

**Muschel-inspirierte Polymerisation: Synthetische Bioadhäsive  
für wasserbasierte Klebstoffe und meerwasserresistente  
Beschichtungen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Chem. Justus Horsch

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen:   1. Prof. Dr. Hans G. Börner  
                          2. Prof. Dr. Dorothea Fiedler  
                          3. Prof. Dr. Andreas Fery

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2019

DOI: [10.18452/21026](https://doi.org/10.18452/21026)

## Abstract

Bio-inspiration is a useful strategy for the development of novel materials that go beyond the existing standards and potentially pave the way for new technologies. Marine mussels provide such an inspiration for the next generation of purpose adapted water-based, wet adhesives. Adhesive mussel foot proteins (mfps) enable them to attach to virtually any surface and exhibit remarkable properties, notably due to the amino acid derivative 3,4-dihydroxyphenylalanine (Dopa), allowing them to endure in a hostile and turbulent ocean environment. Since the influence of water and humidity still constitutes a major technological challenge for gluing applications and large-scale production and purification of adhesive proteins is time-consuming and costly, an easy access route toward biomimetic adhesives is of high interest.

This thesis investigates a novel mussel-inspired polymerization approach for the production of adhesive protein analogues from oligopeptides (unimers). These unimers are derived from a decapeptide sequence, which is found in the *Mytilus edulis* foot protein-1 (*Mefp-1*) in a repetitive manner. The polymerization mechanism exploits a distinct reaction pathway, occurring in mfps, resulting in cross-linking to modulate cohesion. It is shown that polymerization of the unimers relies on enzyme-mediated oxidation of tyrosine to Dopaoquinone, which rapidly forms cysteinyl-dopa with free thiols from cysteine, thereby linking unimers and generating adhesive moieties. Within a few minutes high molecular weight polymers are obtained that show versatile, robust adsorption and strong adhesion behaviour. The protein analogues exhibit significant multilayer adsorption onto hydrophilic alumina and silica surfaces as well as hydrophobic fluoropolymer surfaces and resist rinsing with highly saline NaCl seawater model solution and hypersaline dead sea water model solution with negligible losses in adsorbed mass. Comparative adhesion studies on silica reveal adhesion energies that are in the same range as commercial mussel foot protein extracts and even exceed reported values for isolated foot proteins that constitute the gluing interfaces. The approach offers facile access toward artificial mussel foot proteins that are capable of mimicking aspects of the natural ideal and potentially helps to develop next-generation universal water resistant glues.

In order to further improve the conditions regarding cost-efficient and large-scale production in the future, alternative synthesis routes for the enzyme-free generation of mussel-inspired polymers based on chemical oxidation of Dopa containing unimers are additionally explored.

## Kurzzusammenfassung

Bio-inspiration ist eine nützliche Strategie für die Entwicklung neuartiger Materialien, die den Weg für fortschrittliche Technologien ebnen. So inspirieren Miesmuscheln zur nächsten Generation von wasserbasierten Nassklebstoffen. Adhäsive Muschelfußproteine (mfps) ermöglichen es den Muscheln, sich an praktisch jede Oberfläche zu haften. Diese bemerkenswerten Eigenschaften, die insbesondere durch das Aminosäurederivat 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) verursacht werden, erlauben es ihnen in einer feindlichen und turbulenten Meeresumgebung zu bestehen. Da der Einfluss von Wasser und Feuchtigkeit nach wie vor eine große technologische Herausforderung für Klebeanwendungen darstellt und die großtechnische Herstellung und Reinigung von Klebproteinen viel Zeit und Kosten erfordert, ist ein einfacher Zugang zu biomimetischen Klebstoffen von großem Interesse.

