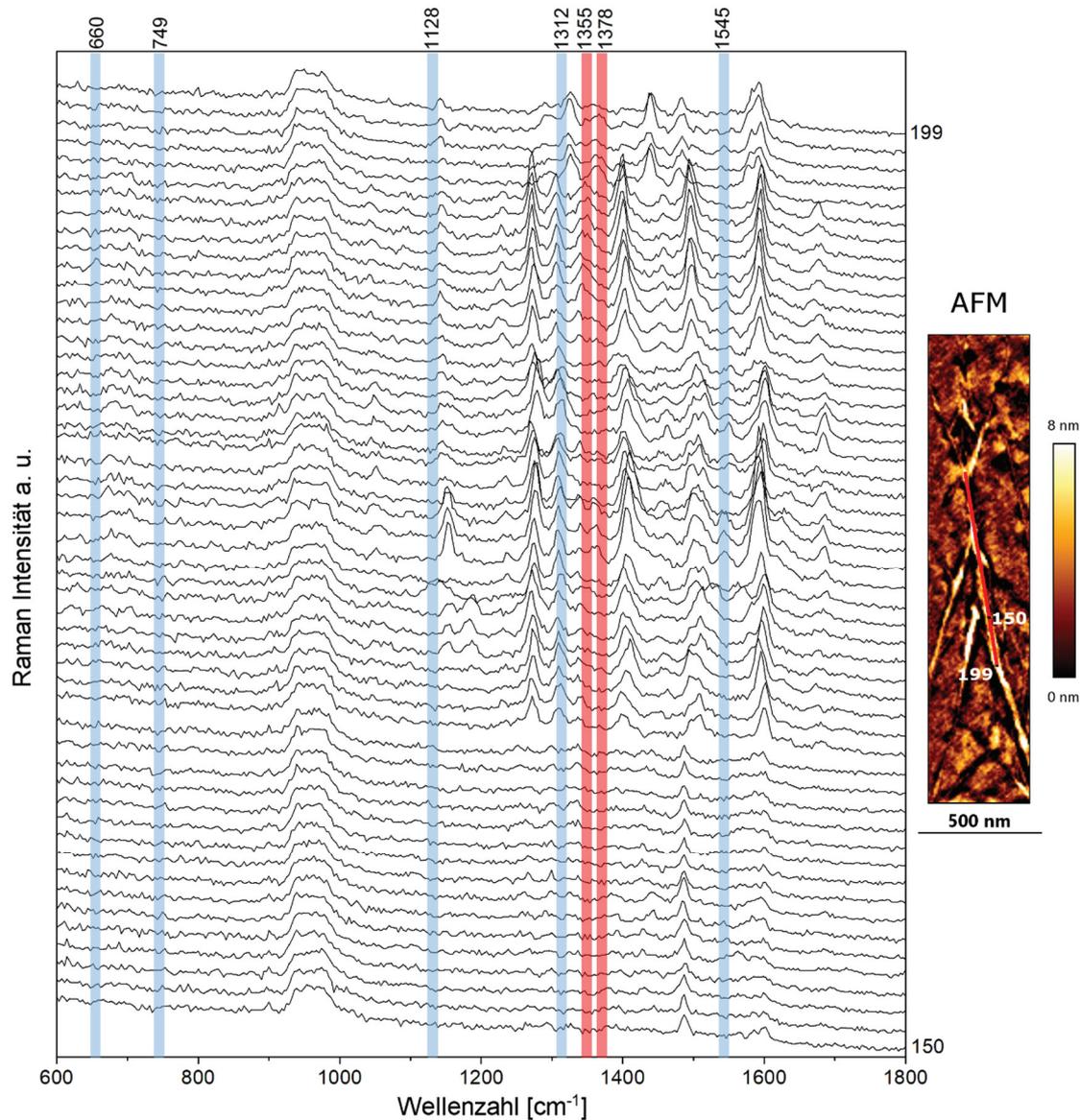
**Abbildung 6.7:** TERS an HSA-HGB hPNF: (a) AFM-Höhenbild einer einzelnen HSA-HGB-Faser. Die weiße Linie stellt den TERS-Messbereich und die beiden Punkte dar, wo die Spektren in (b) aufgenommen wurden. (b) Zwei repräsentative TERS-Spektren mit und ohne charakteristische HGB-Banden. Für einen besseren Vergleich wurde die Intensität von Spektrum 1 verringert. In den dargestellten Spektren sind entsprechende Banden für Porphyrin (660, 749, 1128, 1312, 1545  $\text{cm}^{-1}$ ) blau und für  $\text{Fe}^{2+}$  (1355  $\text{cm}^{-1}$ ) und  $\text{Fe}^{3+}$  (1378  $\text{cm}^{-1}$ ) rot markiert (Anregung bei 532 nm, Laserleistung 360  $\mu\text{W}$ , Erfassungszeit 1 s). Die Bande um 1640 bis 1679  $\text{cm}^{-1}$  entspricht der Amid-I-Bande der Peptidbindungen der Proteine. (c) Schematische Darstellung eines HGB-Moleküls mit zwei Häm-Gruppen, dem Porphyrinring und dem Eisenkation der Häm-Gruppe

Nanofaser (Abbildung 6.6) sollten die Häm-Gruppen alle 6 bis 10 nm beobachtet werden. Folglich wird von einem Auftreten der charakteristischen Banden, bei einer Schrittweite von 2,0-2,5 nm in den TERS-Messungen, in mindestens 20-25 % der Spektren ausgegangen - vorausgesetzt, die Proteinfaser besteht nur aus HGB. Bei HSA-HGB-hPNF sollte nur jedes zehnte Spektrum Häm-bezogen sein. In Anbetracht der oben genannten Überlegungen ist der niedrige Prozentsatz ein zuverlässiger Indikator für eine erfolgreiche HSA-HGB-Koassemblierung. Eine detaillierte Analyse des Erscheinungsbildes der Häm-Gruppen entlang der TERS-Scanlinie, wie in Abbildung A 2 dargestellt, impliziert eine inhomogene (nicht alternierende) Verteilung des HGB in den hPNF. Das kontinuierliche Auftauchen/Verschwinden von Häm-Gruppen entlang der TERS-Scanlinie lässt sich weiter durch eine Fehlausrichtung des HGB in Bezug auf die Scanlinie erklären.

Zu beachten ist, dass TERS eine oberflächensensitive Spektroskopiemethode ist, die den Nachweis der Raman-Streuung aus einem nanoskopischen Volumen ermöglicht. Trotz der Resonanzverstärkung des Häms durch Anregung bei 532 nm sind Informationen über die innere Zusammensetzung der PNF nicht zuverlässig möglich.<sup>184</sup> Dennoch zeigen die TERS-Daten, (i) dass ein gewisser Teil des HGB in die hPNF integriert wurde und (ii) dass HSA der Hauptbestandteil der selbstassemblierten hPNF ist. Allerdings kann eine höhere Konzentration von HGB im Kern der hPNF nicht ausgeschlossen werden. Um zusätzlich zu zeigen, dass die Existenz der Porphyrinbänder mit dem Vorhandensein von HGB korreliert, wurden selbstassemblierte HSA-Fasern unter identischen Bedingungen wie die HSA-HGB-PNF hergestellt und mittels TERS charakterisiert (Abbildung 6.8). In diesen Spektren wurden keine charakteristischen Porphyrinbanden gleichzeitig beobachtet, da im HSA-Molekül auch keine Häm-Gruppen vorhanden sind. Vergleicht man weiterhin die zur Aufnahme der TERS-Spektren benötigte Leistung, dann fällt auf, dass für reine HSA-PNF die doppelte Leistung benötigt wurde als für HSA-HGB-hPNF (Abbildung A 2 und Abbildung 6.8). Dieser Fakt kann ebenfalls durch die Abwesenheit des HGB und somit durch die Abwesenheit des photoverstärkenden Effektes der Häm-Gruppe erklärt werden.

Ein interessantes Merkmal der von HGB-bezogenen TERS-Spektren ist das Auftreten von Eisen- und Eisenoxidationsbanden bei 1378 bzw. 1355  $\text{cm}^{-1}$ . Eine ähnliche Beobachtung wurde von Wood *et al.* und Böhme *et al.* berichtet und als ständiger Austausch von Sauerstoffmolekülen mit den HGB-Molekülen oder als mögliche Oxidation

der Häm-Spezies in der Nähe der Silberspitze erklärt.<sup>177,184</sup> Die Autoren zeigten auch, dass die Existenz beider Oxidationsbanden mit konventioneller Raman-Spektroskopie nicht nachgewiesen werden konnte, was die Sensitivität des TERS-Ansatzes gegenüber biologischen/oxidativen Prozessen im Nanomaßstab unterstreicht. Unter der Annahme der Erklärung Sauerstoffaustausch kann spekuliert werden, dass die biologische Funktion des HGB wie z.B. die Energieübertragung durch den Selbstassemblierungsprozess nicht verändert wird. Diese Annahme wird durch Ravichandran *et al.* gestützt, welche die

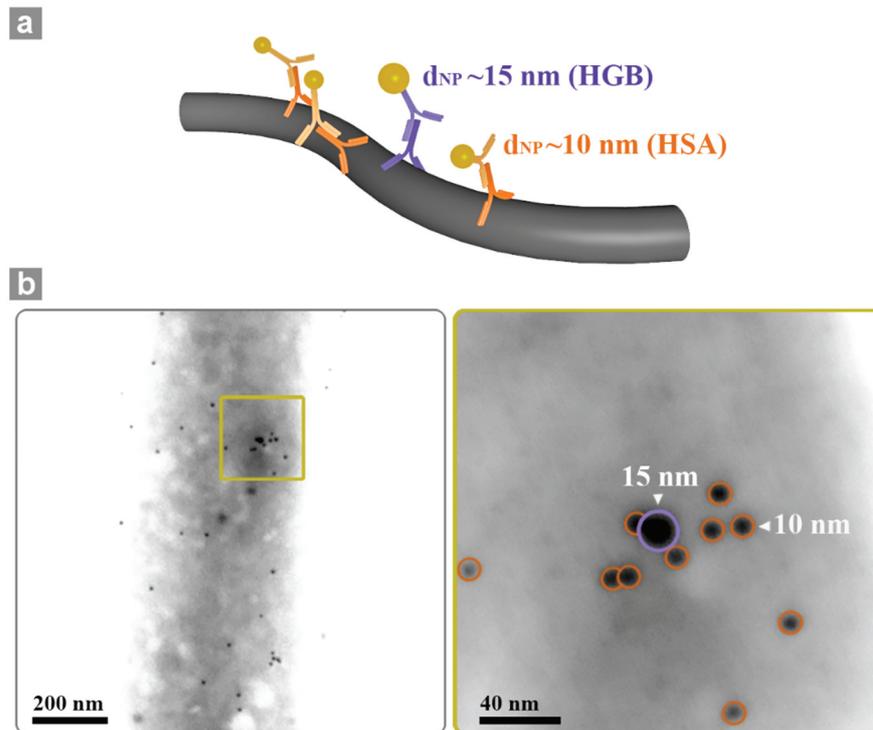


**Abbildung 6.8:** TERS an HSA hPNF: TERS-Spektren, die entlang der markierten roten Linie im AFM-Höhenbild einer HSA-PNF von Position 150 bis 199 (Schrittweite: 3,5 nm,  $\lambda = 532$  nm,  $P = 720$   $\mu$ W,  $t_{acq} = 1$  s) gesammelt wurden. In den dargestellten Spektren sind entsprechende Markerbanden für Porphyrin (660  $\text{cm}^{-1}$ , 749  $\text{cm}^{-1}$ , 1128  $\text{cm}^{-1}$ , 1312  $\text{cm}^{-1}$ , 1545  $\text{cm}^{-1}$ ) blau und für  $\text{Fe}^{2+}$  (1355  $\text{cm}^{-1}$ ) und  $\text{Fe}^{3+}$  (1378  $\text{cm}^{-1}$ ) rot markiert. (HSA-PNF wurden wie von Juárez *et al.*<sup>33</sup> beschrieben hergestellt) Das Fehlen solcher Banden zeigt den Unterschied zwischen HGB und HSA.

Fähigkeit von HGB Sauerstoff zu binden in einer elektrogenesponnenen Gerüststruktur aus HGB, HPF und Gelatine zeigten.<sup>115</sup>

#### **6.2.4. Immunogold-Markierung**

Um die TERS-Ergebnisse zu verifizieren und zu untersuchen, ob die Anwesenheit beider Proteine in den selbstassemblierten hPNF visualisiert werden kann, wurde eine immunmarkierungsbasierte Methode verwendet. Eine ähnliche Methode wurde benutzt, um die Zusammensetzung von extrudierten Fasern aus einer Kollagen und Fibrinogen Mischung zu untersuchen.<sup>19</sup> In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch anstelle von Fluoreszenzmarkern sekundäre Antikörperkonjugate eingesetzt, welche mit AuNP unterschiedlichen Durchmessers funktionalisiert waren (Abbildung 6.9). Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass einzelne Proteinmoleküle auf der PNF-Oberfläche mit STEM identifiziert werden können. Dementsprechend wurden Antikörperkonjugate mit AuNP von 15/10 nm verwendet, um HGB/HSA zu identifizieren. Abbildung 6.9b zeigt repräsentative STEM-Bilder von Immunogold-markierten PNF, auf denen unterschiedlich große AuNP lokalisiert werden konnten. Eine NP-Aggregation wurde nicht beobachtet. Die nur partielle Bedeckung der hPNF mit AuNP hängt mit der allgemein niedrigen Markierungseffizienz zusammen, die bei etwa 10-15 % liegt.<sup>185</sup> Dennoch wird die Immunogold-Markierung für die Quantifizierung in der Regel als ausreichend angesehen.<sup>186</sup> Wie exemplarisch in der vergrößerten Darstellung in Abbildung 6.9b gezeigt, weist die Mehrheit der AuNP einen Durchmesser von unter 12 nm auf und bestätigt somit die Anwesenheit von HSA (orange markiert). Darüber hinaus sind die AuNP, welche größer als 13 nm sind, violett markiert und bestätigen die Anwesenheit von HGB. Im Allgemeinen hatte die Mehrheit (90 %) der analysierten AuNP (n = 281 in 16 Regionen von 5 verschiedenen Fasern) einen Durchmesser < 12 nm, was deutlich zeigt, dass die PNF überwiegend aus HSA bestehen. Im Gegensatz dazu hatten nur 7 % der AuNP einen Durchmesser > 13 nm, was HGB entspricht. Die restlichen 3 % der AuNP hatten einen Durchmesser zwischen 12 und 13 nm und konnten keinem der beiden Proteine eindeutig zugeordnet werden. In Analogie zu den TERS-Messungen ist die Immunmarkierung eine oberflächensensitive Methode, die keine Informationen über den Kern der PNF liefert. Dennoch ergänzt sie die oben diskutierten TERS-Ergebnisse und impliziert stark, dass sich das duale Proteinsystem selbst zu hPNF assemblieren kann.



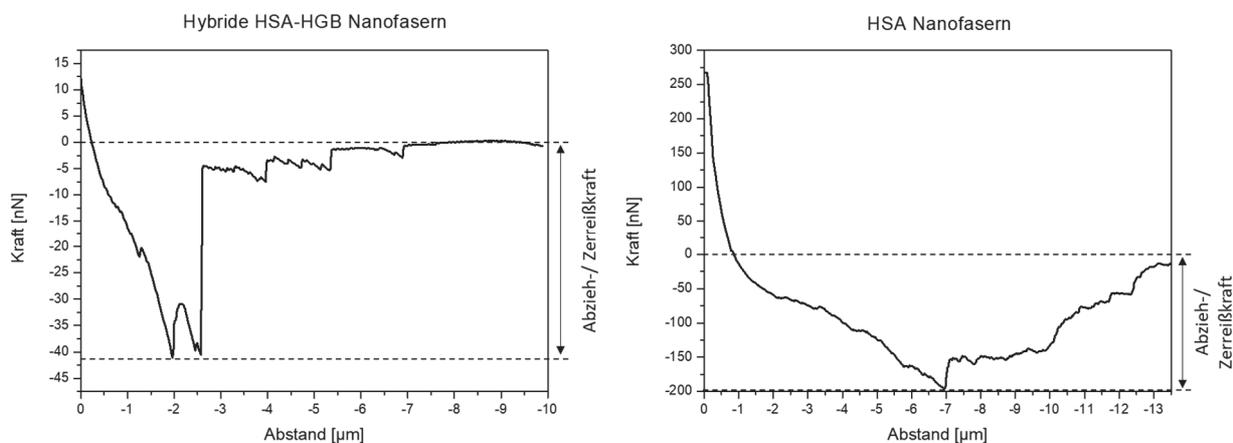
**Abbildung 6.9:** Immunogold-Markierung von HSA-HGB-hPNF: (a) Schematische Darstellung der hPNF-Immunogold-Markierung. (b) Repräsentatives STEM-Bild von hPNF, welche mittels AuNP-konjugierten Antikörpern immunmarkiert sind. Partikel mit einem Durchmesser  $< 12 \text{ nm}$  werden HSA zugeordnet und sind orange markiert, während Nanopartikel mit einem Durchmesser  $> 13 \text{ nm}$  werden HGB zugeordnet und sind violett markiert.

Um zu erfahren, ob es möglich ist, den Anteil des HGBs in den hPNF zu verbessern, wurde die Selbstassemblierung von HSA und HGB im 1:2-Verhältnis durchgeführt. Hier verhinderte eine erhöhte Konzentration an HGB die PNF-Bildung und führte zu kugelartigen Strukturen. Ein analoges Verhalten wurde von Pandey *et al.* beschrieben, die die Hemmung von HSA-Fibrillation in Gegenwart von natürlich vorkommenden Zuckern wie Fructose zeigten, welche aber eine höhere Konzentration hatten.<sup>166</sup>

### 6.2.5. Kraftspektroskopie – Mechanische Eigenschaften von heterogenen Proteinfasern

Eine indirekte Möglichkeit, Informationen über den HGB-Anteil im Faservolumen zu erhalten, besteht darin, die mechanische Integrität von hPNF zu beurteilen. Basierend auf den nanoskopischen Dimensionen der Fasern wurden mit Hilfe der AFM-Kraftspektroskopie (Abbildung 6.10) Kraft-Abstands-Kurven aufgenommen. Die dabei verwendeten AFM-Spitzen waren kovalent mit PNF funktionalisiert. Die Daten aus den

Kraft-Abstands-Kurven lassen sich auf zwei Arten interpretieren: (i) als eine Kraft, die notwendig ist, um die Faser(n) von der Oberfläche abziehen, oder (ii) eine Kraft, die erforderlich ist, um die Faser(n) zu zerreißen. Auffällig ist, dass beide PNF-Typen, trotz ähnlicher Proteinkonzentration, Selbstassemblierungszeit und -bedingungen sowie Messbedingungen, ein unterschiedliches Verhalten zeigen. Der direkte Vergleich von reinen HSA-Fasern und hPNF zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) in der gemessenen Kraft von  $158,4 \pm 46,1$  nN ( $n = 41$ ) bzw.  $38,79 \pm 9,67$  nN ( $n = 47$ ). Darüber hinaus ist sichtbar, dass die benötigte Rückzugslänge, um die (h)PNF von der modifizierten Siliziumoberfläche zu ziehen oder die (h)PNF zu zerreißen, auch bei HSA-PNF ( $> 13,5 \mu\text{m}$ ) höher ist als bei den hPNF ( $6,9 \mu\text{m}$ ). Betrachtet man die gemessene Kraft als Abziehungskraft, so kann der Unterschied durch das Vorhandensein von HGB-Molekülen auf der Oberfläche von hPNF erklärt werden. Hieraus folgen reduzierte Interaktionen zwischen der Faser und der funktionalisierten Oberfläche. Die um ca. 75 % reduzierte Kraft kann jedoch nicht allein durch die 5 % des oberflächennahen HGBs (basierend auf TERS- und Immunmarkierungsdaten) erklärt werden. Stattdessen unterstützt dies die Hypothese, dass der Unterschied wahrscheinlich auf das Vorhandensein von HGB innerhalb der hPNF zurückzuführen ist. Dies stört die mechanischen Eigenschaften und erleichtert somit das Zerreißen der hPNF. Obwohl diese Methode eine Unterscheidung zwischen den gemessenen Krafttypen (Abzieh-/Zerreißkraft) nicht zulässt, unterstützen die Beobachtungen stark den hybriden Charakter der selbstassemblierten PNF.