Die vorliegende Arbeit untersucht einen neuartigen Muschel-inspirierten Polymerisationsansatz zur Herstellung von adhäsiven Proteinanaloga aus Oligopeptiden (Unimere). Die Unimere werden von einer Decapeptidsequenz abgeleitet, die im *Mytilus edulis* Fußprotein-1 (*Mefp-1*) in wiederholter Form vorkommt. Der Polymerisationsmechanismus nutzt einen Reaktionsweg, der in Muschelproteinen zu einer Vernetzung führt, um die Kohäsion zu steuern. Die Polymerisation der Unimere beruht auf einer enzymatischen Oxidation von Tyrosin zu Dopachinon, das mit freien Thiolen aus Cystein Cysteinyl-dopa bildet, wodurch Unimere verknüpft und adhäsive Funktionalitäten erzeugt werden. Innerhalb weniger Minuten entstehen hochmolekulare Polymere, die ein vielseitiges, robustes Adsorptions- und starkes Adhäsionsverhalten demonstrieren. Die Proteinanaloga weisen eine signifikante Multischicht-Adsorption auf hydrophilen  $\text{Al}_2\text{O}_3$ - und  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen sowie hydrophoben Fluorpolymer-Oberflächen auf. Zudem zeigen sie einen vernachlässigbaren Massenverlust bei Spülschritten mit hochkonzentrierter NaCl-Meerwassermodell-Lösung sowie hypersaliner Modell-Lösung für Totes Meer Wasser. Die beobachteten Adhäsionsenergien liegen im Bereich von kommerziellen mfp-Extrakten und überschreiten sogar die berichteten Werte für isolierte Fußproteine, welche die Klebegrenzfläche ausmachen. Der präsentierte Ansatz bietet einen einfachen Zugang zu künstlichen mfp-Analoga, die in der Lage sind Aspekte des natürlichen Vorbilds nachzuahmen und potenziell zur Entwicklung von wasserresistenten Universalklebstoffen beitragen.

Um die Bedingungen für eine kostengünstige und großtechnische Produktion zu verbessern, werden zusätzlich alternative Synthesewege für die enzymfreie Herstellung Muschel-inspirierter Polymere untersucht, die auf der chemischen Oxidation von Dopa-haltigen Unimere beruhen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract</b> .....	<b>i</b>
<b>Kurzzusammenfassung</b> .....	<b>ii</b>
<b>1 Motivation und Zielsetzung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Theoretischer Hintergrund</b> .....	<b>3</b>
2.1 Klebstoffe.....	3
2.2 Wechselwirkungen von Klebstoffen .....	8
2.3 Einfluss von Wasser auf Klebstoffe.....	11
2.4 Biologische Unterwasserklebstoffe.....	15
2.5 Aufbau und Funktionsweise des Klebesystems der Miesmuschel .....	17
2.6 Muschel-inspirierte Materialien .....	24
<b>3 Zielstellung</b> .....	<b>30</b>
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>31</b>
4.1 Studien zur enzymatischen Aktivierbarkeit von Unimeren .....	31
4.1.1 <i>Position der Cysteinerweiterung</i> .....	31
4.1.2 <i>Länge des Glycin-Spacers</i> .....	33
4.1.3 <i>Einfluss der Tyrosinase</i> .....	35
4.1.4 <i>Aktivierung der Unimere <math>U_1^C</math> und <math>U_2^C</math></i> .....	38
4.1.5 <i>Teilzusammenfassung</i> .....	41
4.2 Untersuchungen am Modellsystem .....	42
4.2.1 <i>Kinetische Messungen der Aktivierung und Verknüpfung</i> .....	42
4.2.2 <i>Untersuchung der Verknüpfungsreaktion</i> .....	45
4.2.3 <i>Teilzusammenfassung</i> .....	49
4.3 Untersuchung der Polymerisation .....	51
4.3.1 <i>Polymerisationsgrad</i> .....	51
4.3.2 <i>Bestimmung des Thiolverbrauchs</i> .....	54
4.3.3 <i>Polymerisationsmechanismus</i> .....	57