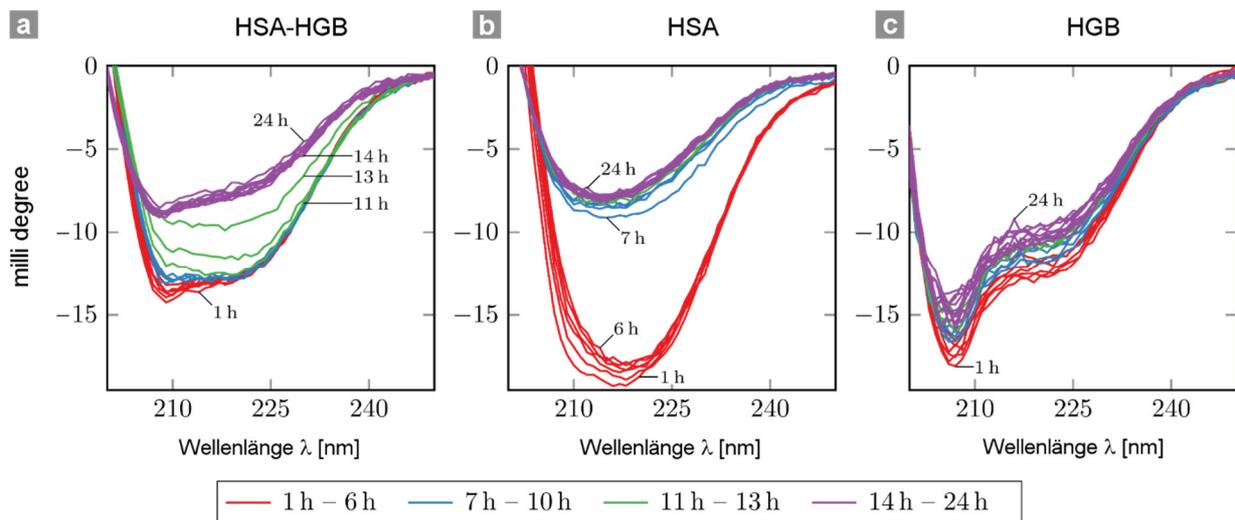


**Abbildung 6.10:** Kraft-Abstandskurven von HSA- und HSA-HGB-hPNF: AFM-Kraft-Abstands-Kurven für den Rückzug der modifizierten AFM-Spitzen mit HSA-HGB- (links) und HSA- (rechts) PNF von modifiziertem Siliziumsubstrat. Die Abzieh-/Zerreißkräfte sind in beiden Diagrammen markiert.

## 6.2.6. Assemblierungskinetik und Modellbildung

Die niedrige Konzentration von detektiertem HBG in den neuen hPNF kann als Folge (i) der strukturellen Unterschiede der verwendeten Proteine und/oder (ii) der unterschiedlichen Bildungskinetiken erklärt werden. Es ist bekannt, dass die Selbstassemblierung von Proteinen zu einer Nanofaserstruktur durch eine proteinspezifische Änderung der Konformation induziert wird, die durch Veränderungen der Umgebungsbedingungen verursacht wird. Die Änderung der Konformation beeinflusst ebenfalls die Formationskinetik der resultierenden Strukturen.<sup>37, 104-105, 187-188</sup> Daher wurde die Kinetik der Proteinkonformationsänderung untersucht, um den hPNF-Formationsmechanismus zu verstehen. Wie bereits in Abschnitt 6.2.2 beschrieben, eignet sich die CD-Spektroskopie zur Untersuchung von Strukturänderungen. Darüber hinaus können mit dieser Methode auch die PNF-Bildung/Proteinaggregation und die damit verbundenen Strukturänderungen *in situ* betrachtet werden.<sup>168</sup>

Um einen Einblick in die Bildungskinetik der hPNF zu bekommen, wurden stündliche CD-Messungen der HSA-HGB-Lösung und beider Einzelproteine über einen Zeitraum von 24 Stunden unter Assemblierungsbedingungen durchgeführt. Die minimalen CD-Signalverschiebungen während der ersten Stunden der HSA-HGB-Faserbildung (1-10 Stunden, rote und blaue Linien in Abbildung 6.11a) können den ersten Schritten der PNF-Bildung, d.h. der Nukleierungsphase bzw. der sogenannten „Lag-Phase“ (siehe Abschnitt 3.2), zugeordnet werden. In diesem Schritt führt die Änderung der Sekundärstruktur zu einer Aktivierung der HSA- und HGB-Moleküle und induziert dadurch die spätere hPNF-Bildung. Dieser Keimbildungsprozess ermöglicht die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen, welche den zweiten PNF-Bildungsschritt einleiten: die Selbstassemblierung zu ersten Agglomeraten und die Bildung von Protofibrillen. Schritt drei ist gekennzeichnet durch den starken Rückgang des Signals beginnend nach 10 Stunden, welcher der Bildung größerer Strukturen entspricht, die für weitere 3 Stunden weiter wachsen (11-13 Stunden, grüne Linien Abbildung 6.11a).<sup>55</sup> Bei längerer Selbstassemblierungszeit sinkt das Signal langsam weiter und erreicht nach 24 Stunden ein Plateau. Dieses entspricht dem Elongationsprozess der zuvor gebildeten Protofibrillen und deren Anordnung zu Bandstrukturen, wie in Abbildung 6.5 dargestellt. Die CD-Messungen zeigen, dass die hPNF-Formation mit einem Keimbildungsprozess beginnt, der zur Bildung von Protofibrillen und anschließend zur Nanofaserbildung führt.



**Abbildung 6.11:** Assemblierungskinetik von HSA-HGB, HSA und HGB: (a-c) 24 h CD-Messungen von jeweils  $2\mu\text{M}$  HSA-HGB, HSA und HGB unter Faserbildungsbedingungen (50 Vol.% Ethanol bei  $65^\circ\text{C}$ ).

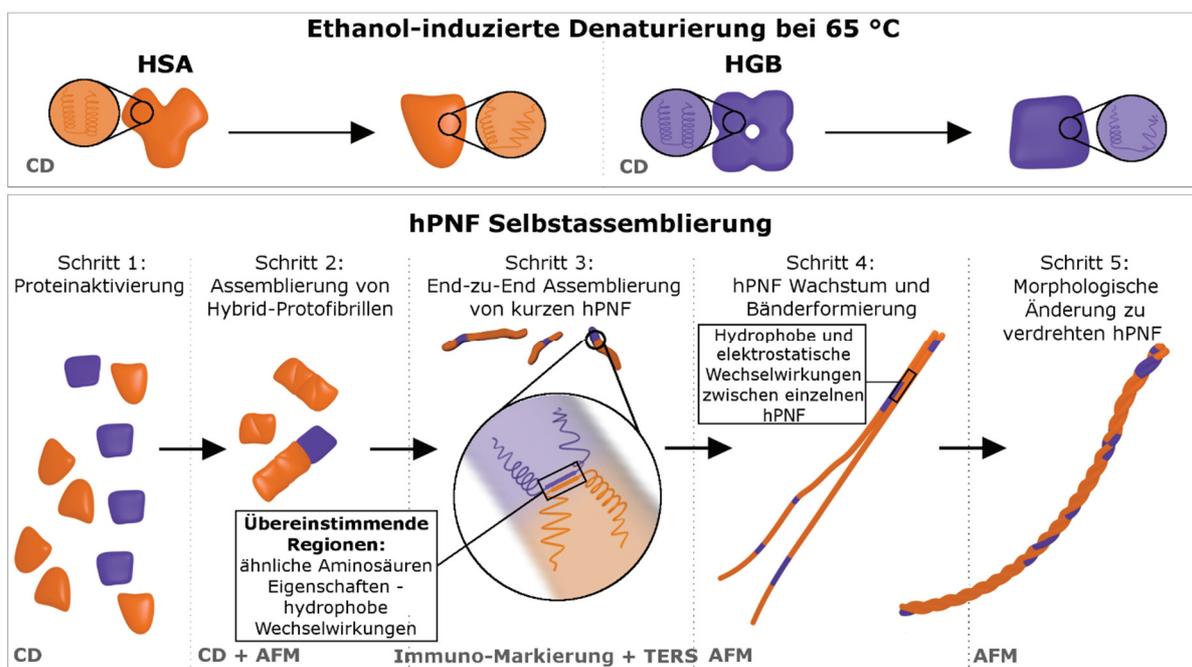
Dies entspricht dem PNF-Bildungsmechanismus für Amyloid-PNF wie er in der Literatur beschrieben ist.<sup>37</sup>

Im Vergleich zu den stündlichen CD-Scans von HSA-HGB zeigen die 24-Stunden-HSA-Spektren ein ähnliches Verhalten (Abbildung 6.11b). Der starke Abfall des Signals nach 6 Stunden und eine schnell erreichte Plateau-Stufe deuten jedoch auf eine schnellere Selbstassemblierungskinetik im Vergleich zum HSA-HGB-System hin. Ähnliche Änderungen des CD-Signals wurden in der Literatur für die Selbstassemblierung von HSA beschrieben.<sup>168</sup> HGB hingegen zeigt eine sehr konstante und langsame Signalabnahme über den gesamten Zeitbereich und damit keine Faserbildung (Abbildung 6.11c). Die beobachtete reduzierte Assemblierungskinetik für HSA-HGB-Fasern im Vergleich zu reinen HSA-Fasern steht im Widerspruch zu bisherigen Beobachtungen von Dubey *et al.* für die Koassemblierung verschiedener Proteine.<sup>96</sup> In diesen wurde immer von einer Beschleunigung der Assemblierung berichtet. Dies kann durch die Natur der verschiedenen Experimente erklärt werden. Während bei Dubey *et al.* die Koassemblierung zwischen Proteinen untersucht wurde, welche unter den gewählten Bedingungen auch allein zu Proteinfasern aggregieren, ist dies im ausgewählten System nicht der Fall.<sup>96</sup> Wie in den 24h CD-Spektren ersichtlich findet für HGB nur eine geringe Assemblierung statt. Somit ist davon auszugehen dass HGB die Assemblierung von HSA hindert und nicht beschleunigt. Diese Diskrepanz in der Selbstassemblierungskinetik einzelner Proteine sowie eine reduzierte Kinetik von HSA-HGB (im Vergleich zu reinem HSA) deuten auf Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und ihrer Selbstassemblierung zu heterogen Fasern hin. Wichtiger ist, dass die beobachteten

Unterschiede in der Protein-Selbstassemblierungskinetik eine Erklärung für den niedrigen Gehalt an HGB in den hPNF sein können.

Basierend auf den oben diskutierten Ergebnissen wird der folgende Selbstassemblierungsmechanismus für die neuen HSA-HGB hPNF vorgeschlagen:

In dem in Abbildung 6.12 schematisch dargestellten Modell wird davon ausgegangen, dass die denaturierungsinduzierte Aktivierung von Proteinmolekülen für die Nukleation erforderlich ist (Abbildung 6.12 Schritt 1). Diese aktivierten Proteine interagieren und bilden Protofibrillen, wobei Protofibrillen aufgrund der schnellen Protein-Selbstassemblierungskinetik hauptsächlich aus HSA-Molekülen bestehen. Die Bildung homogener HSA-Protofibrillen führt in der Folge zu einer Abnahme von aktivierten HSA-Molekülen in der Umgebung der Protofibrillen, was die Möglichkeit erhöht, dass HGB in die Protofibrillen integriert wird. Sinnvolle Wechselwirkungen zwischen HSA- und HGB-Molekülen lassen sich auf verschiedene Art und Weise erklären. Einerseits durch mögliche Wechselwirkungen zwischen dem HSA und der Häm-Gruppe des HGB, da HSA dafür bekannt ist, als Transportprotein Häm zu transportieren. Hier liegt die Annahme nahe, dass die natürlichen Wechselwirkungen auftreten.<sup>52</sup> Andererseits können die Wechselwirkungen zwischen HSA und HGB in den Protofibrillen auch durch das Vorhandensein von verschiedenen Bereichen in der Primärstruktur beider Proteine



**Abbildung 6.12:** Der Bildungsmechanismus von HSA-HGB-hPNF besteht aus fünf Schritten, wobei jeder Schritt durch die Daten aus mindestens einer experimentellen Methode unterstützt wird.

mit ähnlichen Aminosäuresequenzen oder -eigenschaften erklärt werden. Diese erleichtern die Interaktionen von HSA und HGB durch elektrostatische und/oder hydrophobe Wechselwirkungen. Vermutlich verursacht die vom Ethanol induzierte Denaturierung die Exposition dieser Regionen.

Mit dem Uniprot Alignment Tool wurden die Aminosäuresequenzen von HSA und der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domänen von HGB, welche jeweils doppelt in einem HGB-Molekül vorkommen, verglichen (Abbildung A 3; gleiche Regionen werden mit einem "\*" markiert, sehr ähnliche Regionen mit einem ":" und nur ähnliche Regionen mit einem "."). Der Vergleich von HSA- und HGB- $\alpha$ -Domänen zeigt, dass beide Proteine ähnliche Bereiche aufweisen (markiert mit einem roten Rechteck in Abbildung A 3), insbesondere im mittleren Teil bei den Aminosäuren 31-119 von  $\alpha$ -HGB und 241-325 von HSA. Ähnliche Regionen wurden auch für die Sequenzen 7-91 des  $\beta$ -HGB und 25-114 des HSA gefunden. Es ist möglich, dass diese Regionen für die Wechselwirkungen zwischen beiden Proteinen während der Faserbildung verantwortlich sind.

Obwohl die Verifizierung der genauen Aminosäuresequenzen, die in den Proteinen für die Selbstassemblierung verantwortlich sind, und somit die Art der Wechselwirkungen nicht möglich ist, kann von hydrophoben Wechselwirkungen ausgegangen werden. Diese Annahme wird durch die Arbeit von Ridgley *et al.* gestützt, die zeigte, dass hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Proteinen mit einem hohen Anteil an  $\alpha$ -helikalen Strukturen, wie HGB, und einem Templatepeptid für ihre Selbstassemblierung zu Amyloidfasern unerlässlich sind.<sup>122</sup> Diese Annahme wird durch die genaue Analyse der Menge an hydrophoben, polaren und geladenen Aminosäureresten in den einzelnen Proteinen, die in Tabelle 6.2 dargestellt ist, bekräftigt. Die Proteine HSA und HGB bestehen hauptsächlich aus Aminosäuren mit hydrophoben Resten (42 % bzw. 54 %) (Abbildung A 3, violett markierte Aminosäuren). Der niedrigere Gehalt an polaren (HSA: 27 %, HGB: 27 %) und geladenen (HSA: 31 %, HGB: 19 %) Aminosäureresten zeigt die vernachlässigbare Rolle von Wasserstoffbrücken und elektrostatischen Wechselwirkungen bei der Faserbildung. Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass die Protofibrillen aus durchgehend verbundenen Molekülen gebildet werden. Diese Annahme basiert auf der Breite der Protofibrillen, welche ähnlich den Abmessungen eines nativen HSA-Moleküls (~ 14 nm) sind.<sup>189</sup> Diese Aussage wird durch die Unterschiede in den Messungen der Kraftspektroskopie gestützt. Mit zunehmender Selbstassemblierungszeit wachsen die Protofibrillen zu längeren hPNF,

gefolgt von ihrer Assemblierung zu Bandstrukturen und schließlich zu heterogenen verdrehten Nanofasern (siehe Abbildung 6.5 und Abbildung 6.12).

**Tabelle 6.2:** Anteil an hydrophoben, polaren und geladenen Aminosäureresten in HSA und HGB

	Hydrophobe Aminosäuren	Polare Aminosäuren	Geladene Aminosäuren
HSA	42 %	27 %	31 %
HGB	54 %	27 %	19 %

### 6.2.7. Kapitelzusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig die Erzeugung selbstassemblierter hPNF bestehend aus zwei Plasmaproteinen mittels Ethanol- und Temperatur-induzierter Strukturänderung. Die Konformationsänderungen führen sowohl bei HSA als auch bei HGB zur Exposition von ähnlichen Aminosäuresequenzen. Diese in Verbindung mit den hydrophoben Wechselwirkungen der Proteine werden als treibende Kraft für den Selbstassemblierungsmechanismus der neuen HSA-HGB-hPNF vermutet. Es konnte mittels eines neuen Ansatzes gezeigt werden, dass nanospektroskopische Techniken wie TERS und Kraftspektroskopie die heterogene Natur der hPNF direkt auf der Nanoebene nachweisen können.

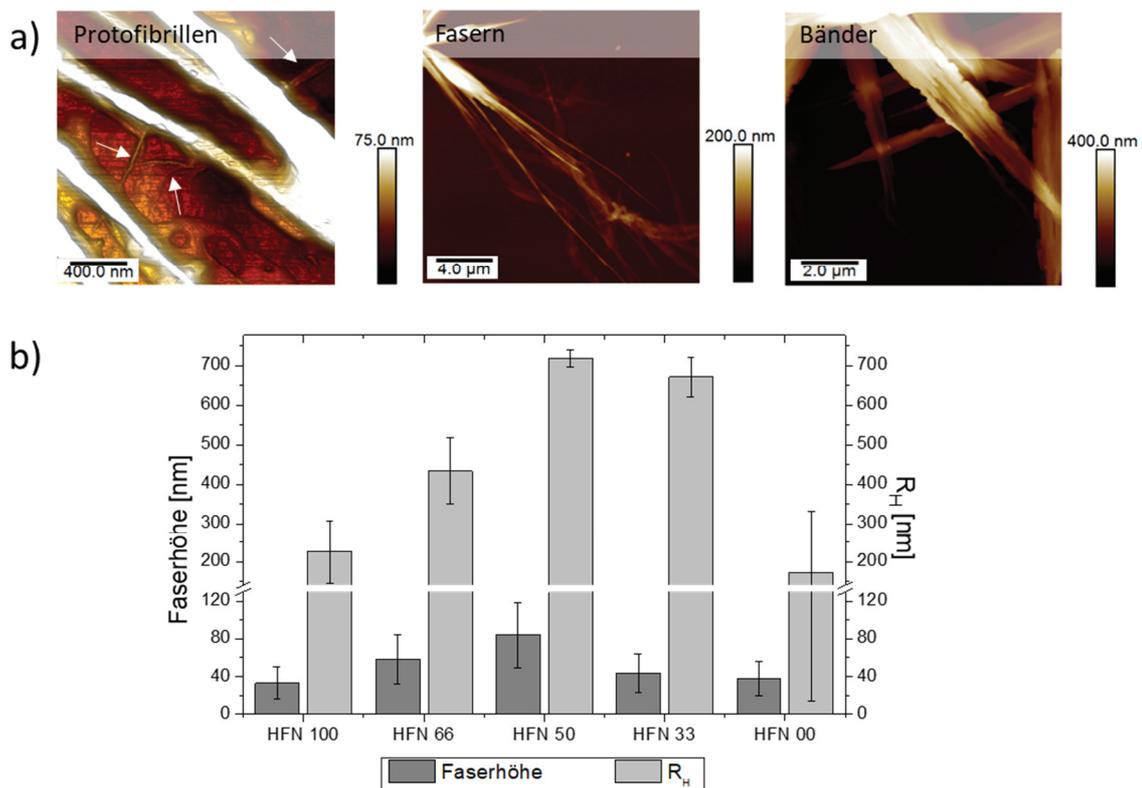
Unter der Voraussetzung, dass bei Konformationsänderungen in Proteinen die gleichen Aminosäuresequenzen gefunden werden, bietet das hier beschriebene Modell der Selbstassemblierung das Potenzial zur Anwendung auf weitere Kombinationen aus Plasmaprotein an. So wird beispielsweise erwartet, dass das HPF- und HFN-System aufgrund der Ähnlichkeit in der Primärstruktur und der Existenz von Bindungsstellen für Fibrin in HFN hPNF bildet. Die hier beschriebenen neuen hPNF haben das Potential als universeller Bausteine für neue Proteinbasierte Materialien mit einstellbaren Eigenschaften zu fungieren.