4.3.4	<i>Teilzusammenfassung</i> .....	58
4.4	Adsorptionsstudien.....	60
4.4.1	<i>Oberflächenabhängige Adsorption</i> .....	60
4.4.2	<i>Stabilität der Beschichtungen</i> .....	65
4.4.3	<i>pH-abhängige Adsorption</i> .....	69
4.4.4	<i>Teilzusammenfassung</i> .....	72
4.5	Adhäsionsstudien.....	75
4.5.1	<i>Adhäsion von Muschel-inspirierten Polymeren</i> .....	75
4.5.2	<i>Adhäsion von kommerziellen Muschelfußextrakten</i> .....	78
4.5.3	<i>Teilzusammenfassung</i> .....	80
4.6	Nicht-enzymatische Polymerisationsmethoden.....	81
4.6.1	<i>Chemische Oxidation</i> .....	81
4.6.2	<i>Thiolacton maskierte Unimere</i> .....	86
4.6.3	<i>Unimere mit photolabiler Schutzgruppe</i> .....	91
4.6.4	<i>Teilzusammenfassung</i> .....	96
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>101</b>
6.1	Materialien.....	101
6.2	Lösungen und Puffer.....	103
6.3	Messgeräte.....	104
6.4	Methoden.....	108
6.4.1	<i>Peptidsynthese</i> .....	108
6.4.2	<i>Herstellung von AbPPO<sub>4</sub> Tyrosinase</i> .....	109
6.4.3	<i>Tyrosinase Aktivitätsassay</i> .....	110
6.4.4	<i>Enzymatische Unimer-Aktivierung und Polymerisation (allgemeine Arbeitsvorschrift - AAV4/AAV5)</i> .....	111
6.4.5	<i>SDS PAGE Messungen</i> .....	111
6.4.6	<i>QCM-D-Messungen</i> .....	111
6.4.7	<i>CP-AFM-Messungen</i> .....	114

6.5 Synthesen und Charakterisierung.....	119
6.5.1 $U_1^C$ – AKPSSPPTYKGGGC.....	119
6.5.2 $U_2^C$ – AKPSYPPTYKGGGC.....	120
6.5.3 $U_{G2}^C$ – AKPSYPPTYKGGC.....	122
6.5.4 $U_1^S$ – AKPSSPPTYKGGGS.....	123
6.5.5 $U_{1N}^C$ – PTF <sup>NO2</sup> KGGGC.....	125
6.5.6 $U_{R2}^N$ – CGGARPSYPPTYR.....	126
6.5.7 $U_{R2}^C$ – ARPSYPPTYRGGC.....	128
6.5.8 $U_1^{*C}$ – AKPSSPPTY*KGGGC.....	129
6.5.9 $U_2^{*C}$ – AKPSY*PPTY*KGGGC.....	131
6.5.10 $U_1^{*S}$ – AKPSSPPTY*KGGGS.....	132
6.5.11 $U_{S1}^{*Tla}$ – Tla-ASPSSPPTY*S.....	134
6.5.12 $U_{R1}^{*Tla}$ – Tla-ARPSSPPTY*R.....	135
6.5.13 $U_{PEG1}^{*Tla}$ – Tla-N-succinyl-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin-Y*.....	137
6.5.14 Fmoc-Cys(oNv)-OH.....	139
6.5.15 $U_1^{*oNv}$ – AKPSSPPTY*KGGGC(oNv).....	141
6.6 Experimentelle Daten .....	143
6.6.1 Kinetische HPLC-Messungen der Aktivierung von $U_1^S$ .....	143
6.6.2 Kinetische HPLC-Messungen der Dimerisierungsreaktion von $U_1^S$ und $U_{1N}^C$ .....	146
6.6.3 Kinetische HPLC-Messungen zur $U_{1N}^C$ - $U_{1N}^C$ Disulfidbildung.....	148
6.6.4 MALDI-TOF-MS/MS-Messungen des Modell-Dimers.....	148
6.6.5 LC-ESI-MS/MS-Messungen zur Verknüpfung von $U_1^S$ .....	151
6.6.6 SDS PAGE Referenz zum Zeitpunkt Null.....	154
6.6.7 GPC-Messung von Poly $U_1^C$ .....	155
6.6.8 UV/VIS-spektroskopische Bestimmung des Thiolverbrauchs mit Ellmans Reagenz.....	156
6.6.9 MALDI-TOF MS/MS-Messungen der Polymerisationsmischung.....	158
6.6.10 QCM-D-Adsorptionskinetiken auf Aluminiumoxidoberflächen.....	160
6.6.11 QCM-D-Adsorptionskinetiken auf Fluoropolymer-Oberflächen.....	165
6.6.12 QCM-D-Adsorptionskinetiken auf SiO <sub>2</sub> -Oberflächen.....	168
6.6.13 CP-AFM-Messungen der Polymerbeschichtungen und Cell-Tak™ Referenz.....	176
6.6.14 Kinetische HPLC-Messungen der NaIO <sub>4</sub> -Oxidation von $U_1^{*S}$ .....	178
6.6.15 UPLC-ESI-MS-Messung der NaIO <sub>4</sub> -Oxidation von $U_{1N}^C$ .....	180

6.6.16 Kinetische HPLC-Messungen der Dimerisierungsreaktion von $U_{1^S}$ und $U_{1N^C}$ .....	182
6.6.17 UPLC-ESI-MS-Messungen der Dimerisierungsreaktion von $U_{1^S}$ und $U_{1N^C}$ .....	184
6.6.18 UPLC-ESI-MS-Messungen der Oxidation von $U_{SI^{Tla}}$ und $U_{RI^{Tla}}$ .....	185
6.6.19 UPLC-ESI-MS-Messungen der Oxidation von $U_{PEGI^{Tla}}$ .....	187
6.6.20 UPLC-ESI-MS-Messungen der Aminolyse von $U_{SI^{Tla}}$ .....	190
6.6.21 UPLC-ESI-MS-Messungen der Aminolyse von $U_{PEGI^{Tla}}$ .....	192
6.6.22 UPLC-ESI-MS-Messung der Oxidation von $U_{1^{oNv}}$ .....	194
6.6.23 Kinetische UPLC-ESI-MS-Messungen der Photolyse von $U_{1^{oNv}}$ in einem Acetonitril- Wasser-Gemisch .....	196
6.6.24 Kinetische UPLC-ESI-MS-Messungen der Photolyse von $U_{1^{oNv}}$ in Wasser .....	198
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>202</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>205</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>219</b>
<b>Publikationsliste</b> .....	<b>221</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>223</b>

# 1 Motivation und Zielsetzung

Beständige Klebeverbindungen zwischen Metallen, Mineralien oder anderen Materialien und organischen Polymeren in Gegenwart von Feuchtigkeit zu ermöglichen, ist eine große technologische Herausforderung.<sup>1</sup> Im Gegensatz dazu finden sich in der Natur zahlreiche Organismen, die scheinbar mit Leichtigkeit Haftung in feuchter Umgebung oder sogar unter Wasser realisieren.<sup>2</sup> Dazu gehört auch die Miesmuschel, die in der Gezeitenzone der Meere und Ozeane unter den widrigen Bedingungen von Wind, Wellen und Salzwasser lebt und sich dazu an Felsen oder andere Oberflächen haftet.<sup>3</sup> Das bewerkstelligt sie mit Hilfe von adhäsiven Proteinen, die unter anderem die modifizierte Aminosäure L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) enthalten. Die sogenannten Muschelfußproteine stellen somit aussichtsreiche Kandidaten für die Entwicklung neuartiger wasserbasierter Nassklebstoffe dar. Diese würden nicht nur Klebungen unter Wasser, wie beispielsweise für Leckabdichtungen oder das Anbringen von Sensoren oder Signalleuchten, ermöglichen, sondern auch die Wasserresistenz von Klebungen für Außenanwendungen und andere Einsatzgebiete mit Feuchtigkeitsbeanspruchung erhöhen.<sup>4</sup> Darüber hinaus machen Nassklebstoffe aufwendige und kostspielige Oberflächenvorbehandlungen und den Einsatz von Haftvermittlern, die zur Optimierung der Wasserresistenz von Klebungen bei industriellen Verfahren angewandt werden, überflüssig. Muschelfußproteine sind zudem nicht-toxisch, bioabbaubar und weisen geringe immunogene Wirkung auf, wodurch sie äußerst attraktiv für den Einsatz in Medizin, Industrie und Umwelt sind.<sup>5</sup> Aufgrund der zu erwartenden rasanten Entwicklung der Bevölkerungszahlen steigt zusätzlich die Nachfrage nach ökologisch unbedenklichen Polymeren bzw. Klebstoffen, die in der Lage sind bestehende Entsorgungs- und Abfallprobleme zu entschärfen.<sup>6</sup>