### **6.3. Homogene und heterogene Proteinfasern aus Fibronectin und Fibrinogen**

In diesem Kapitel soll einerseits die Hypothese, die sich aus den Ergebnissen von Kapitel 6.2 ergeben hat, getestet werden, dass HPF und HFN neue selbstassemblierte hPNF durch Ethanol-induzierte Strukturänderungen bilden. Des Weiteren soll erstmalig für selbstassemblierte hPNF gezeigt werden, dass die Mischungsverhältnisse der Proteine die PNF-Charakteristika und -Eigenschaften beeinflussen. Dazu wurden die selbstassemblierten Strukturen verschiedener Proteinverhältnisse nach 4 Stunden Assemblierungszeit mit Hilfe des AFM charakterisiert. Im folgenden Schritt wurde die Abhängigkeit der PNF bezüglich Struktur, Zeta-Potential und Stabilität vom Ausgangsverhältnis untersucht. Der heterogene Charakter wurde mittels Immunogold-Markierung untersucht und basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen ein Modell vorgeschlagen.

#### **6.3.1. Charakterisierung der selbstassemblierten PNF**

Basierend auf bestehender Literatur wurde angenommen, dass HFN und HPF sich selbst zu hPNF assemblieren können. Um diese Hypothese zu testen, wurden HFN- und HPF-Gemische mit unterschiedlichen Molverhältnissen (Tabelle 5.1) hergestellt und die Selbstassemblierung durch ein Ethanol-Wassergemisch im Verhältnis 4:1 (v/v) bei 37 °C für 4 Stunden induziert. Die assemblierten hPNF wurden auf PS-Substraten mittels Auftropfens abgeschieden und mit AFM im trockenen Zustand untersucht (Abbildung A 4). Abbildung 6.13 zeigt repräsentative AFM-Höhenbilder der PNF welche für alle HFN-HPF-Mischungen sichtbar waren. Dabei traten keine sichtbaren morphologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Molverhältnissen von HPF zu HFN auf. Wie in Abbildung 6.13a zu sehen ist, sind neben den Fasern noch kleinere Protofibrillen vorhanden (links vergrößertes Bild, markiert mit weißen Pfeilen). Diese Protofibrillen messen nur einige nm in der Höhe und könnten Reste des Faserbildungsmechanismus sein, wie er in Abschnitt 6.2.5 für HSA und HGB beschrieben wurde. Hier lagerten sich zuerst Protofibrillen zu kleinen Fasern zusammen, welche weiter seitlich interagieren konnten. Dadurch bildeten sich die Bandstrukturen aus. Die seitlichen Interaktionen beruhen meist auf hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen

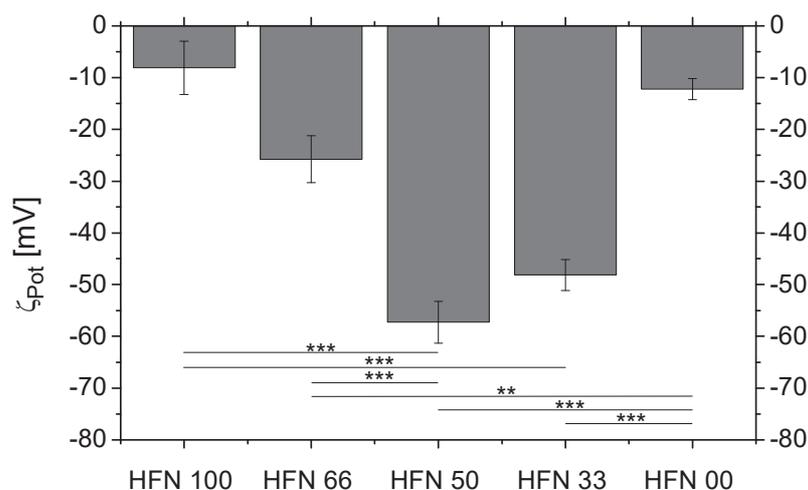


**Abbildung 6.13:** Höhe und  $R_H$  von HFN-HPF-hPNF: a) AFM-Höhenbilder von Strukturen welche nach der Assemblierung bei allen Proben beobachtet wurden: Protofibrillen markiert mit weißen Pfeilen (links), einzelne Fasern (Mitte) und Bänder bestehend aus einzelnen Fasern (rechts). b) Faserhöhe (Primärachse) und Mittlerer  $R_H$  (Sekundärachse) nach 4 Stunden Inkubation in 80 Vol.% Ethanol bei 37°C.

einzelnen PNF.<sup>33, 168</sup> Diese Bandstrukturen sind im rechten Bild von Abbildung 6.13a dargestellt. Allerdings wurde darauf basierend die Faserbreite nicht gemessen, da eine seitliche Aggregation der Fasern eine Unterscheidung zwischen den Fasern teilweise unmöglich machte. Stattdessen wurden die Faserhöhen bestimmt, welche in etwa der Faserdicke entsprechen, wenn von einer runden Querschnittsfläche einzelner Fasern ausgegangen wird. Die resultierenden durchschnittlichen Faserhöhen der PNF in Abhängigkeit des HFN-HPF-Verhältnisses sind in Abbildung 6.13b dargestellt. Auffällig ist, dass die Zugabe des zweiten Proteins, unabhängig der Reihenfolge, zu einer Zunahme der Faserhöhe führte. Homogene PNF aus nur einem Protein zeigten die niedrigsten Höhen mit 33 nm ± 17 nm für reine HFN (HFN 100) und 38 nm ± 18 nm für reine HPF (HFN 00). Nach Zugabe des zweiten Proteins stiegen die Faserhöhen jeweils auf 44 nm ± 20 nm mit einem Anteil von 33 % HFN (HFN 33) und auf 58 nm ± 26 nm für einen Anteil von 66 % HFN (HFN 66). Die größten Höhen zeigten die Fasern mit 50 % HFN (HFN 50) mit 84 nm ± 35 nm. Hervorzuheben ist außerdem, dass die Fasern mehrere  $\mu\text{m}$  lang und Beginn und Ende der Fasern oft nicht zu unterscheiden waren. Daher wurden die Längen nicht berücksichtigt.

DLS-Messungen wurden durchgeführt, um das Verhalten der Proteinfasern in der Dispersion zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.13b dargestellt. Im Vergleich zum AFM erlaubt DLS, einen Durchschnittswert der gesamten Probe zu erhalten. Hier muss beachtet werden, dass DLS normalerweise verwendet wird, um die Größe von nahezu runden Partikeln zu bestimmen. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich die Fasern in ihrer Dispersion ähnlich wie Polymere in Lösung verhalten. Daher können die DLS-Ergebnisse den durchschnittlichen  $R_H$  der Fasern entsprechen. Interessanterweise folgte die Größenverteilung erneut einem ähnlichen Trend wie die Höhenverteilung. Die Fasern mit der maximalen Menge an Sekundärprotein, HFN 50, hatten auch den höchsten  $R_H$  mit  $719 \text{ nm} \pm 21 \text{ nm}$ , während die reinen PNF den niedrigsten  $R_H$  mit  $226 \text{ nm} \pm 82 \text{ nm}$  (HFN 100) bzw.  $173 \text{ nm} \pm 158 \text{ nm}$  (HFN 00) aufwiesen. Dies kann durch die Dicke der Fasern erklärt werden, da dickere und damit steifere Fasern weniger anfällig für eine Knäulbildung sind als dünnere Fasern. Außerdem können Bereiche der Oberfläche mit gleicher Oberflächenladung als abstoßende Kräfte der Knäulbildung entgegenwirken. Dies zeigt, dass DLS geeignet ist, um qualitative Ergebnisse bezüglich der Faserdimension in Abhängigkeit vom HFN-HPF-Verhältnis zu erhalten. Weiterhin ist bekannt, dass diese Technik verwendet wird, um dynamische Prozesse innerhalb von Lösungen zu untersuchen. So zeigten Streets *et al.*, dass sich DLS zur Untersuchung der amyloiden Fibrillenbildung eignet.<sup>190</sup>

Wie oben beschrieben, könnten unterschiedliche Oberflächenladungen der PNF in der Dispersion ein möglicher Grund für das erhaltene DLS-Ergebnis sein. Um die



**Abbildung 6.14:**  $\zeta_{Pot}$  der PNF in 80 Vol.% Ethanol in Abhängigkeit der Faserzusammensetzung. Die Linien unter den Säulen markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen (\*\*  $p = 0,002$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

Oberflächenladung zu bestimmen, wurden die Zeta-Potenziale ( $\zeta_{\text{Pot}}$ ) der verschiedenen PNF gemessen. Die  $\zeta_{\text{Pot}}$  (Abbildung 6.14) zeigten betragsmäßig einen ähnlichen Trend wie die PNF-Charakteristika. Die homogenen HFN- und HPF-PNF besitzen aufgrund ihrer homogenen Zusammensetzung die höchste negative Oberflächenladung. Die Zugabe des zweiten Proteins führte zu einer Erniedrigung des  $\zeta_{\text{Pot}}$  und zeigte erneut den Extremwert, diesmal ein Minimum, bei einem Proteinverhältnis von 1:1 (HFN 50).

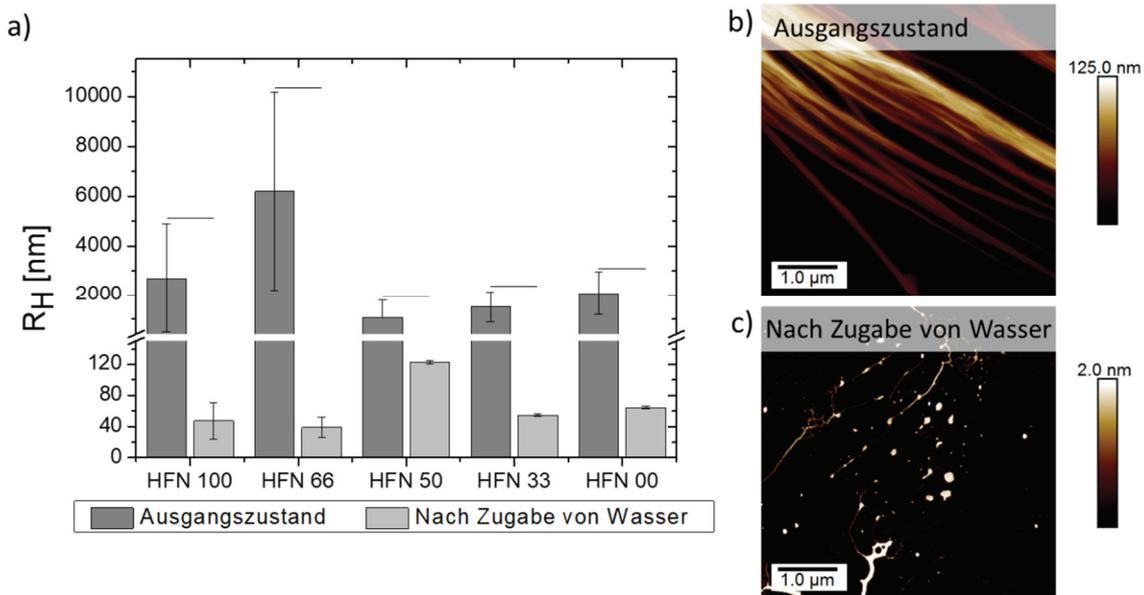
Die PNF-Höhen, die Größenverteilung der  $R_H$  sowie die  $\zeta_{\text{Pot}}$  deuten auf eine Abhängigkeit der Charakteristika der PNF von ihrem Proteinverhältnis hin. hPNF mit einem Proteinverhältnis von 1:1 weisen betragsmäßig höhere Werte auf. Diese Abhängigkeit der PNF-Charakteristika vom Proteinverhältnis ist ein erster Hinweis auf die Wechselwirkung von HFN und HPF während der PNF-Assemblierung und somit der Bildung von PNF mit heterogenem Charakter. Im Allgemeinen spielen für die Selbstassemblierung von amyloiden Proteinfasern hydrophobe Wechselwirkungen eine große Rolle. In diesem Fall könnten aber elektrostatische Wechselwirkungen und die Exposition von Bindungsstellen während des Entfaltungsprozesses für die laterale Aggregation verantwortlich sein.<sup>33, 62-63, 104-105</sup> Vorhandene verdeckte oder blockierte Bindungsstellen können somit die lokale Oberflächenladung der Faser beeinflussen und zu einem verstärkten Wachstum führen. Hierdurch wird die laterale Assemblierung von Protofibrillen während der Faserbildung erleichtert, was zu dickeren und stabileren PNF führt. Diese Annahme wird durch die  $\zeta_{\text{Pot}}$  Messungen gestützt, da die Oberflächenladung der Fasern mit einem Proteinnmischungsverhältnis von 1:1 betragsmäßig am höchsten war. Dies deutet darauf hin, dass die HFN 50 Fasern mehr aktive Gruppen auf ihrer Oberfläche haben, welche somit die Ionenadsorption beeinflussen können.

### **6.3.2. Stabilitätstests der selbstassemblierten PNF aus Fibronectin und Fibrinogen**

Ein wichtiger Faktor für zukünftige Anwendungen dieser PNF und hPNF ist die Stabilität unter anderen Umgebungsbedingungen. Deshalb wurde die Stabilität der neuen hPNF in Wasser und PBS mit und ohne 40 Vol.% Ethanol mittels DLS und AFM untersucht.

### 6.3.2.1. Stabilität in Wasser

Um die Stabilität der neuen hPNF in Wasser zu bestimmen, wurden hPNF-Dispersionen in beheizte Küvetten bei 25 °C gefüllt und anfänglich der  $R_H$  bestimmt. Anschließend wurde das Dispersionsmittel langsam verdunstet. Die Küvetten wurden daraufhin erneut bis zum Erreichen des Ausgangsvolumens mit Wasser befüllt und  $R_H$  erneut bestimmt. Interessanterweise zeigten alle hPNF das gleiche Verhalten, unabhängig von ihrer Zusammensetzung. Die DLS-Ergebnisse sowie repräsentative AFM-Bilder der Fasern vor und nach der Wasserbehandlung sind in Abbildung 6.15 dargestellt. Der  $R_H$  sank drastisch nach etwa 100 min von Werten zwischen 2  $\mu\text{m}$ -6  $\mu\text{m}$  auf Werte unter 125 nm, ähnlich der Größe einzelner Proteinmoleküle (Abbildung 6.15a). Es ist zu beachten, dass hierbei die Ethanolkonzentration nicht null war. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Ethanolkonzentration aufgrund der schnellen Verdampfung des Ethanols basierend auf dem niedrigeren Dampfdruck im Vergleich zu Wasser bei etwa 40 Vol.% lag. Um sicherzustellen, dass das beobachtete Verhalten von hPNF in 40 Vol.% Ethanol auch für eine Ethanolkonzentration von 0 Vol.% gilt, wurden die hPNF erneut auf einem PS-Substrat abgeschieden. Die beschichteten und getrockneten Substrate wurden für 5 min in Wasser eingebracht und anschließend mittels AFM charakterisiert (Abbildung 6.15b und c). Nach der Wasserbehandlung waren entweder keine oder nur noch Fragmente der hPNF auf der Substratoberfläche



**Abbildung 6.15:** Stabilität der HFN-HPF-hPNF in Wasser: a)  $R_H$  vor und nach der Zugabe von Wasser; b) repräsentatives AFM-Höhenbild der Fasern vor der Zugabe von Wasser (HFN 33); c) repräsentatives AFM-Höhenbild der Fasern nach der Zugabe von Wasser (HFN 33). Die Linien über den Säulen markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen ( $p < 0,001$ ).

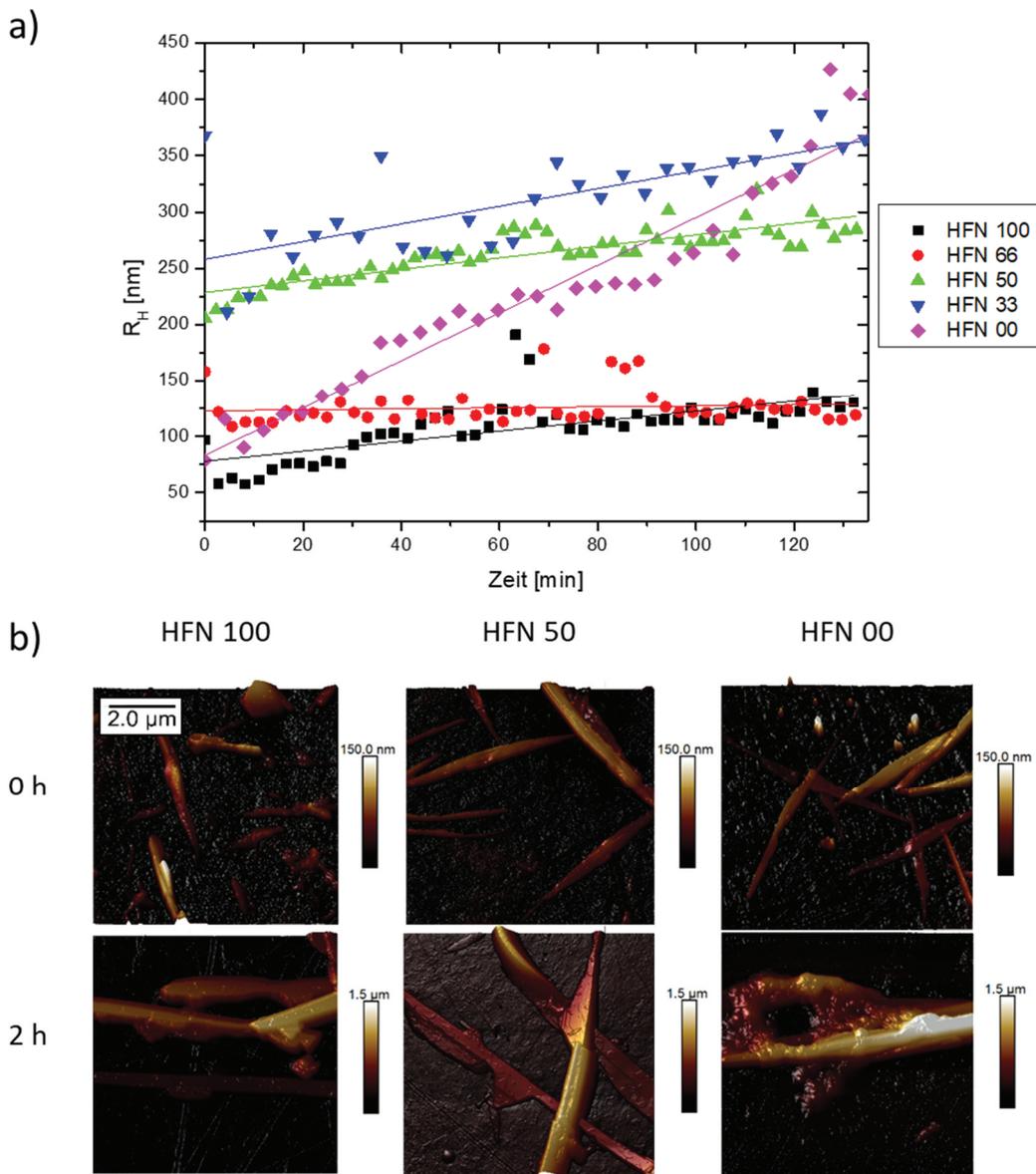
vorhanden. Die verbliebenen hPNF zeigten eine drastische Abnahme der Faserhöhen um bis zu einer Größenordnung. Um ein abspülen der hPNF vom Substrat auszuschließen, wurde der Versuch mit einem Wassertropfen (2µl) wiederholt. Auch nach verdunsten des Wassertropfens waren keine hPNF vorhanden und somit kann ein abspülen der Fasern ausgeschlossen werden.