Für die Extraktion von einem Gramm Muschelfußprotein sind jedoch ca. 10 000 Muscheln erforderlich, sodass der direkte Einsatz dieser Klebstoffe für kommerzielle Anwendungen überaus schwierig ist.<sup>7</sup> Daher haben grundlegende Untersuchungen der Muschelfußproteine zu bioinspirierten synthetischen Adhäsiven geführt, die in erster Linie auf Dopa als Funktionalität zur Verbesserung der Klebkraft und Haltbarkeit der Polymerverbindung unter Wassereinwirkung beruhen. Dadurch konnten bereits vielfältige Anwendungen realisiert werden, zu denen adhäsive Beschichtungen<sup>8-10</sup>, Antifouling Beschichtungen<sup>11-15</sup>, biomedizinische Gewebekleber<sup>16-21</sup>, Materialien für reversible Adhäsion<sup>22,23</sup>, selbstheilende Hydrogele<sup>24,25</sup> sowie Funktionalisierung und Stabilisierung von Nanopartikeln<sup>26-30</sup> gehören. Byssusproteine sind synthetischen Polymeren hinsichtlich Adaptivität und Adhäsionskraft jedoch noch immer überlegen. Nicht zuletzt weil biologische Attribute durch

spezifische und sich ändernde Herausforderungen über einen sehr langen Zeitraum weiterentwickelt wurden, die bei vereinfachten bio-inspirierten Polymeren außer Acht gelassen werden. Demnach ließen sich die synthetischen Ansätze verbessern, indem Beiträge anderer natürlicher funktioneller Gruppen einbezogen und die Art der Protein- bzw. Byssusstruktur berücksichtigt werden.<sup>31</sup> Studien zu dem Thema konnten bereits zeigen, dass Wechselwirkungen von hydrophoben Resten,<sup>32</sup> elektrostatische Wechselwirkungen von positiv geladenen Resten<sup>33,34</sup> und Kation- $\pi$  Wechselwirkungen<sup>35,36</sup> von Peptiden und Proteinen zur Adhäsion beitragen.

Rekombinante Muschelfußproteine würden diesen Ansprüchen gerecht werden, allerdings führt deren geringe Effizienz bei der Modifikation von Aminosäureresten, insbesondere bei Tyrosin, zu schwachen adhäsiven Eigenschaften.<sup>37,38</sup> Bei Peptiden als Muschelfußproteinanaloga hingegen konnten die Modifikationen zum Teil<sup>39</sup> oder vollständig<sup>40</sup> reproduziert werden. Sie weisen jedoch geringe Molekulargewichte im Vergleich zu den natürlichen Proteinen auf, wodurch eine starke Kohäsionsfestigkeit verhindert und die Anwendung limitiert wird.

Diese Arbeit zielt darauf ab die Vorteile der einfachen Synthese von synthetischen bio-inspirierten Polymeren mit der Komplexität und funktionellen Vielseitigkeit der Proteine zu vereinen. Dafür soll ein enzymatisches Polymerisationsverfahren entwickelt werden, das kurze Oligopeptide zu langen Polymeren verknüpft und simultan adhäsive Dopa-Funktionalitäten bildet. Dadurch sollen Muschelfußproteinanaloga entstehen, deren Eigenschaften den natürlichen Vorbildern ähnlich sind und somit als wasserbasierte adhäsive Beschichtungen oder Klebstoffe in wässriger Umgebung eingesetzt werden können.

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Klebstoffe

Klebstoffe begleiten die Menschheit schon eine lange Zeit und sind jeher ein wichtiges technisches Mittel zur Verbindung von Materialien. Die ersten Anwendungen von Klebstoffen reichen über 200 000 Jahre zurück, als mit Bitumen,<sup>41</sup> Pech oder Teer aus pyrolysierte Birkenrinde<sup>42,43</sup> Werkzeuge und Waffen gebaut bzw. veredelt wurden. Birkenrindenteer wurde gezielt aus natürlichen Rohstoffen teilsynthetisch hergestellt, um die klebrigen Eigenschaften für sich zu nutzen. Erst sehr viel später gelang die Herstellung des ersten vollsynthetischen Kunst- und Klebstoffs Bakelit,<sup>44,45</sup> der zu Beginn des 20. Jahrhunderts den Impuls zur Entwicklung der modernen Klebstoffindustrie gab. Heute werden zahlreiche synthetische Polymere als Klebstoffe eingesetzt, die aus jedem erdenklichen Anwendungsbereichen unseres Lebens wie der Automobilindustrie, Luft- und Raumfahrt, Eisenbahnindustrie, Schiffsindustrie, Bauwesen, Elektronik, Holz- und Papierverarbeitung, Textilindustrie, im Haushalt oder auch in der Medizin nicht mehr wegzudenken sind.<sup>46</sup>

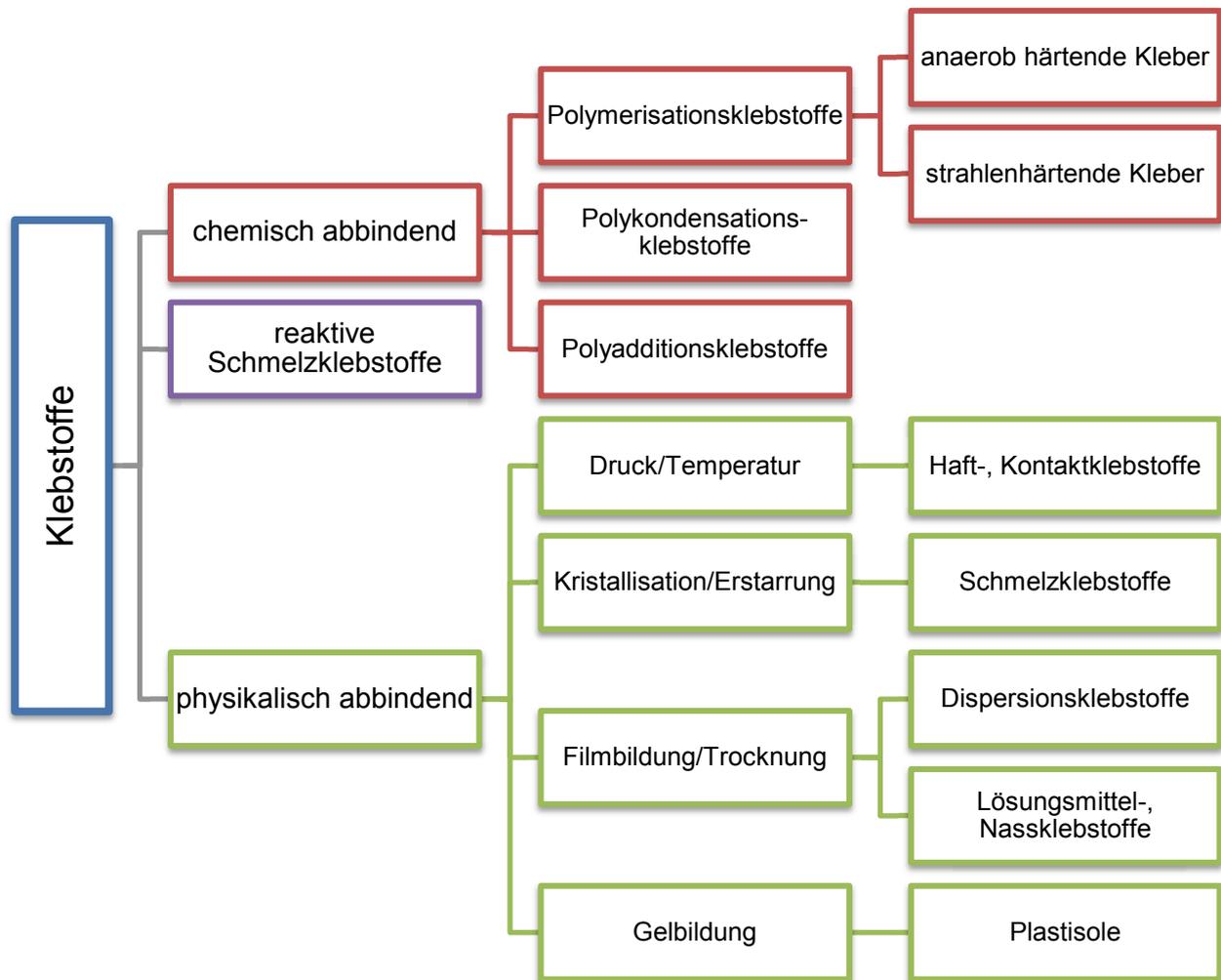
Im verfahrenstechnischen Sinn stellt Kleben als Fügetechnik eine der sechs Hauptgruppen der Fertigungsverfahren dar, mit dem Ziel Werkstücke zu verbinden.<sup>47</sup> Neben dem Kleben sind mit Zusammensetzen (Einfügen), Füllen, An- und Einpressen (Schrumpfen), Umformen (Ausgießen, Umgießen mit Kunststoff), Umformen (Nieten, Bördeln, Clinchen), Schweißen, Lötten und textilen Fügen weitere Formen des Fügens bekannt.<sup>47</sup> Diese lassen sich in die Kategorien der kraft- und formschlüssigen Verbindungsverfahren, bei denen die Fügeteile durch definierte Formgebung verbunden werden, und der stoffschlüssigen Verfahren, bei denen die Verbindung durch atomare und molekulare Wechselwirkungen bei Schmelz-, Diffusions- oder Benetzungsvorgängen erzeugt werden, einteilen. Kleben gehört zu Letzterem und birgt verschiedene Vorteile gegenüber den anderen Verfahren. Viele Vorteile lassen sich auf die geringen Temperaturen zurückführen, bei denen Klebungen realisiert werden können. So treten beim Kleben im Vergleich zum Schweißen oder Lötten keine thermische Gefügebeeinflussung und kein thermisch bedingter Bauteilverzug auf, die zur Festigkeitsverringerng des Fügeteils führen können. Weiterhin können sehr wärmeempfindliche Werkstoffe wie Kunststoffe oder Elektronikbauteile durch das Verkleben miteinander verbunden werden. Die besondere mechanische und physikalische Beschaffenheit der Klebeverbindung ermöglicht eine gleichmäßige Spannungsverteilung senkrecht zur Belastungsrichtung, eine hohe dynamische Festigkeit durch elastische Deformation, die auch zu einer besseren