Die Tatsache, dass sich die Fasern fast sofort in Wasser auflösten, beweist, dass die Faserbildung in diesem Fall reversibel ist. Basierend auf der Literatur zeigt dies, dass die Proteine in den hPNF nicht mittels hydrophober Wechselwirkungen verbunden sind und somit zu Fasern führen, welche eine geringere Stabilität als amyloide Fasern aufweisen.<sup>191-192</sup> Eine ähnliche Instabilität in Wasser wurde von Buttafoco *et al.* bezüglich elektrogessponnener Fasern aus Kollagen und Elastin ohne Vernetzer berichtet.<sup>111</sup> Sie begründeten dies durch die nicht stattfindende natürliche Faserbildung des Kollagens während des Elektrosinnens. Dies erlaubt den Schluss, dass die molekulare Anordnung in den neuen hPNF hauptsächlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen basiert. Dies kann durch die pIs der Proteine erklärt werden, welche für HPF bei 5,5 bis 6,0<sup>104</sup> und für HFN bei 5,6 bis 6,1<sup>193</sup> liegen. Sowohl normales als auch hochreines Wasser haben einen pH-Wert von etwa 7. Kommt Wasser jedoch in Kontakt mit Luft wird Kohlendioxid gelöst und der pH-Wert sinkt auf unter 6, was in etwa den pIs der Proteine entspricht.<sup>194-196</sup> Somit sollten die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen verschwinden und die Fasern zerfallen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtungen von Stapelfeldt *et al.* unterstützt. Sie zeigten, dass HPF-Fasern durch PBS-induzierte Selbstassemblierung bei einem pH-Wert von 7,4 und höher, ohne Zugabe von Thrombin oder anderen Denaturierungsmitteln, hergestellt werden können.<sup>93</sup> Ein Absenken des pH-Wertes auf 5 oder 6 führte zur Inhibierung der Faserbildung. Es kann also zusammengefasst werden, dass die beobachteten Strukturen aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen weniger stabil sind als die in der Literatur berichteten amyloiden Strukturen, welche primär durch hydrophobe Wechselwirkungen interagieren.<sup>191-192</sup>

Auch in diesem Versuch zeigte sich, dass die neuen hPNF mit einem gleichen Anteil HFN und HPF (HFN 50) die stabilsten Fasern bildeten (Abbildung 6.15). Dies deutet auf eine stärkere Wechselwirkung zwischen den Proteinen innerhalb der heterogenen Fasern im Vergleich zu homogenen Fasern hin, was ein weiterer Hinweis auf eine heterogene Faserbildung ist.

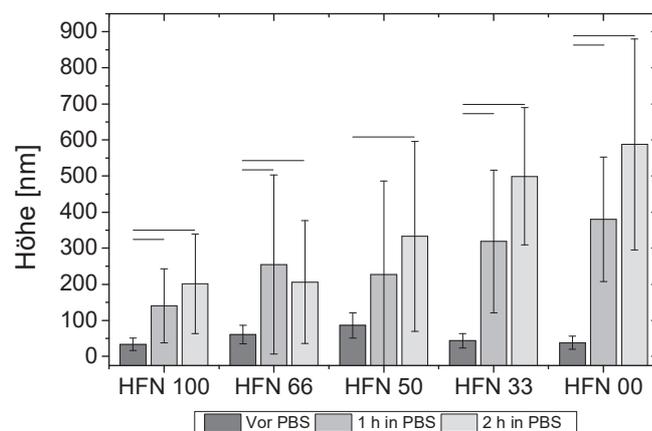
### 6.3.2.2. Stabilität in PBS mit und ohne Ethanol

Da die hier erzeugten Fasern als Grundbausteine für neuartige Biomaterialien dienen können, liegt eine Untersuchung der Stabilität der Fasern in PBS, welches die Ionenkonzentration und den osmotischen Druck des Blutes simuliert, nahe. In einem ersten Versuch wurde die hPNF-Suspension mit PBS im Verhältnis 1:1 gemischt und die zeitabhängige Änderung von  $R_H$  mittels DLS untersucht. Interessanterweise wurden Unterschiede in der Stabilität von hPNF in PBS mit 40 Vol.% Ethanol im Vergleich zu Wasser beobachtet (Abbildung 6.16). Es ist sichtbar, dass sich der  $R_H$  im Laufe der Zeit in



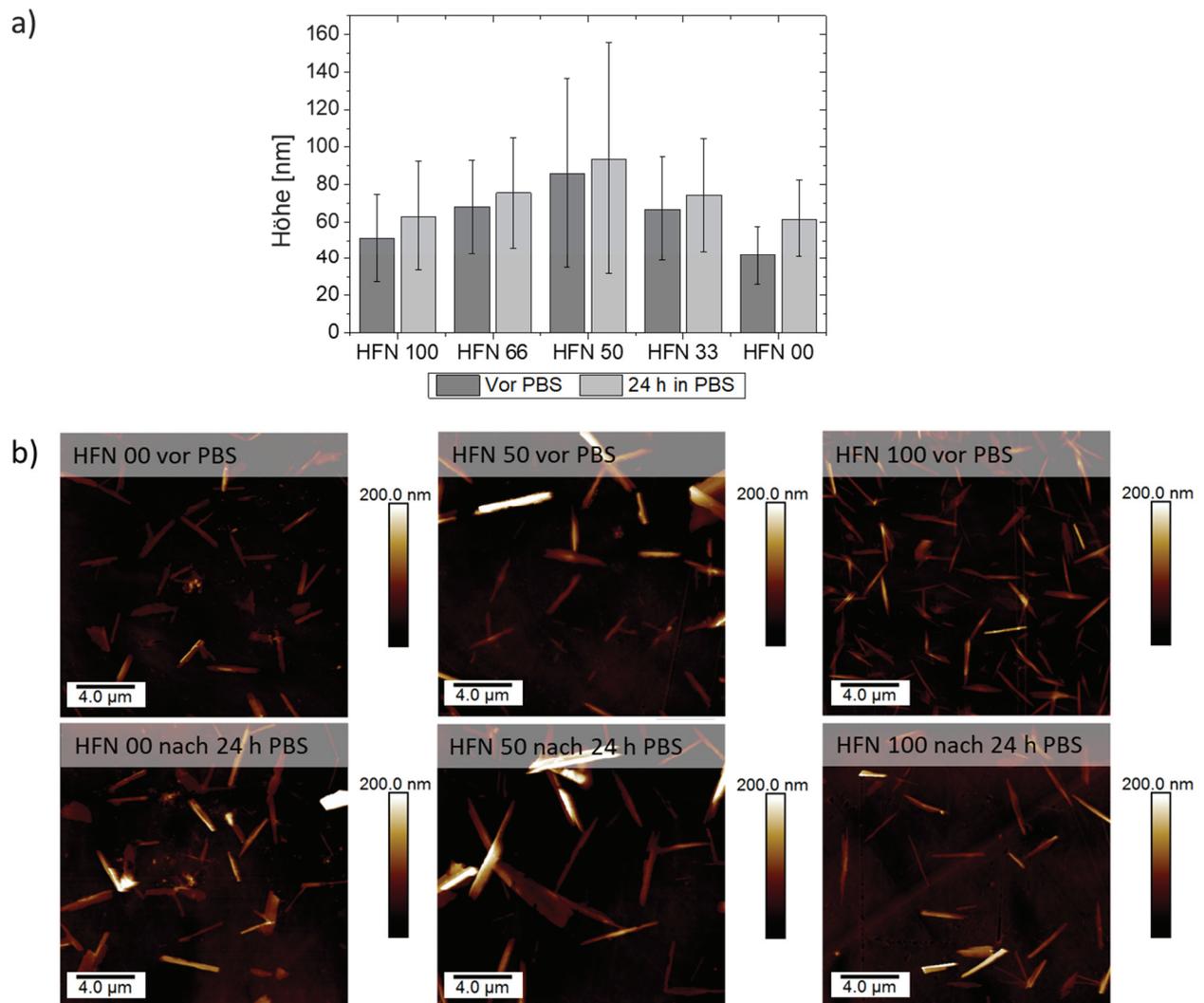
**Abbildung 6.16:** Stabilität von HFN-HPF-hPNF in PBS mit 40 Vol.% Ethanol: a) zeitabhängige Entwicklung von  $R_H$  nach Zugabe von PBS, gemessen über DLS b) Repräsentative AFM-Höhenbilder von HFN 100-, HFN 50- und HFN 00-Fasern im Ausgangszustand sowie 2 h nach Zugabe von PBS.

Abhängigkeit der Zusammensetzung ändert. Reine HFN-Fasern (HFN 100) und Fasern mit hohem HFN-Gehalt (HFN 66) scheinen nahezu stabil zu sein. Diese Annahme basiert auf dem Anstieg der linearen Regression, welche dagegen für HFN 100 nahezu null und für HFN 66 leicht negativ ist. Die negative Steigung kann auf langsame Sedimentationsprozesse zurückgeführt werden. Mit steigender Konzentration an HPF nahm  $R_H$  mit der Zeit zu. Dabei korreliert die Zunahme des Anstiegs der linearen Regression mit der Erhöhung des HPF-Gehalts. Um mehr Informationen über die morphologischen Veränderungen der hPNF in PBS mit 40 Vol.% Ethanol zu erhalten, wurde eine kleine Menge der hPNF-Suspension nach 0 h und 2 h auf ein PS-Substrat getropft und mit dem AFM analysiert. Repräsentative AFM-Bilder der HFN 100, HFN 50 und HFN 00-Fasern sind in Abbildung 6.16b dargestellt. Alle Fasern zeigten eine drastische Zunahme der Faserhöhe im Laufe der ersten Stunde, danach zeigten sowohl die HFN 100 als auch die HFN 66 ein verringertes Wachstum bis Stagnation. (Abbildung 6.17). Im Kontrast dazu zeigten alle HPF-reichen (HFN 50 und HFN 33) und reine HPF-Fasern (HFN 00) eine weiterhin starke Höhenzunahme. Diese Beobachtungen korrelieren mit dem DLS-Trend. In Abbildung 6.16b ist erkennbar, dass Bereiche der HFN 00 hPNF ihre Morphologie teilweise auflösen bzw. verändern, was zu einer Filmabscheidung auf der hPNF-Oberfläche führt. Diese beobachteten Veränderungen in der hPNF-Struktur unterstützen die Schlussfolgerungen, welche sich aus den zeitabhängigen DLS-Messungen ziehen lassen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Veränderung der hPNF-Morphologie das Ergebnis von drei verschiedenen und gleichzeitig wirkenden Mechanismen ist, wenn PBS zu hPNF gegeben wird. Zunächst ist zu berücksichtigen, dass



**Abbildung 6.17:** Durchschnittliche Faserhöhen der HFN-HPF-hPNF vor der Zugabe von PBS zum Assemblierungsmedium 80 Vol.% Ethanol und 1 h bis 2 h nach Zugabe von PBS. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Ergebnisse dar. Die Linien über den Säulen markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen ( $p \leq 0,001$ ).

die Ethanolkonzentration in der Dispersion noch 40 Vol.% betrug und die Zugabe von PBS zu einer Erhöhung der Ionenstärke in der Dispersionslösung führte. Diese beiden Umstände führen zu einer weiteren Konformationsänderung der Proteinstruktur durch partielles Re- oder Entfalten. Diese Konformationsänderung könnte neue Bindungsstellen schaffen, welche zu einer weiteren seitlichen hPNF-Assemblierung führen. Ein weiterer Punkt ist, dass HPF mit positiv geladenen Ionen wechselwirkt.<sup>93, 104</sup> So wurde gezeigt, dass die HPF-Faserbildung in PBS bei einem pH-Wert von 2<sup>104</sup> als auch in PBS oder NaPO<sub>4</sub>-Lösung mit einem pH-Wert von 7,4 allein erzeugt werden kann.<sup>93</sup> Das an sich gesamt negativ geladene HPF-Molekül kann mit den positiv geladenen Ionen, wie Na<sup>+</sup> oder K<sup>+</sup>, des PBS über elektrostatische Wechselwirkungen interagieren. Somit agieren die positiv geladenen Ionen als eine Art Bindeglied zwischen den negativ geladenen HPF-Molekülen.



**Abbildung 6.18:** HFN-HPF-hPNF in PBS: a) Durchschnittliche Faserhöhen von hPNF, vor und nach der Lagerung in PBS für 24 h. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Ergebnisse dar; b) Repräsentative AFM-Höhenbilder von hPNF vor und nach der Lagerung in PBS für 24 h. Die Skala gilt für alle Bilder.

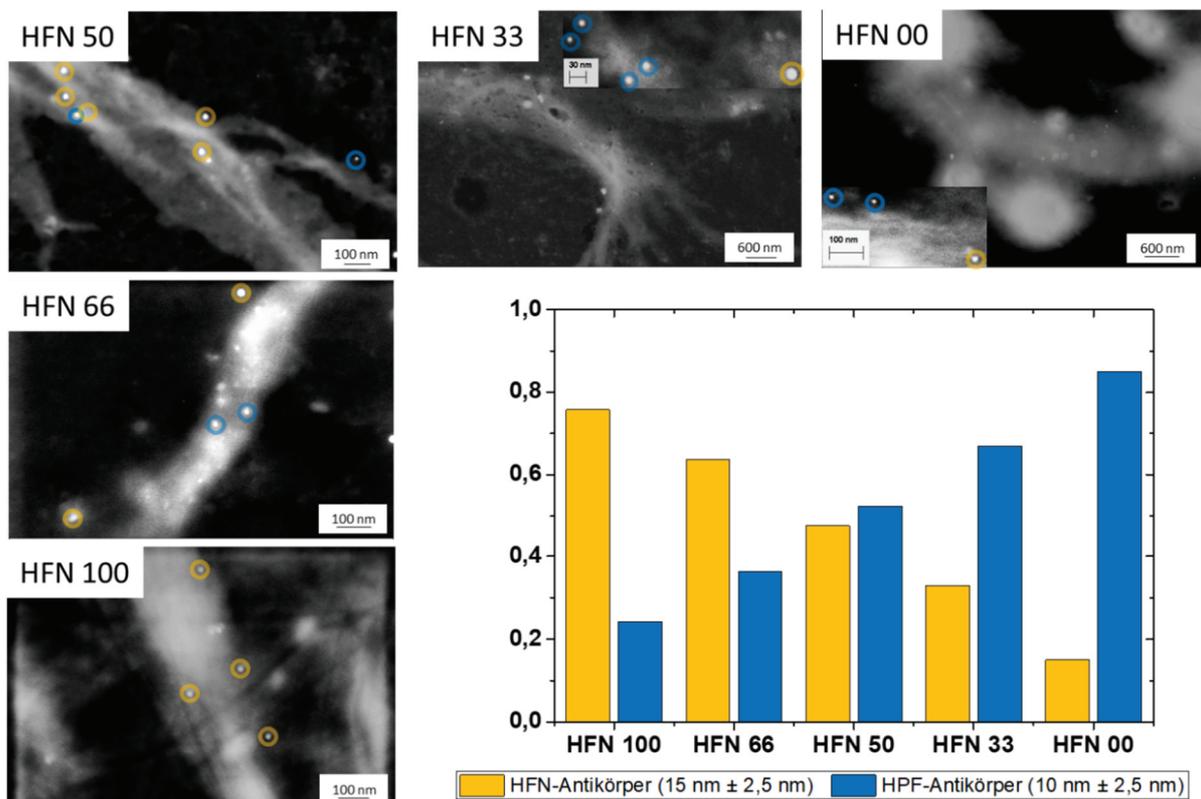
In diesem Fall verändert es die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den HPF enthaltenden hPNF, was zu einer stärkeren Agglomeration dieser zu Bündeln führt. Schließlich ist zu bedenken, dass der anfängliche Faserbildungsprozess nach 2 h initialer Assemblierung wahrscheinlich nicht abgeschlossen ist. Somit kann ein vermutlich langsames Faserwachstum angenommen werden, solange die Proteine nicht durch den Mangel an Denaturierungsmittel inaktiv oder die aktivierten einzelnen Proteine komplett umgesetzt werden. Dies würde auch das anfänglich sichtbare Wachstum der homogenen HFN-Fasern erklären.

Ähnlich wie bei Wasser stellte sich nun die Frage, ob das Verhalten in PBS mit 40 Vol.% Ethanol dem von reinem PBS ähnelt. Daher wurden die hPNF auf PS-Substraten abgeschieden, getrocknet und in PBS gelegt. Nach 24 h wurden die Proben aus PBS entnommen und mit AFM charakterisiert. Ähnlich PBS mit 40 Vol.% Ethanol waren die hPNF in reinem PBS stabil. Jedoch wurden hier nur geringe Unterschiede in der hPNF-Höhe beobachtet, die durch Ungenauigkeiten während der Messungen erklärt werden können (Abbildung 6.18). Dies zeigt, dass reines PBS die Protein-Konformation und damit die hPNF stabilisiert. Andernfalls sollte eine Verringerung der hPNF-Höhe auftreten, was auf den Abbau der hPNF hinweisen würde. Im Gegensatz zu den bisherigen DLS-Experimenten wurde kein Höhenzuwachs beobachtet. Dies kann durch die Abwesenheit von Ethanol und dem Fehlen von freien aktivierten Proteinen in PBS erklärt werden. Darüber hinaus zeigt es die Stabilisierung der hPNF. Eine Desorption von der PS-Substratoberfläche wurde nicht beobachtet. Andernfalls sollte ein Höhenzuwachs bei den HPF-reichen hPNF sichtbar sein, da diese aufgrund der vorhandenen positiven Ionen des PBS zum Agglomerieren tendieren.

### **6.3.3. Immunogold-Markierung**

Alle bisherigen Ergebnisse der HFN-HPF hPNF zeigten eine starke Abhängigkeit der Eigenschaften vom anfänglichen Proteinmischungsverhältnis. Um nun zu bestätigen, dass diese Eigenschaften durch unterschiedliche Proteinverhältnisse innerhalb der Fasern hervorgerufen werden, wurde das Immunogold-Markierungsverfahren verwendet, analog zu Abschnitt 6.2.4. Alle Fasern wurden mit den gleichen primären und sekundären Antikörpern behandelt (siehe Abschnitt 5.11.2) und anschließend im STEM untersucht. Repräsentative STEM-Bilder sind in Abbildung 6.19 dargestellt. Anschließend wurden die

Durchmesser der AuNP auf den Fasern bestimmt und den entsprechenden Proteinen zugeordnet (Abbildung 6.19). Auch hier ist ersichtlich, dass die Markierungseffizienz, ähnlich der Ergebnisse in Abschnitt 6.2.4, zwar ausreichend, aber relativ gering war. Abbildung 6.19 zeigt zusätzlich die normierten Anteile der beiden AuNP-Größen in Abhängigkeit der Proteinfaserzusammensetzung. Die Verteilung der AuNP zeigt deutlich, dass die Verhältnisse der beiden Partikelgrößen mit den anfänglichen Proteinverhältnissen korrelieren. Dies deutet darauf hin, dass beide Proteine entsprechend ihres anfänglichen Mischungsverhältnisses in die Fasern eingebaut wurden. Die Ergebnisse sind jedoch mit Vorsicht zu betrachten, wenn man bedenkt, dass die homogenen Fasern etwa 15 % bzw. 24 % AuNP aufweisen, welche das nichtvorhandene Protein markieren sollten und somit auf eine unspezifische Antikörper-Bindung hindeuten. Dies lässt sich durch die verwendeten Antikörper erklären, die an HFN und HPF im natürlichen Zustand binden sollen. Hier könnte die Denaturierung vor der Faserbildung die Exposition von Epitopen verursachen, die in der Lage sind, entweder mit dem falschen primären oder sekundären Antikörper zu interagieren und somit eine Fehldetektion zu verursachen. Diese Möglichkeit und eine Kreuzreaktion zwischen den



**Abbildung 6.19:** Immunogold-Markierung von HFN-HPF-hPNF: STEM-Aufnahmen von Immunogold markierten hPNF verschiedener Proteinverhältnisse. Au-NP die HFN anzeigen sind gelb und AuNP die HPF anzeigen blau hervorgehoben. Die normierte AuNP-Verteilung in Abhängigkeit vom Proteinverhältnis ist rechts unten dargestellt.

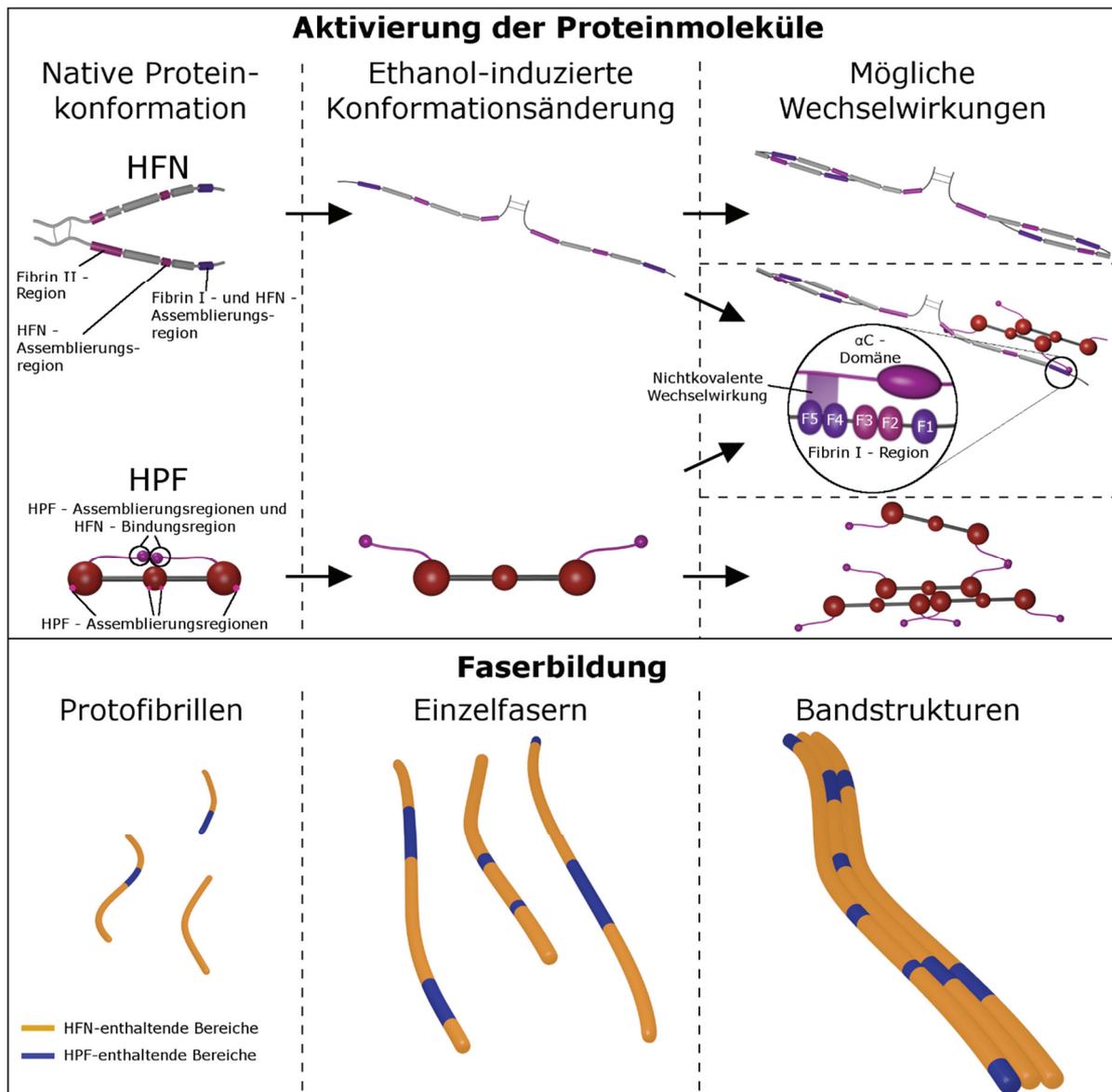
falschen primären und sekundären Antikörpern können jedoch ausgeschlossen werden, da sonst das AuNP-Verhältnis von der Zusammensetzung der Proteinfasern unabhängig wäre. Eine andere mögliche Ursache dieser Fehldetektion ist das Waschverfahren während der Immunmarkierung, welches aufgrund der Instabilität der Proteinfasern in Wasser modifiziert werden musste. Da Waschschrte nötig sind, um ungebundene Antikörper von den Proteinfasern zu spülen, wurde Wasser durch PBS ersetzt, was aber die Bildung von Salzkristalle zum Nachteil hatte. Da diese eine Analyse der Fasern und der darauf gebundenen AuNP unmöglich machten, wurden die Spülschritte reduziert, was möglicherweise die Rate der Fehldetektionen durch ungebundene und nicht entfernte AuNP erhöhte. Die Fehldetektionsrate kann daher durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und hPNF erklärt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der Immunogold-Markierung darauf hinweisen, dass eine heterogene Faserbildung stattgefunden hat und dass beide Proteine entsprechend ihres anfänglichen Mischungsverhältnis in die Fasern eingebaut wurden. Dies unterstützt die Annahmen zur Abhängigkeit der Fasereigenschaften von ihrer Zusammensetzung. Die möglichen Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Proteinen werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

#### **6.3.4. Mechanismus der Faserbildung**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu evaluieren, ob und wie die Zusammensetzung der Proteine innerhalb von hPNF deren Eigenschaften verändert. Basierend auf den Ergebnissen der Immunogold-Markierung und der beobachteten Abhängigkeit der Faserparameter von der Faserzusammensetzung (Maximum beim Proteinverhältnis 1:1), lassen sich Rückschlüsse auf den Bildungsmechanismus ziehen. Die Abhängigkeit der PNF-Eigenschaften von der Zusammensetzung lässt sich durch eine Zunahme der Wechselwirkungen zwischen den Proteinen erklären. Wie schon in Abschnitt 6.2.6 für die Faserbildung von heterogenen Fasern aus HSA und HGB beschrieben, beginnt auch hier die Faserbildung mit der Entfaltung des Proteins, induziert durch Ethanol (Abbildung 6.20). Wie Dubey *et al.* zeigten, kann neben Ethanol auch das Vorhandensein einer bestimmten Menge an teilweise entfaltenen Proteinen die Tendenz einer zweiten Proteinspezies zur Entfaltung erhöhen und somit die Faser- bzw. Protofibrillenbildung induzieren.<sup>96</sup> Durch die Entfaltung werden die einzelnen Proteine aktiviert, was zur

Bildung von Protofibrillen durch End-zu-End-Wechselwirkung führen kann. Hierbei kann die Denaturierungs- bzw. die Aktivierungskinetik der Proteine die Protofibrillenbildung beeinflussen, je höher diese ist, desto schneller können homogene Protofibrillen gebildet werden. Neben der Kinetik wird der Beginn der Protofibrillenbildung auch durch den mittleren freien Weg zwischen aktivierten Proteinen jeglicher Art beeinflusst. Ein kurzer mittlerer freier Weg beschleunigt die Bildung und Eingliederung von Protofibrillen verschiedener Arten. Der mittlere freie Weg ist dabei abhängig von der Proteinkonzentration in der Assemblierungslösung. Die sich langsamer bildenden Protofibrillen werden dann in bereits bestehende Protofibrillen während deren Wachstum eingebaut, ähnlich wie für die Protofibrillenbildung der HSA-HGB-hPNF beschrieben. Diese Protofibrillen wachsen weiter und bilden anschließend hPNF.

Ein wichtiger Faktor für die Bildung von hPNF ist das Vorhandensein von potentiellen Bindungsstellen zwischen beiden Proteinen im teilweise entfalteten Zustand. Es ist bekannt, dass die Fibrin I und Fibrin II Regionen des HFN in der Lage sind sich kovalent und nicht-kovalent an zwei verschiedene Bereiche der  $\alpha$ 221–391 Region der beiden  $\alpha$ C-Domänen des Fibrins, der enzymatisch gespaltenen Form des HPF, zu binden (Abbildung 6.20).<sup>42, 62-63</sup> Diese Region ist aber bei HPF für HFN nicht zugänglich.<sup>62-63</sup> Da beide Proteine potentielle Bindungsstellen für HFN sowie HPF aufweisen, kann von folgenden Annahmen ausgegangen werden: Die Ethanol-induzierte partielle Entfaltung der Proteine führt zur Exposition der Bindungsstellen, welche für die Wechselwirkung zwischen HFN und HPF wichtig sind. Somit induziert die Entfaltung des HPF-Moleküls ein Ablösen der  $\alpha$ C-Domänen von der zentralen E-Domäne. Dieses Verhalten von HPF wurde sowohl für die Ethanol-induzierte Bildung von homogenen HPF-Fasern<sup>92</sup> als auch für die Assemblierung von HPF-Fasern auf hydrophoben Oberflächen beschrieben.<sup>12</sup> Damit es zur Ausbildung von kovalenten Wechselwirkungen zwischen HPF und HFN kommt, ist zum Einen die enzymatische Abspaltung der FpA und FpB des HPF-Moleküls durch Thrombin erforderlich.<sup>42-43</sup> Andererseits ist während der Blutkoagulation der Blutgerinnungsfaktor XIIIa, auch Fibrin-Stabilisierender Faktor genannt, für die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen HFN und HPF verantwortlich.<sup>42-43, 62-63</sup> Da im beschriebenen Fall aber keines dieser Enzyme vorhanden war, ist anzunehmen, dass die Interaktionen zwischen HFN und HPF auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen beruhen. Die Annahme von nicht-kovalenten Wechselwirkungen wird durch die Ergebnisse der Stabilitätsprüfung in Wasser gestützt.



**Abbildung 6.20:** Bildungsmechanismus der HFN-HPF-hPNF: der Ethanol induziert eine Konformationsänderung beider Proteine, was die Wechselwirkung der Proteine untereinander ermöglicht. Entsprechende Wechselwirkungsstellen sind farblich markiert und mögliche Wechselwirkungen sind dargestellt. Die Vergrößerung zeigt die Interaktion der  $\alpha C$ -Domäne des HPF mit der Fibrin I-Region des HFN nach Makogonenko et al.<sup>63</sup> Die Interaktionen ermöglichen die Bildung von Protofibrillen, welche anschließend weiter zu einzelnen Fasern und Bandstrukturen wachsen. HPF enthaltende Regionen sind blau, HFN enthaltende Regionen orange markiert.

Basierend auf bisherigen Erkenntnissen und dem Experiment von Wei *et al.*, welche HPF-PNF durch Absenken des pH-Wertes auf 2 herstellten,<sup>104</sup> lässt sich folgende Schlussfolgerung ziehen: Die Anwesenheit bestimmter Ionen im Assemblierungsmedium spielt eine große Rolle bei der Entfaltung und Wechselwirkung von Proteinen und kann zu einer reversiblen Bildung von Amyloid-ähnlichen Fasern basierend auf elektrostatischer Wechselwirkungen führen. Dies ist eine interessante Erkenntnis, da im

Rahmen der PNF-Bildung typischerweise polare / unpolare Wechselwirkungen erwähnt werden. Darüber hinaus fördert das Vorhandensein einer teilweise entfalteten Proteinspezies die Möglichkeit der Entfaltung einer weiteren Spezies und somit dessen Faserbildung.<sup>96</sup> Grund hierfür ist, dass sich die Gesamtmenge möglicher Bindungsstellen und somit die Wechselwirkungsmöglichkeiten erhöhen. Durch die Wechselwirkungen der beiden teilweise entfalteten Proteinspezies stabilisieren sich diese gegenseitig. Durch diese verstärkenden Interaktionen zwischen zwei Proteinspezies wachsen die resultierenden heterogenen Fasern schneller und haben daher nach gleicher Assemblierungszeit eine größere Höhe bzw. einen größeren Durchmesser.<sup>96</sup> Diese Überlegung erklärt die beobachteten Unterschiede in der Faserhöhe/-durchmesser in Abhängigkeit der Faserzusammensetzung. Aufgrund der höchsten Konzentration an Zweitprotein in HFN 50 Fasern, sollten der Einfluss des Zweitproteins dort am Größten sein. Hierdurch wird die Faserbildung beschleunigt bzw. die Protein-Protein-Wechselwirkungen verstärkt, was in dickeren und größeren Fasern resultiert. Dies wurde in Abschnitt 6.3.1 gezeigt.

Darüber hinaus können die Wechselwirkungen zwischen Proteinen jedoch nicht nur End-zu-End auftreten, sondern auch von lateralem Charakter sein, da die oben genannten elektrostatischen Wechselwirkungen und exponierten Bindungsstellen an den Außenseiten der Proteine vorliegen (Abbildung 6.20). Dies würde die hohe Anzahl von Bandstrukturen erklären, die während der Untersuchungen gefunden wurden.

Die in diesem Teil der Arbeit beobachteten selbstassemblierten hPNF können die Grundlage für neue Biomaterialstrukturen darstellen, bei welchen sich auf Basis ihrer Zusammensetzung die Eigenschaften kontrollieren lassen. Sowohl HFN als auch HPF spielen in der Natur eine wichtige Rolle und beeinflussen die Biokompatibilität von Biomaterialien<sup>13, 18, 42, 58, 104, 197-198</sup> Da die hier dargestellten Ergebnisse einen Anstieg fast aller untersuchten Parameter für heterogene Fasern im Vergleich zu homogenen Fasern zeigen, kann eine Korrelation auch für andere Parameter dieser hPNF, wie die Bioaktivität erwartet werden. Die Untersuchung dieses Zusammenhanges ist Gegenstand zukünftiger Studien.

### 6.3.5. Kapitelzusammenfassung

Basierend auf den Erkenntnissen aus Kapitel 6.2 wurden in diesem Teil erstmals hPNF erfolgreich mittels Ethanol-induzierter Selbstassemblierung hergestellt. Das Verhältnis von HFN und HPF innerhalb der Fasern korreliert scheinbar mit dem Mischungsverhältnis in den Ausgangslösungen. Erstmals konnte gezeigt werden, dass das Proteinverhältnis von selbstassemblierten hPNF sowohl die Dimensionen der Proteinfaser als auch deren Eigenschaften wie Zeta-Potenzial oder Stabilität in verschiedenen Dispersionsmedien beeinflusst. Diese Erkenntnis ist besonders interessant für zukünftige Anwendungen dieser Fasern als Biomaterialien, da sie das Potenzial bieten, die gewünschten Eigenschaften des technischen Gewebes durch einfache Änderung des Mischungsverhältnisses der Proteine in der Ausgangslösung anzupassen. Dies ist nützlich, um die Funktionen der hPNF wie beispielsweise Zellwachstum und -migration anzupassen.

Weiterhin wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, wie beide Proteine die Fasereigenschaften beeinflussen können und wie die Faserbildung durch die unterschiedlichen Konzentrationen der Proteinspezies beeinflusst werden kann. Basierend auf den Ergebnissen und der Literatur kann geschlossen werden, dass elektrostatische Wechselwirkungen eine Rolle bei der Faserbildung spielen. Durch Reduktion der elektrostatischen Wechselwirkungen im Bereich der pIs der verwendeten Proteine kam es zur Zersetzung der Fasern in Wasser. Die gewonnenen Erkenntnisse tragen zum Verständnis der Wechselwirkung zwischen Proteinen bei und helfen bei der Gestaltung und Herstellung von Biomaterialien.

Im Rahmen dieser Arbeit bleiben einige Fragen jedoch offen. Vor allem die innere Struktur ist von großem Interesse, wie zu Beispiel die Anordnung der Proteinmoleküle im Inneren. Die Beantwortung würde einerseits wertvolle Einblicke in die detaillierte Faserarchitektur oder in die Protein-Protein- und Protein-Lösungsmittel-Interaktionen geben, andererseits eine gezielte Strukturierung der Fasern und eine Erweiterung ihrer Funktionalität ermöglichen (z.B. Verkapselung und Freisetzung bei Abbau, gezielte Faserverzweigung etc.). Weiterhin ist die Verteilung der Proteine innerhalb der Faser unklar und es sollte untersucht werden, ob und wie diese Verteilung beeinflusst werden kann, um beispielsweise Gradientenfasern herzustellen.

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Aspekte untersucht, um die Selbstassemblierung von Proteinen zu beeinflussen. Aufgrund ihres natürlichen Vermögens der Selbstassemblierung sowie der wichtigen Funktionen der resultierenden Strukturen in der Natur, stellen Proteine einen Grundbaustein für neue selbstassemblierte Biomaterialien dar. Jedoch müssen hierzu Wege aufgezeigt werden, wie einerseits die sich bildenden Strukturen beeinflusst, andererseits die Zusammensetzung von hPNF und somit deren Eigenschaften kontrolliert werden können.

Da Proteine während der Adsorption auf Oberflächen zur Selbstassemblierung tendieren, wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer im sub-Nanometerbereich strukturierten PE-EK-Oberfläche auf die Orientierung von HPF-Molekülen während der Adsorption untersucht. Nach der Adsorption bei einem pH-Wert von 9,2 wurde eine Ausrichtung von einzelnen HPF-Molekülen entlang der [100]- und [010]-Richtungen der PE-EK-Oberfläche beobachtet. Der Orientierungsmechanismus beruht auf erhöhten intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Kettenfaltungen der PE-EK-Nanostruktur und dem HPF-Molekül durch eine erhöhte OKD in den bevorzugten Richtungen. Zusätzlich beeinflussen die strukturellen Ähnlichkeiten der Kettenfaltungen des PE-EK sowie der  $\alpha$ -Helix-Strukturen des HPF-Moleküls die Ausrichtung der HPF-Moleküle. Eine Verringerung des pH-Wertes auf physiologische Bedingungen (7,4) führte zur Erhöhung der Protein-Protein-Wechselwirkungen, aber auch zum Verschwinden der bevorzugten Orientierung. Die erhöhten Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden durch das Freiwerden der  $\alpha$ C-Domänen des HPF-Moleküls induziert und führten zur Selbstassemblierung des HPF zu Fasern, faserartigen Netzwerken und schwammähnlichen Schichten. Diese Assemblierungsstrukturen behinderten die Diffusion auf der PE-EK-Oberfläche und somit die Ausrichtung der Proteinstrukturen. Die vorliegende Arbeit zeigt somit, dass neben der Oberflächenstruktur auch das umgebende Medium die Selbstassemblierung beeinflusst.

In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Selbstassemblierung einzelner Proteine durch die Änderung der Umgebungsbedingungen induziert wird. Dabei stellte sich die Frage, ob die Zusammensetzung resultierender selbstassemblierter PNF kontrolliert werden kann. Dies würde das Spektrum möglicher Eigenschaften solcher hPNF maßgeblich erweitern. Hierzu wurde erstmalig die gleichzeitige Ethanol-induzierte

Selbstassemblierung von zwei Plasmaproteinen untersucht. Die neuen selbstassemblierten hPNF aus HSA und HGB bildeten einen zeitabhängigen Polymorphismus aus, welcher sich in der morphologischen Änderung von Protofibrillen über Bänder zu verdrehten Fasern zeigte. Zum ersten Mal wurde der heterogene Charakter einzelner selbstassemblierter Fasern direkt auf der Nanoebene mittels TERS nachgewiesen. Zusätzlich wurde dieser mittels Immunogold-Markierung bestätigt. Es wird vermutet, dass die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteinen auf elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen ähnlichen Aminosäuren beruhen, welche durch die Ethanol-induzierte Entfaltung exponiert werden. Die Analyse der Proteinanteile in den Fasern ergab, dass trotz eines molaren Verhältnisses von 1:1 in der Assemblierungslösung weniger als 10 % der Fasern aus HGB bestanden. Dies wurde durch die unterschiedlichen Assemblierungskinetiken erklärt. Die kraftspektroskopischen Ergebnisse zeigten den Einfluss des Zweitproteins auf die mechanischen Eigenschaften der hPNF. Aus den gewonnenen Erkenntnissen wurde ein Modell zur Selbstassemblierung der hPNF abgeleitet, welches eine Vorhersage neuer potentieller selbstassemblierter hPNF erlaubt.

Da bei zu hohem HGB-Anteil die Faserbildung nicht eintrat, war eine Variation der Verhältnisse in der hPNF nicht möglich. Um den Einfluss der Proteinverhältnisse in den hPNF auf deren PNF-Charakteristika und -Eigenschaften zu untersuchen, musste ein anderes System gewählt werden, HPF und HFN. Erstmals wurde für diese Proteine die Ethanol-induzierte Koselbstassemblierung gezeigt und während der Assemblierung die molaren Proteinverhältnisse variiert. Zum ersten Mal wurde dabei für selbstassemblierte Fasern die Abhängigkeit der Fasercharakteristika wie Höhe,  $R_H$  sowie Zeta-Potenzial vom Proteinverhältnis beobachtet. Dabei erreichten die hPNF aus einem molaren Proteinverhältnis von 1:1 immer den betragsmäßig höchsten Wert, was auf stärkere Wechselwirkungen hindeutet. Auch verschiedene Stabilitätstests zeigten Abhängigkeiten vom Proteinverhältnis. Wird die Ionenstärke erhöht und der Ethanolgehalt verringert, so bleiben aus HFN bestehende Fasern zum Großteil stabil. Im Gegensatz dazu tendieren reine HPF-Fasern und Fasern mit hohem HPF-Anteil zur Aggregation. In reinem PBS bleiben alle Fasern ohne weiteres Wachstum stabil. Konträr dazu wurde das Auflösen aller PNF in Wasser beobachtet. Dies legt nahe, dass die Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen interagieren, welche durch Zugabe von Wasser reduziert werden. Immunogold-Markierungsexperimente bestätigten nicht zweifelsfrei den heterogenen

Charakter der Fasern. Dieser konnte jedoch anschließend mit den vom Proteinverhältnis abhängigen Änderungen der Fasercharakteristika und -eigenschaften bestätigt werden. Basierend auf den gewonnenen Ergebnissen wurde ein Modell entwickelt, welches die Änderungen der verschiedenen Eigenschaften sowie die Entstehung der hPNF erklärt. Diese Arbeit zeigt somit, dass die Charakteristika und Eigenschaften von selbstassemblierten heterogenen Fasern durch Änderung des Proteinverhältnisses beeinflusst werden können.

Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse über selbstassemblierte Strukturen mit heterogenem Charakter legen den Grundstein für die Entwicklung einer neuen Art proteinbasierter Biomaterialien. Sie zeigen Wege auf, wie die Eigenschaften dieser zukünftigen Materialien erweitert und gesteuert werden können. Hierzu muss einerseits weiterführend die biologische Verträglichkeit der neuen Strukturen getestet werden und andererseits ist eine Hochskalierung der selbstassemblierten hPNF zu 3D-Netzwerken nötig, um diese beispielsweise als Gerüststruktur für das Tissue-Engineering zu verwenden. Dies wird Teil von zukünftigen Arbeiten sein.



## 8. Literaturverzeichnis

1. Pauling, L.; Corey, R. B.; Branson, H. R., The Structure of Proteins - 2 Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, 37 (4), 205-211.
2. Bunn, C. W.; Klug, H. P., Chemical Crystallography. *The Journal of Physical Chemistry* **1946**, 50 (6), 490-491.
3. Mary Ann Clark, J. C., Matthew Douglas, Biology. OpenStax, Ed. Rice University: Houston, Texas, 2018. <https://openstax.org/details/books/biology-2e>.
4. Curry, S.; Mandelkow, H.; Brick, P.; Franks, N., Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Structural Biology* **1998**, 5 (9), 827-835.
5. Cen, L.; Liu, W.; Cui, L.; Zhang, W.; Cao, Y., Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatric research* **2008**, 63 (5), 492-6.
6. Weber, K. T.; Sun, Y.; Tyagi, S. C.; Cleutjens, J. P., Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *Journal of molecular and cellular cardiology* **1994**, 26 (3), 279-92.
7. Bratek-Skicki, A.; Żeliszewska, P.; Ruso, J. M., Fibrinogen: a journey into biotechnology. *Soft Matter* **2016**, 12 (42), 8639-8653.
8. Maggini, L.; Bonifazi, D., Hierarchised luminescent organic architectures: design, synthesis, self-assembly, self-organisation and functions. *Chemical Society Reviews* **2012**, 41 (1), 211-241.
9. Wei, G.; Su, Z.; Reynolds, N. P.; Arosio, P.; Hamley, I. W.; Gazit, E.; Mezzenga, R., Self-assembling peptide and protein amyloids: from structure to tailored function in nanotechnology. *Chemical Society Reviews* **2017**, 46 (15), 4661-4708.
10. Vogler, E. A., Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials* **2012**, 33 (5), 1201-1237.
11. Hlady, V.; Buijs, J., Protein adsorption on solid surfaces. *Current Opinion in Biotechnology* **1996**, 7 (1), 72-77.
12. Koo, J.; Galanakis, D.; Liu, Y.; Ramek, A.; Fields, A.; Ba, X.; Simon, M.; Rafailovich, M. H., Control of Anti-Thrombogenic Properties: Surface-Induced Self-Assembly of Fibrinogen Fibers. *Biomacromolecules* **2012**, 13 (5), 1259-1268.
13. Firkowska-Boden, I.; Zhang, X.; Jandt, K. D., Controlling Protein Adsorption through Nanostructured Polymeric Surfaces. *Advanced Healthcare Materials* **2018**, 7 (1), n/a.
14. Babitha, S.; Rachita, L.; Karthikeyan, K.; Shoba, E.; Janani, I.; Poornima, B.; Purna Sai, K., Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, 523 (1), 52-90.
15. Sill, T. J.; von Recum, H. A., Electro spinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* **2008**, 29 (13), 1989-2006.
16. Bak, H.; Afoke, A.; McLeod, A. J.; Brown, R.; Shamlou, P. A.; Dunnill, P., The impact of rheology of human fibronectin-fibrinogen solutions on fibre extrusion for tissue engineering. *Chemical Engineering Science* **2002**, 57 (6), 913-920.
17. Harding, S. I.; Afoke, A.; Brown, R. A.; MacLeod, A.; Shamlou, P. A.; Dunnill, P., Engineering and cell attachment properties of human fibronectin-fibrinogen scaffolds for use in tissue engineered blood vessels. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2002**, 25 (1), 53-9.

18. Jacobsen, M. M.; Li, D.; Gyune Rim, N.; Backman, D.; Smith, M. L.; Wong, J. Y., Silk-fibronectin protein alloy fibres support cell adhesion and viability as a high strength, matrix fibre analogue. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 45653.
19. Raoufi, M.; Aslankoochi, N.; Mollenhauer, C.; Boehm, H.; Spatz, J. P.; Bruggemann, D., Template-assisted extrusion of biopolymer nanofibers under physiological conditions. *Integrative Biology* **2016**, *8* (10), 1059-1066.
20. Raoufi, M.; Das, T.; Schoen, I.; Vogel, V.; Bruggemann, D.; Spatz, J. P., Nanopore Diameters Tune Strain in Extruded Fibronectin Fibers. *Nano Letters* **2015**, *15* (10), 6357-64.
21. Underwood, S.; Afoke, A.; Brown, R. A.; MacLeod, A. J.; Shamlou, P. A.; Dunnill, P., Wet extrusion of fibronectin-fibrinogen cables for application in tissue engineering. *Biotechnology and Bioengineering* **2001**, *73* (4), 295-305.
22. Krieg, E.; Bastings, M. M. C.; Besenius, P.; Rybtchinski, B., Supramolecular Polymers in Aqueous Media. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (4), 2414-2477.
23. Okesola, B. O.; Mata, A., Multicomponent self-assembly as a tool to harness new properties from peptides and proteins in material design. *Chemical Society Reviews* **2018**, *47* (10), 3721-3736.
24. Woolfson, D. N.; Mahmoud, Z. N., More than just bare scaffolds: towards multi-component and decorated fibrous biomaterials. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39* (9), 3464-3479.
25. Painter, P. C.; Coleman, M. M., *Fundamentals of Polymer Science: An Introductory Text: Answers to Study Questions (by the Same Authors with a Little from Their Students)*. Technomic: 1997.
26. Coleman, M. M., *Fundamentals of Polymer Science: An Introductory Text*. Routledge: 2019.
27. Bower, D. I., *An Introduction to Polymer Physics*. Cambridge University Press: Cambridge, 2002.
28. Boyd, R. H.; Phillips, P. J., *The science of polymer molecules*. Cambridge University Press: 1996.
29. Abts, G., *Kunststoff-Wissen für Einsteiger*. Carl Hanser Verlag GmbH Co KG: 2016.
30. Helbing, C.; Stoeßel, R.; Hering, D. A.; Arras, M. M. L.; Bossert, J.; Jandt, K. D., pH-Dependent Ordered Fibrinogen Adsorption on Polyethylene Single Crystals. *Langmuir* **2016**, *32* (45), 11868-11877.
31. Allegra, G.; Famulari, A., Chain statistics in polyethylene crystallization. *Polymer* **2009**, *50* (8), 1819-1829.
32. Hoffman, J. D.; Miller, R. L., Kinetics of crystallization from the melt and chain folding in polyethylene fractions revisited: Theory and experiment. *Polymer* **1997**, *38* (13), 3151-3212.
33. Bouhallab, S.; Croguennec, T., Spontaneous Assembly and Induced Aggregation of Food Proteins. In *Polyelectrolyte Complexes in the Dispersed and Solid State II: Application Aspects*, Muller, M., Ed. 2014; Vol. 256, pp 67-101.
34. Petsko, G. A.; Ringe, D., *Protein Structure and Function*. New Science Press: 2004.
35. Ulijn, R. V.; Smith, A. M., Designing peptide based nanomaterials. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37* (4), 664-675.
36. Liu, R.; Qin, P.; Wang, L.; Zhao, X.; Liu, Y.; Hao, X., Toxic effects of ethanol on bovine serum albumin. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **2010**, *24* (1), 66-71.
37. Gillam, J. E.; MacPhee, C. E., Modelling amyloid fibril formation kinetics: mechanisms of nucleation and growth. *Journal of Physics-Condensed Matter* **2013**, *25* (37).

38. Jun, C.; Xue, Y.; Liu, R.; Wang, M., Study on the toxic interaction of methanol, ethanol and propanol against the bovine hemoglobin (BHb) on molecular level. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2011**, *79* (5), 1406-1410.
39. Marx, G.; Mou, X.; Hotovely-Salomon, A.; Levdansky, L.; Gaberman, E.; Belenky, D.; Gorodetsky, R., Heat denaturation of fibrinogen to develop a biomedical matrix. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2008**, *84B* (1), 49-57.
40. Iram, A.; Naeem, A., Detection and analysis of protofibrils and fibrils of hemoglobin: implications for the pathogenesis and cure of heme loss related maladies. *Arch Biochem Biophys* **2013**, *533* (1-2), 69-78.
41. Köhler, S.; Schmid, F.; Settanni, G., The Internal Dynamics of Fibrinogen and Its Implications for Coagulation and Adsorption. *PLoS Computational Biology* **2015**, *11* (9), e1004346.
42. Mosesson, M. W., Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2005**, *3* (8), 1894-1904.
43. Weisel, J. W.; Litvinov, R. I., Fibrin Formation, Structure and Properties. In *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms*, Parry, D. A. D.; Squire, J. M., Eds. Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 405-456.
44. Mosesson, M. W.; Siebenlist, K. R.; DiOrio, J. P.; Matsuda, M.; Hainfeld, J. F.; Wall, J. S., The role of fibrinogen D domain intermolecular association sites in the polymerization of fibrin and fibrinogen Tokyo II (gamma 275 Arg-->Cys). *J Clin Invest* **1995**, *96* (2), 1053-1058.
45. Scheraga, H. A., The thrombin-fibrinogen interaction. *Biophysical Chemistry* **2004**, *112* (2-3), 117-130.
46. Wolberg, A. S., Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Reviews* **2007**, *21* (3), 131-142.
47. Prieto-Garcia, A.; Castells, M. C.; Stevens, R. L.; Hansbro, P. M., Mast cell-restricted tetramer-forming tryptases and their beneficial roles in hemostasis and blood coagulation. *Immunology and Allergy Clinics of North America* **2014**, *34* (2), 263-81.
48. Serpell, L. C.; Benson, M.; Liepnieks, J. J.; Fraser, P. E., Structural analyses of fibrinogen amyloid fibrils. *Amyloid* **2007**, *14* (3), 199-203.
49. Meloun, B.; Moravek, L.; Kostka, V., Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS letters* **1975**, *58* (1-2), 134-137.
50. Gelsow, M. J., Human serum albumin structure-solved. *Trends in biotechnology* **1992**, *10*, 335-337.
51. Farruggia, B.; Picó, G. A., Thermodynamic features of the chemical and thermal denaturations of human serum albumin. *International journal of biological macromolecules* **1999**, *26* (5), 317-323.
52. Guizado, T. R. C., Analysis of the structure and dynamics of human serum albumin. *Journal of Molecular Modeling* **2014**, *20* (10), 2450.
53. Putnam, F., *The Plasma Proteins V3: Structure, Function, and Genetic Control*. Elsevier: 2012.
54. Farruggia, B.; Rodriguez, F.; Rigatuso, R.; Fidelio, G.; Picó, G., The participation of human serum albumin domains in chemical and thermal unfolding. *Journal of protein chemistry* **2001**, *20* (1), 81-89.
55. Juárez, J.; Alatorre-Meda, M.; Cambón, A.; Topete, A.; Barbosa, S.; Taboada, P.; Mosquera, V., Hydration effects on the fibrillation process of a globular protein: the case of human serum albumin. *Soft Matter* **2012**, *8* (13).

56. Schaller, J.; Gerber, S.; Kaempfer, U.; Lejon, S.; Trachsel, C., *Human blood plasma proteins: structure and function*. John Wiley & Sons: 2008.
57. Bringas, M.; Petruk, A. A.; Estrin, D. A.; Capece, L.; Martí, M. A., Tertiary and quaternary structural basis of oxygen affinity in human hemoglobin as revealed by multiscale simulations. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1), 10926.
58. Pankov, R.; Yamada, K. M., Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* **2002**, *115* (20), 3861-3863.
59. Bradshaw, M. J.; Smith, M. L., Multiscale relationships between fibronectin structure and functional properties. *Acta Biomaterialia* **2014**, *10* (4), 1524-1531.
60. Hymes, J. P.; Klaenhammer, T. R., Stuck in the Middle: Fibronectin-Binding Proteins in Gram-Positive Bacteria. *Frontiers in Microbiology* **2016**, *7* (1504).
61. Faustino, N. A.; Cooper, T. A., Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes & development* **2003**, *17* (4), 419-437.
62. Makogonenko, E.; Ingham, K. C.; Medved, L., Interaction of the Fibronectin COOH-Terminal Fib-2 Regions with Fibrin: Further Characterization and Localization of the Fib-2-Binding Sites. *Biochemistry* **2007**, *46* (18), 5418-5426.
63. Makogonenko, E.; Tsurupa, G.; Ingham, K.; Medved, L., Interaction of Fibrin(ogen) with Fibronectin: Further Characterization and Localization of the Fibronectin-Binding Site. *Biochemistry* **2002**, *41* (25), 7907-7913.
64. Macritchie, F., Proteins at interfaces. *Advances in protein chemistry* **1978**, *32*, 283-326.
65. Rechendorff, K.; Hovgaard, M. B.; Foss, M.; Zhdanov, V. P.; Besenbacher, F., Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness. *Langmuir* **2006**, *22* (26), 10885-10888.
66. Scopelliti, P. E.; Borgonovo, A.; Indrieri, M.; Giorgetti, L.; Bongiorno, G.; Carbone, R.; Podesta, A.; Milani, P., The Effect of Surface Nanometre-Scale Morphology on Protein Adsorption. *Plos One* **2010**, *5* (7).
67. Hulander, M.; Lundgren, A.; Berglin, M.; Ohrlander, M.; Lausmaa, J.; Elwing, H., Immune complement activation is attenuated by surface nanotopography. *International Journal of Nanomedicine* **2011**, *6*, 2653-2666.
68. Kurylowicz, M.; Paulin, H.; Mogyoros, J.; Giuliani, M.; Dutcher, J. R., The effect of nanoscale surface curvature on the oligomerization of surface-bound proteins. *Journal of the Royal Society Interface* **2014**, *11* (94).
69. Shaw, C. P.; Middleton, D. A.; Volk, M.; Levy, R., Amyloid-Derived Peptide Forms Self-Assembled Mono layers on Gold Nanoparticle with a Curvature-Dependent beta-Sheet Structure. *ACS Nano* **2012**, *6* (2), 1416-1426.
70. Vertegel, A. A.; Siegel, R. W.; Dordick, J. S., Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir* **2004**, *20* (16), 6800-6807.
71. Giambianco, N.; Martines, E.; Marletta, G., Laminin Adsorption on Nanostructures: Switching the Molecular Orientation by Local Curvature Changes. *Langmuir* **2013**, *29* (26), 8335-8342.
72. Painter, P. C.; Coleman, M. M., *Essentials of polymer science and engineering*. DEStech Publications, Inc: **2008**.
73. Darling, S. B., Directing the self-assembly of block copolymers. *Progress in Polymer Science* **2007**, *32* (10), 1152-1204.
74. Bates, F. S.; Fredrickson, G. H., Block copolymers - Designer soft materials. *Physics Today* **1999**, *52* (2), 32-38.

75. Schulze, R.; Arras, M. M. L.; Helbing, C.; Hölzer, S.; Schubert, U. S.; Keller, T. F.; Jandt, K. D., How the Calorimetric Properties of a Crystalline Copolymer Correlate to Its Surface Nanostructures. *Macromolecules* **2014**, *47* (5), 1705-1714.
76. Zhang, X.; Ouyang, Z.; Schulze, R.; Keller, T. F.; Jandt, K. D.; Su, Z., Pathway mediated microstructures and phase morphologies of asymmetric double crystalline co-oligomers. *RSC Advances* **2014**, *4* (16), 7900-7910.
77. Matsusaki, M.; Omichi, M.; Kadowaki, K.; Kim, B. H.; Kim, S. O.; Maruyama, I.; Akashi, M., Protein nanoarrays on a highly-oriented lamellar surface. *Chemical Communications* **2010**, *46* (11), 1911-1913.
78. Xie, T.; Vora, A.; Mulcahey, P. J.; Nanesco, S. E.; Singh, M.; Choi, D. S.; Huang, J. K.; Liu, C.-C.; Sanders, D. P.; Hahm, J.-i., Surface Assembly Configurations and Packing Preferences of Fibrinogen Mediated by the Periodicity and Alignment Control of Block Copolymer Nanodomains. *ACS Nano* **2016**, *10* (8), 7705-7720.
79. Lau, K. H. A.; Bang, J.; Kim, D. H.; Knoll, W., Self-assembly of Protein Nanoarrays on Block Copolymer Templates. *Advanced Functional Materials* **2008**, *18* (20), 3148-3157.
80. Kumar, N.; Parajuli, O.; Dorfman, A.; Kipp, D.; Hahm, J.-i., Activity study of self-assembled proteins on nanoscale diblock copolymer templates. *Langmuir* **2007**, *23* (14), 7416-7422.
81. Song, S.; Milchak, M.; Zhou, H.; Lee, T.; Hanscom, M.; Hahm, J.-i., Nanoscale protein arrays of rich morphologies via self-assembly on chemically treated diblock copolymer surfaces. *Nanotechnology* **2013**, *24* (9).
82. Keller, T. F.; Schoenfelder, J.; Reichert, J.; Tuccitto, N.; Licciardello, A.; Messina, G. M. L.; Marletta, G.; Jandt, K. D., How the Surface Nanostructure of Polyethylene Affects Protein Assembly and Orientation. *Acs Nano* **2011**, *5* (4), 3120-3131.
83. Zhang, X.; Helbing, C.; Arras, M. M. L.; Jandt, K. D.; Firkowska-Boden, I., Nanocrystal Width Controls Fibrinogen Orientation and Assembly Kinetics on Poly(butene-1) Surfaces. *Langmuir* **2017**, *33* (26), 6563-6571.
84. Zhang, X.; Firkowska-Boden, I.; Arras, M. M. L.; Kastantin, M. J.; Helbing, C.; Özogul, A.; Gnecco, E.; Schwartz, D. K.; Jandt, K. D., Nanoconfinement and Sansetsukon-like Nanocrawling Govern Fibrinogen Dynamics and Self-Assembly on Nanostructured Polymeric Surfaces. *Langmuir* **2018**, *34* (47), 14309-14316.
85. Kastantin, M.; Keller, T. F.; Jandt, K. D.; Schwartz, D. K., Single-Molecule Tracking of Fibrinogen Dynamics on Nanostructured Poly(ethylene) Films. *Advanced Functional Materials* **2012**, *22* (12), 2617-2623.
86. Keller, T. F.; Mueller, M.; Ouyang, W.; Zhang, J.-T.; Jandt, K. D., Templating alpha-Helical Poly(L-lysine)/Polyanion Complexes by Nanostructured Uniaxially Oriented Ultrathin Polyethylene Films. *Langmuir* **2010**, *26* (24), 18893-18901.
87. Knowles, T. P. J.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M., The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2014**, *15*, 384.
88. Raymond, D. M.; Nilsson, B. L., Multicomponent peptide assemblies. *Chemical Society Reviews* **2018**, *47* (10), 3659-3720.
89. Kagan, B. L., Antimicrobial amyloids? *Biophysical journal* **2011**, *100* (7), 1597-1598.
90. Scheibel, T.; Parthasarathy, R.; Sawicki, G.; Lin, X.-M.; Jaeger, H.; Lindquist, S. L., Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100* (8), 4527-4532.

91. Lara, C.; Gourdin-Bertin, S.; Adamcik, J.; Bolisetty, S.; Mezzenga, R., Self-Assembly of Ovalbumin into Amyloid and Non-Amyloid Fibrils. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (12), 4213-4221.
92. Wei, G.; Reichert, J.; Jandt, K. D., Controlled self-assembly and templated metallization of fibrinogen nanofibrils. *Chemical Communications* **2008**, (33), 3903-3905.
93. Stapelfeldt, K.; Stamboroski, S.; Mednikova, P.; Bruggemann, D., Fabrication of 3D-nanofibrous fibrinogen scaffolds using salt-induced self assembly. *Biofabrication* **2019**, *11* (2), 025010.
94. Krebs, M. R.; Wilkins, D. K.; Chung, E. W.; Pitkeathly, M. C.; Chamberlain, A. K.; Zurdo, J.; Robinson, C. V.; Dobson, C. M., Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the beta-domain. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *300* (3), 541-9.
95. Arnaudov, L. N.; de Vries, R., Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme. *Biophysical journal* **2005**, *88* (1), 515-526.
96. Dubey, K.; Anand, B. G.; Temgire, M. K.; Kar, K., Evidence of Rapid Coaggregation of Globular Proteins during Amyloid Formation. *Biochemistry* **2014**, *53* (51), 8001-8004.
97. Mališauskas, M.; Zamotin, V.; Jass, J.; Noppe, W.; Dobson, C. M.; Morozova-Roche, L. A., Amyloid Protofilaments from the Calcium-binding Protein Equine Lysozyme: Formation of Ring and Linear Structures Depends on pH and Metal Ion Concentration. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *330* (4), 879-890.
98. Akkermans, C.; Venema, P.; van der Goot, A. J.; Gruppen, H.; Bakx, E. J.; Boom, R. M.; van der Linden, E., Peptides are Building Blocks of Heat-Induced Fibrillar Protein Aggregates of  $\beta$ -Lactoglobulin Formed at pH 2. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (5), 1474-1479.
99. Usov, I.; Adamcik, J.; Mezzenga, R., Polymorphism in bovine serum albumin fibrils: morphology and statistical analysis. *Faraday Discussions* **2013**, 166.
100. Usov, I.; Mezzenga, R., Correlation between Nanomechanics and Polymorphic Conformations in Amyloid Fibrils. *ACS Nano* **2014**, *8* (11), 11035-11041.
101. Usov, I.; Adamcik, J.; Mezzenga, R., Polymorphism Complexity and Handedness Inversion in Serum Albumin Amyloid Fibrils. *ACS Nano* **2013**, *7* (12), 10465-10474.
102. Liu, W.; Prausnitz, J. M.; Blanch, H. W., Amyloid fibril formation by peptide LYS (11-36) in aqueous trifluoroethanol. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (5), 1818-1823.
103. Moosavi-Movahedi, A. A.; Pirzadeh, P.; Hashemnia, S.; Ahmadian, S.; Hemmateenejad, B.; Amani, M.; Saboury, A.; Ahmad, F.; Shamsipur, M.; Hakimelahi, G., Fibril formation of lysozyme upon interaction with sodium dodecyl sulfate at pH 9.2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, *60* (1), 55-61.
104. Wei, G.; Reichert, J.; Bossert, J.; Jandt, K. D., Novel Biopolymeric Template for the Nucleation and Growth of Hydroxyapatite Crystals Based on Self-Assembled Fibrinogen Fibrils. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (11), 3258-3267.
105. Wei, G.; Keller, T. F.; Zhang, J.; Jandt, K. D., Novel 1-D biophotonic nanohybrids: protein nanofibers meet quantum dots. *Soft Matter* **2011**, *7* (5), 2011-2018.
106. Dong, M.; Xu, S.; Bunger, M. H.; Birkedal, H.; Besenbacher, F., Temporal assembly of collagen type II studied by atomic force microscopy. *Advanced Engineering Materials* **2007**, *9* (12), 1129-1133.

107. Li, M.; Mondrinos, M. J.; Gandhi, M. R.; Ko, F. K.; Weiss, A. S.; Lelkes, P. I., Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials* **2005**, *26* (30), 5999-6008.
108. Barnes, C. P.; Smith, M. J.; Bowlin, G. L.; Sell, S. A.; Tang, T.; Matthews, J. A.; Simpson, D. G.; Nimitz, J. C., Feasibility of Electrospinning the Globular Proteins Hemoglobin and Myoglobin. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* **2006**, *1* (2), 155892500600100202.
109. Boland, E. D.; Matthews, J. A.; Pawlowski, K. J.; Simpson, D. G.; Wnek, G. E.; Bowlin, G. L., Electrospinning collagen and elastin: Preliminary vascular tissue engineering. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **2004**, *9*, 1422-1432.
110. Matthews, J. A.; Wnek, G. E.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L., Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (2), 232-238.
111. Buttafoco, L.; Kolkman, N. G.; Engbers-Buijtenhuijs, P.; Poot, A. A.; Dijkstra, P. J.; Vermes, I.; Feijen, J., Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials* **2006**, *27* (5), 724-734.
112. Hirota, N.; Goto, Y.; Mizuno, K., Cooperative  $\alpha$ -helix formation of  $\beta$ -lactoglobulin and melittin induced by hexafluoroisopropanol. *Protein Science* **1997**, *6* (2), 416-421.
113. Vasconcelos, A.; Gomes, A. C.; Cavaco-Paulo, A., Novel silk fibroin/elastin wound dressings. *Acta Biomaterialia* **2012**, *8* (8), 3049-3060.
114. Maghdouri-White, Y.; Bowlin, G. L.; Lemmon, C. A.; Dréau, D., Mammary epithelial cell adhesion, viability, and infiltration on blended or coated silk fibroin-collagen type I electrospun scaffolds. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, *43*, 37-44.
115. Ravichandran, R.; Seitz, V.; Reddy Venugopal, J.; Sridhar, R.; Sundarrajan, S.; Mukherjee, S.; Wintermantel, E.; Ramakrishna, S., Mimicking Native Extracellular Matrix with Phytic Acid-Crosslinked Protein Nanofibers for Cardiac Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience* **2013**, *13* (3), 366-375.
116. Patel, S.; Chaffotte, A. F.; Goubard, F.; Pauthe, E., Urea-induced sequential unfolding of fibronectin: a fluorescence spectroscopy and circular dichroism study. *Biochemistry* **2004**, *43* (6), 1724-35.
117. Hassan, N.; Barbosa, L. R.; Itri, R.; Ruso, J. M., Fibrinogen stability under surfactant interaction. *Journal of colloid and interface science* **2011**, *362* (1), 118-26.
118. Freire, E.; Coelho-Sampaio, T., Self-assembly of laminin induced by acidic pH. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (2), 817-22.
119. Loveday, S. M.; Wang, X. L.; Rao, M. A.; Anema, S. G.; Creamer, L. K.; Singh, H., Tuning the properties of  $\beta$ -lactoglobulin nanofibrils with pH, NaCl and CaCl<sub>2</sub>. *International Dairy Journal* **2010**, *20* (9), 571-579.
120. Inostroza-Brito, K. E.; Collin, E.; Siton-Mendelson, O.; Smith, K. H.; Monge-Marcet, A.; Ferreira, D. S.; Rodriguez, R. P.; Alonso, M.; Rodriguez-Cabello, J. C.; Reis, R. L.; Sagues, F.; Botto, L.; Bitton, R.; Azevedo, H. S.; Mata, A., Co-assembly, spatiotemporal control and morphogenesis of a hybrid protein-peptide system. *Nature Chemistry* **2015**, *7* (11), 897-904.
121. Takahashi, Y.; Ueno, A.; Mihara, H., Heterogeneous Assembly of Complementary Peptide Pairs into Amyloid Fibrils with  $\alpha$ - $\beta$  Structural Transition. *ChemBioChem* **2001**, *2* (1), 75-79.
122. Ridgley, D. M.; Claunch, E. C.; Lee, P. W.; Barone, J. R., The Role of Protein Hydrophobicity in Conformation Change and Self-Assembly into Large Amyloid Fibers. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (4), 1240-1247.

123. Ridgley, D. M.; Barone, J. R., Evolution of the Amyloid Fiber over Multiple Length Scales. *ACS Nano* **2013**, *7* (2), 1006-1015.
124. Ridgley, D. M.; Claunch, E. C.; Barone, J. R., The effect of processing on large, self-assembled amyloid fibers. *Soft Matter* **2012**, *8* (40), 10298-10306.
125. Sabokdast, M.; Ferdousi, M.; Habibi-Rezaei, M.; Balalaie, S.; Ramezanzpour, S.; Sabouni, F.; Poursasan, N.; Moosavi-Movahedi, A. A., Toxicity of serum albumin on microglia upon seeding effect of amyloid peptide. *The Journal of Biochemistry* **2016**, *160* (6), 325-332.
126. Hudalla, G. A.; Sun, T.; Gasiorowski, J. Z.; Han, H.; Tian, Y. F.; Chong, A. S.; Collier, J. H., Graded assembly of multiple proteins into supramolecular nanomaterials. *Nat Mater* **2014**, *13* (8), 829-36.
127. Wood, S. J.; Wypych, J.; Steavenson, S.; Louis, J. C.; Citron, M.; Biere, A. L., alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274* (28), 19509-12.
128. Conway, K. A.; Lee, S. J.; Rochet, J. C.; Ding, T. T.; Williamson, R. E.; Lansbury, P. T., Jr., Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97* (2), 571-6.
129. Liu, C. W.; Giasson, B. I.; Lewis, K. A.; Lee, V. M.; Demartino, G. N.; Thomas, P. J., A precipitating role for truncated alpha-synuclein and the proteasome in alpha-synuclein aggregation: implications for pathogenesis of Parkinson disease. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280* (24), 22670-8.
130. Murray, I. V. J.; Giasson, B. I.; Quinn, S. M.; Koppaka, V.; Axelsen, P. H.; Ischiropoulos, H.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y., Role of  $\alpha$ -Synuclein Carboxy-Terminus on Fibril Formation in Vitro. *Biochemistry* **2003**, *42* (28), 8530-8540.
131. Li, W.; West, N.; Colla, E.; Pletnikova, O.; Troncoso, J. C.; Marsh, L.; Dawson, T. M.; Jäkälä, P.; Hartmann, T.; Price, D. L.; Lee, M. K., Aggregation promoting C-terminal truncation of  $\alpha$ -synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102* (6), 2162-2167.
132. Horvath, I.; Wittung-Stafshede, P., Cross-talk between amyloidogenic proteins in type-2 diabetes and Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**, *113* (44), 12473-12477.
133. Horvath, I.; Rocha, S.; Wittung-Stafshede, P., In Vitro Analysis of alpha-Synuclein Amyloid Formation and Cross-Reactivity. *Methods in Molecular Biology* **2018**, *1779*, 73-83.
134. Bondarev, S. A.; Antonets, K. S.; Kajava, A. V.; Nizhnikov, A. A.; Zhouravleva, G. A., Protein Co-Aggregation Related to Amyloids: Methods of Investigation, Diversity, and Classification. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19* (8).
135. Dear, A. J.; Michaels, T. C. T.; Knowles, T. P. J., Dynamics of heteromolecular filament formation. *The Journal of Chemical Physics* **2016**, *145* (17), 175101.
136. Vitrenko, Y. A.; Gracheva, E. O.; Richmond, J. E.; Liebman, S. W., Visualization of aggregation of the Rnq1 prion domain and cross-seeding interactions with Sup35NM. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (3), 1779-87.
137. Sharma, J.; Liebman, S. W., Exploring the Basis of [PIN+] Variant Differences in [PSI+] Induction. *Journal of Molecular Biology* **2013**, *425* (17), 3046-3059.
138. Derkatch, I. L.; Uptain, S. M.; Outeiro, T. F.; Krishnan, R.; Lindquist, S. L.; Liebman, S. W., Effects of Q/N-rich, polyQ, and non-polyQ amyloids on the de novo

- formation of the [PSI<sup>+</sup>] prion in yeast and aggregation of Sup35 in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101* (35), 12934-12939.
139. Keefer, K. M.; Stein, K. C.; True, H. L., Heterologous prion-forming proteins interact to cross-seed aggregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1), 5853.
140. Arslan, F.; Hong, J. Y.; Kanneganti, V.; Park, S.-K.; Liebman, S. W., Heterologous Aggregates Promote De Novo Prion Appearance via More than One Mechanism. *PLOS Genetics* **2015**, *11* (1), e1004814.
141. Hammer, N. D.; Schmidt, J. C.; Chapman, M. R., The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104* (30), 12494-9.
142. Shu, Q.; Crick, S. L.; Pinkner, J. S.; Ford, B.; Hultgren, S. J.; Frieden, C., The E. coli CsgB nucleator of curli assembles to beta-sheet oligomers that alter the CsgA fibrillization mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109* (17), 6502-7.
143. Li, J.; McQuade, T.; Siemer, A. B.; Napetschnig, J.; Moriwaki, K.; Hsiao, Y. S.; Damko, E.; Moquin, D.; Walz, T.; McDermott, A.; Chan, F. K.; Wu, H., The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* **2012**, *150* (2), 339-50.
144. Blanco, L. P.; Evans, M. L.; Smith, D. R.; Badtke, M. P.; Chapman, M. R., Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends in Microbiology* **2012**, *20* (2), 66-73.
145. Barnhart, M. M.; Chapman, M. R., Curli biogenesis and function. *Annual review of microbiology* **2006**, *60*, 131-47.
146. Wright, C. F.; Teichmann, S. A.; Clarke, J.; Dobson, C. M., The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins. *Nature* **2005**, *438*, 878.
147. Oki, S.; Iwashita, K.; Kimura, M.; Kano, H.; Shiraki, K., Mechanism of co-aggregation in a protein mixture with small additives. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *107*, 1428-1437.
148. Underwood, S.; Afoke, A.; Brown, R. A.; MacLeod, A. J.; Dunnill, P., The physical properties of a fibrillar fibronectin-fibrinogen material with potential use in tissue engineering. *Bioprocess Eng.* **1999**, *20* (3), 239-248.
149. Keller, T. F.; Reichert, J.; Tam Pham, T.; Adjiski, R.; Spiess, L.; Berzina-Cimdina, L.; Jandt, K. D.; Bossert, J., Facets of protein assembly on nanostructured titanium oxide surfaces. *Acta Biomaterialia* **2013**, *9* (3), 5810-5820.
150. Reichert, J.; Wei, G.; Jandt, K. D., Formation and Topotactical Orientation of Fibrinogen Nanofibrils on Graphite Nanostructures. *Advanced Engineering Materials* **2009**, *11* (11), B177-B181.
151. Faghihi, S.; Hoffmann, T.; Petermann, J.; Martinezsalazar, J., Decoration of the Fold Surfaces of Polyethylene Single-Crystals with Tellurium and Tin. *Macromolecules* **1992**, *25* (9), 2509-2512.
152. Wittmann, J. C.; Lotz, B., Polymer Decoration - The Orientation of Polymer Folds as Revealed by the Crystallization of Polymer Vapors. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **1985**, *23* (1), 205-226.
153. Patil, R.; Reneker, D. H., Molecular Folds in Polyethylene Observed by Atomic-Force Microscopy. *Polymer* **1994**, *35* (9), 1909-1914.

154. Tunc, S.; Maitz, M. F.; Steiner, G.; Vazquez, L.; Pham, M. T.; Salzer, R., In situ conformational analysis of fibrinogen adsorbed on Si surfaces. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2005**, *42* (3-4), 219-225.
155. Tsapikouni, T. S.; Missirlis, Y. F., Protein-material interactions: From micro-to-nano scale. *Materials Science and Engineering B-Advanced Functional Solid-State Materials* **2008**, *152* (1-3), 2-7.
156. Roach, P.; Farrar, D.; Perry, C. C., Interpretation of protein adsorption: Surface-induced conformational changes. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (22), 8168-8173.
157. Mihalyi, E.; Tercero, J. C.; Diazmaurino, T., Clotting of Fibrinogen. 5. Changes in pH Associated with Clotting of Fibrinogen - Kinetic-Studies of the pH Shift and Correlation of the pH Change with the Release of Fibrinopeptides and the Ensuing Polymerization. *Biochemistry* **1991**, *30* (19), 4753-4762.
158. Cao, L.; Sukavaneshvar, S.; Ratner, B. D.; Horbett, T. A., Glow discharge plasma treatment of polyethylene tubing with tetraglyme results in ultralow fibrinogen adsorption and greatly reduced platelet adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006**, *79A* (4), 788-803.
159. Barrias, C. C.; Martins, C. L.; Miranda, C. S.; Barbosa, M. A., Adsorption of a therapeutic enzyme to self-assembled monolayers: effect of surface chemistry and solution pH on the amount and activity of adsorbed enzyme. *Biomaterials* **2005**, *26* (15), 2695-2704.
160. Weisel, J. W.; Medved, L., The structure and function of the alpha C domains of fibrinogen. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2001**, *936* (1), 312-327.
161. Steiner, G.; Tunc, S.; Maitz, M.; Salzer, R., Conformational changes during protein adsorption. FT-IR spectroscopic imaging of adsorbed fibrinogen layers. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (4), 1311-1316.
162. Sit, P. S.; Marchant, R. E., Surface-dependent conformations of human fibrinogen observed by atomic force microscopy under aqueous conditions. *Thrombosis and Haemostasis* **1999**, *82* (3), 1053-1060.
163. Tilton, R. D.; Gast, A. P.; Robertson, C. R., Surface-Diffusion of Interacting Proteins - Effect of Concentration on the Lateral Mobility of Adsorbed Bovine Serum-Albumin. *Biophysical Journal* **1990**, *58* (5), 1321-1326.
164. Langdon, B. B.; Kastantin, M.; Schwartz, D. K., Apparent Activation Energies Associated with Protein Dynamics on Hydrophobic and Hydrophilic Surfaces. *Biophysical Journal* **2012**, *102* (11), 2625-2633.
165. Sommerfeld, J.; Richter, J.; Niepelt, R.; Kosan, S.; Keller, T. F.; Jandt, K. D.; Ronning, C., Protein Adsorption on Nano-scaled, Rippled TiO<sub>2</sub> and Si Surfaces. *Biointerphases* **2012**, *7* (1-4).
166. Pandey, N. K.; Ghosh, S.; Dasgupta, S., Fructose restrains fibrillogenesis in human serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, *61*, 424-432.
167. Pandey, N. K.; Ghosh, S.; Dasgupta, S., Effect of surfactants on preformed fibrils of human serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, *59*, 39-45.
168. Juárez, J.; Taboada, P.; Mosquera, V., Existence of different structural intermediates on the fibrillation pathway of human serum albumin. *Biophysical Journal* **2009**, *96* (6), 2353-70.
169. Singh, S. M.; Cabello-Villegas, J.; Hutchings, R. L.; Mallela, K. M. G., Role of partial protein unfolding in alcohol-induced protein aggregation. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **2010**, *78* (12), 2625-2637.

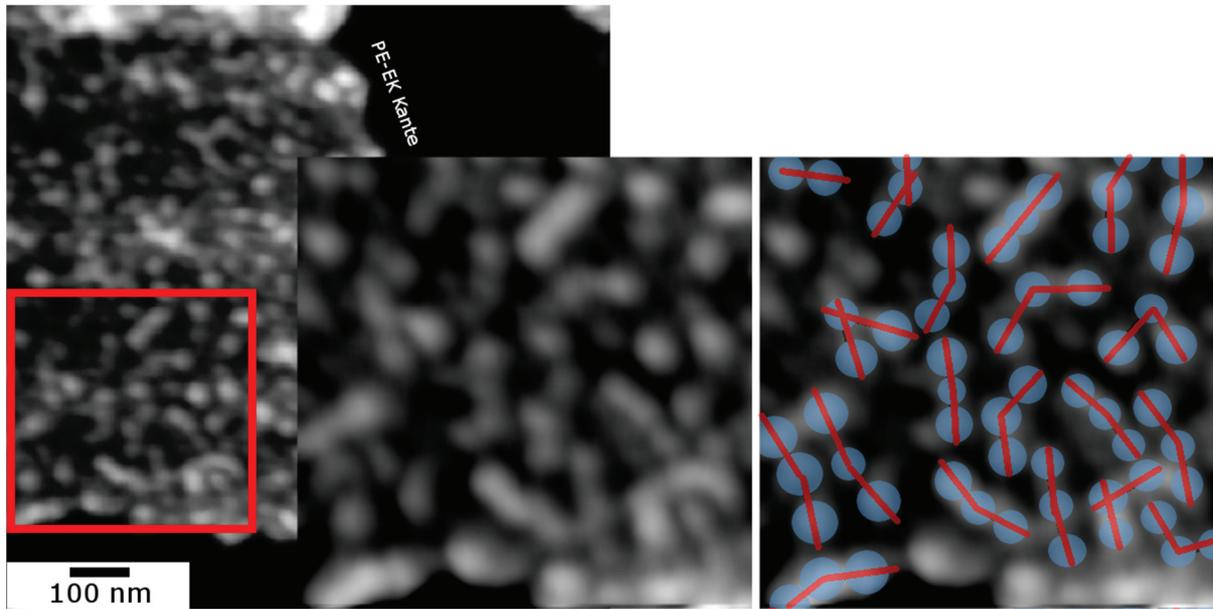
170. Kurouski, D.; Deckert-Gaudig, T.; Deckert, V.; Lednev, I. K., Structure and Composition of Insulin Fibril Surfaces Probed by TERS. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (32), 13323-13329.
171. Deckert-Gaudig, T.; Deckert, V., High resolution spectroscopy reveals fibrillation inhibition pathways of insulin. *Scientific Reports* **2016**, *6*.
172. Deckert-Gaudig, T.; Kaemmer, E.; Deckert, V., Tracking of nanoscale structural variations on a single amyloid fibril with tip-enhanced Raman scattering. *Journal of Biophotonics* **2012**, *5* (3), 215-219.
173. Deckert-Gaudig, T.; Kurouski, D.; Hedegaard, M. A. B.; Singh, P.; Lednev, I. K.; Deckert, V., Spatially resolved spectroscopic differentiation of hydrophilic and hydrophobic domains on individual insulin amyloid fibrils. *Scientific Reports* **2016**, *6*.
174. Pashaee, F.; Tabatabaei, M.; Caetano, F. A.; Ferguson, S. S. G.; Lagugne-Labarthe, F., Tip-enhanced Raman spectroscopy: plasmid-free vs. plasmid-embedded DNA. *Analyst* **2016**, *141* (11), 3251-3258.
175. Drescher, D.; Buechner, T.; McNaughton, D.; Kneipp, J., SERS reveals the specific interaction of silver and gold nanoparticles with hemoglobin and red blood cell components. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15* (15), 5364-5373.
176. Rygula, A.; Majzner, K.; Marzec, K. M.; Kaczor, A.; Pilarczyk, M.; Baranska, M., Raman spectroscopy of proteins: a review. *Journal of Raman Spectroscopy* **2013**, *44* (8), 1061-1076.
177. Wood, B. R.; Asghari-Khiavi, M.; Bailo, E.; McNaughton, D.; Deckert, V., Detection of Nano-Oxidation Sites on the Surface of Hemoglobin Crystals Using Tip-Enhanced Raman Scattering. *Nano Letters* **2012**, *12* (3), 1555-1560.
178. Ivanov, A.; Zhabankov, R.; Korolenko, E.; Korolik, E.; Meleshchenko, L.; Marchewka, M.; Ratajczak, H., Infrared and Raman spectroscopic studies of the structure of human serum albumin under various ligand loads. *Journal of Applied Spectroscopy* **1994**, *60* (5), 305-309.
179. Saha, A.; Yakovlev, V. V., Structural changes of human serum albumin in response to a low concentration of heavy ions. *Journal of Biophotonics* **2010**, *3* (10-11), 670-677.
180. Spiro, T. G., Biological Applications of Resonance Raman-Spectroscopy - Heme Proteins. *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* **1975**, *345* (1640), 89-105.
181. Spiro, T. G.; Streckas, T. C., Resonance Raman-Spectra of Heme Proteins - Effects of Oxidation and Spin State. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, *96* (2), 338-345.
182. Marzec, K. M.; Perez-Guaita, D.; de Veij, M.; McNaughton, D.; Baranska, M.; Dixon, M. W. A.; Tilley, L.; Wood, B. R., Red Blood Cells Polarize Green Laser Light Revealing Hemoglobin's Enhanced Non-Fundamental Raman Modes. *Chemphyschem* **2014**, *15* (18), 3963-3968.
183. Erickson, H. P., Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biological Procedures Online* **2009**, *11* (1), 32-51.
184. Boehme, R.; Mkandawire, M.; Krause-Buchholz, U.; Roesch, P.; Roedel, G.; Popp, J.; Deckert, V., Characterizing cytochrome c states - TERS studies of whole mitochondria. *Chemical Communications* **2011**, *47* (41), 11453-11455.
185. Griffiths, G.; Hoppeler, H., Quantitation in Immunocytochemistry - Correlation of Immunogold Labeling to Absolute Number of Membrane-Antigens. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1986**, *34* (11), 1389-1398.

186. D'Amico, F.; Skarmoutsou, E., Quantifying immunogold labelling in transmission electron microscopy. *Journal of Microscopy* **2008**, *230* (1), 9-15.
187. Goda, S.; Takano, K.; Yamagata, Y.; Nagata, R.; Akutsu, H.; Maki, S.; Namba, K.; Yutani, K., Amyloid protofilament formation of hen egg lysozyme in highly concentrated ethanol solution. *Protein Science* **2000**, *9* (2), 369-375.
188. Mondal, S.; Adler-Abramovich, L.; Lampel, A.; Bram, Y.; Lipstman, S.; Gazit, E., Formation of functional super-helical assemblies by constrained single heptad repeat. *Nature Communications* **2015**, *6*.
189. Wright, A. K.; Thompson, M. R., Hydrodynamic Structure of Bovine Serum-Albumin Determined by Transient Electric Birefringence. *Biophysical Journal* **1975**, *15* (2), 137-141.
190. Streets, A. M.; Sourigues, Y.; Kopito, R. R.; Melki, R.; Quake, S. R., Simultaneous measurement of amyloid fibril formation by dynamic light scattering and fluorescence reveals complex aggregation kinetics. *PloS one* **2013**, *8* (1), e54541-e54541.
191. Guenther, E. L.; Cao, Q.; Trinh, H.; Lu, J.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Boyer, D. R.; Rodriguez, J. A.; Hughes, M. P.; Eisenberg, D. S., Atomic structures of TDP-43 LCD segments and insights into reversible or pathogenic aggregation. *Nature Structural & Molecular Biology* **2018**, *25* (6), 463-471.
192. Hughes, M. P.; Sawaya, M. R.; Boyer, D. R.; Goldschmidt, L.; Rodriguez, J. A.; Cascio, D.; Chong, L.; Gonen, T.; Eisenberg, D. S., Atomic structures of low-complexity protein segments reveal kinked  $\beta$  sheets that assemble networks. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2018**, *359* (6376), 698-701.
193. Hynes, R. O., *Fibronectins*. Springer Science & Business Media: 2012.
194. Boughton, B. J.; Simpson, A. W., The biochemical and functional heterogeneity of circulating human plasma fibronectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1984**, *119* (3), 1174-80.
195. Wasilewska, M.; Adamczyk, Z.; Jachimska, B., Structure of Fibrinogen in Electrolyte Solutions Derived from Dynamic Light Scattering (DLS) and Viscosity Measurements. *Langmuir* **2009**, *25* (6), 3698-3704.
196. Guo, S.; Zhu, X.; Janczewski, D.; Lee, S. S. C.; He, T.; Teo, S. L. M.; Vancso, G. J., Measuring protein isoelectric points by AFM-based force spectroscopy using trace amounts of sample. *Nature nanotechnology* **2016**, *11* (9), 817-823.
197. Singh, P.; Carraher, C.; Schwarzbauer, J. E., Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2010**, *26*, 397-419.
198. Harding, S. I.; Underwood, S.; Brown, R. A.; Dunnill, P., Assessment of cell alignment by fibronectin multi-fibre cables capable of large scale production. *Bioprocess Eng.* **2000**, *22* (2), 0159-0164.
199. Drescher, D.; Buchner, T.; McNaughton, D.; Kneipp, J., SERS Reveals the Specific Interaction of Silver and Gold Nanoparticles with Hemoglobin and Red Blood Cell Components. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (15), 5364-5373.

# A. Anhang

**Tabelle A 1:** Abschwächungskoeffizienten verschiedener Plasmaproteine

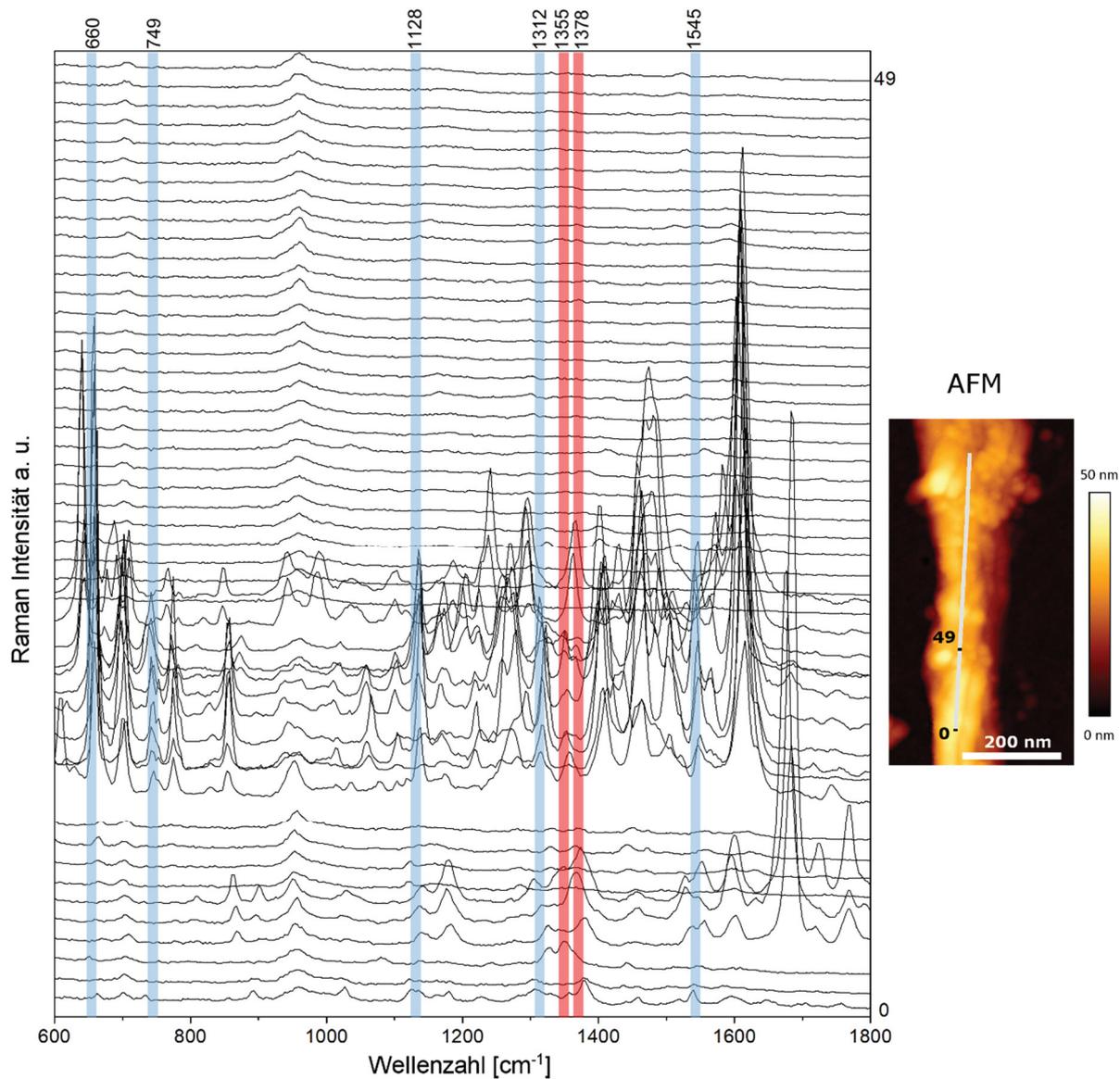
Protein	$\epsilon_{280\text{ nm}}$ für 1 mg/ml bei 1 cm Strahlengang
Serum Albumin	0,53
Hämoglobin	0,65
Fibrinogen	1,51
Fibronektin	1,40



**Abbildung A 1:** AFM-Höhenbild einer PE-EK-Oberfläche nach der HPF-Adsorption ( $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) aus CPL-Lösung ( $\text{pH} = 9,2$ ). Auf der PE-EK-Oberfläche wurden trinodulär-stabförmige HPF-Strukturen und kugelförmige HPF-Strukturen beobachtet. Der Einschub rechts zeigt eine Vergrößerung des markierten Bereichs ohne und mit einer Überlagerung, die die trinodulär-stabförmigen HPF-Strukturen und deren Ausrichtung hervorhebt.

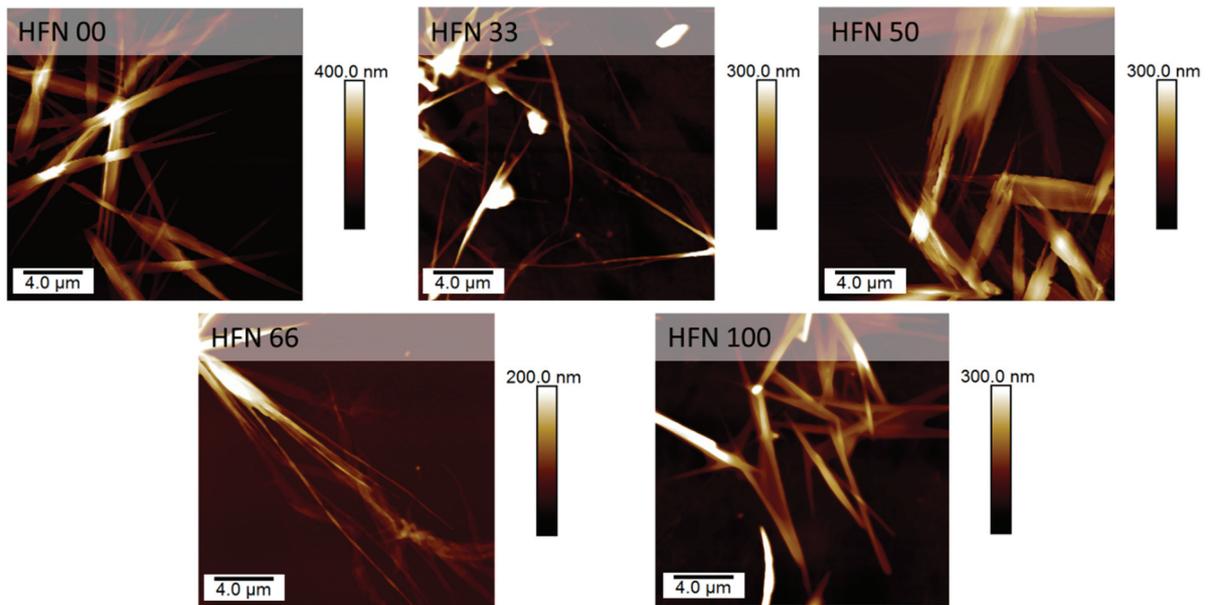
**Tabelle A 2:** Charakteristische Raman-Banden von Porphyrin und ihre entsprechenden Zuordnungen.  
 Abkürzungen:  $\nu$ , Valenzschwingung;  $\delta$ , Deformationsschwingung

Ramanverschiebung [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Lokale Position und Zuordnung	Referenz
660	$\delta(\text{pyrrol})_{\text{symmetric}}, \nu_7$	199
749	$\nu(\text{pyrrol breathing}), \nu_{15}$	199, 176
1128	$\nu(\text{C}_\alpha\text{N}), \nu_{22}$	199, 176
1312	$\nu(\text{C}_\alpha\text{C}_\beta), \nu_{21}$	199, 176
1355	$\text{Fe}^{2+}, \nu(\text{pyrrol half-ring})_{\text{symmetric}}, \nu_4$	176, 177
1378	$\text{Fe}^{3+}, \nu(\text{pyrrol half-ring})_{\text{symmetric}}, \nu_4$	176, 177
1545	$\nu(\text{C}_\beta\text{C}_\beta), \nu_{11}$	199



**Abbildung A 2:** TERS Charakterisierung von HSA-HGB-hPNF: TERS-Spektren, die entlang der markierten Linie im AFM-Höhenbild der HSA-HGB-hPNF von Position 0 bis 49 (Schrittweite: 2,5 nm; Anregung bei 532 nm, Laserleistung 360  $\mu$ W, Erfassungszeit 1 s) gesammelt wurden. In den gezeigten Spektren sind die entsprechenden Markerbanden für Porphyrin (660  $\text{cm}^{-1}$ , 749  $\text{cm}^{-1}$ , 1128  $\text{cm}^{-1}$ , 1312  $\text{cm}^{-1}$ , 1545  $\text{cm}^{-1}$ ) blau und für  $\text{Fe}^{2+}$  (1355  $\text{cm}^{-1}$ ) und  $\text{Fe}^{3+}$  (1378  $\text{cm}^{-1}$ ) rot markiert.





**Abbildung A 4:** Repräsentative AFM-Höhenbilder von homogenen und heterogenen PNF hergestellt aus HFN und/oder HPF. Die Fasern wurden mittels Selbstassemblierung in 80 Vol.% Ethanol bei 37°C über 4 Stunden hergestellt. Die Nummer hinter HFN gibt dessen prozentualen Anteil im Proteingemisch der Ausgangslösung an.

# Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise entgeltlich/unentgeltlich geholfen:

1. Robert Stößel geborener Schulze (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Otto-Schott-Institut für Materialforschung) HPF-adsorption aus CPL auf PE-EK im Rahmen einer Studienarbeit
2. Dominik A. Hering (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Otto-Schott-Institut für Materialforschung) HPF-adsorption aus PBS auf PE-EK im Rahmen einer Masterarbeit
3. Dr. Christoph Wiedemann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abteilung Naturbiostoffe) CD-Messungen von HSA, HGB und HSA-HGB
4. Dr. Tanja Deckert-Gaudig (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für physikalische Chemie) TERS-Messungen an HSA- und HSA-HGB-hPNF
5. M.Sc. Karl Scheuer (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Otto-Schott-Institut für Materialforschung) Herstellung und Charakterisierung der HFN-HPF-PNF, Stabilitätstests und Immunogold-Markierung der HFN-HPF-PNF im Rahmen einer Masterarbeit

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die geltende Promotionsordnung der Physikalisch-Astronomischen Fakultät ist mir bekannt.

Ich versichere ehrenwörtlich, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Jena, November 2019

Christian Helbing