Schwingungsdämpfung beiträgt. Darüber hinaus kann die isolierende Wirkung der Klebeschicht als Dielektrikum beim Fügen von Metallen unterschiedlicher elektrochemischer Eigenschaften z.B. bei der Herstellung von Metallschichtverbunden für Transformatoren oder Magnetkernen genutzt werden. Eine Klebung kann zudem nahezu materialunabhängig erfolgen und metallische und nichtmetallische, oder natürliche und künstliche Werkstoffe verbinden. Ebenfalls stellt Kleben die wirksamste Art dar sehr dünne Fügeile, wie z.B. Folien zu verbinden, was besonders bei der Leichtbauweise von Flug- oder Fahrzeugen oder auch für Verpackungen Vorteile bringt.

Natürlich birgt Kleben nicht nur Vorteile gegenüber den anderen Fügeverfahren. Der Vorgang ist zum Teil sehr aufwändig, da die einzelnen Prozesse der Oberflächenvorbehandlung, der Klebstoffmischung, des Klebstoffauftrags, ggf. die Fügeilefixierung sowie die Klebstoffaushärtung bei definierter Zeit, Temperatur und Druck genau aufeinander abgestimmt und kontrolliert werden müssen. In Hinsicht auf Reparatur und Demontage erweisen sich Klebungen ebenfalls teilweise als nachteilig. Die Beseitigung von Schäden an Klebungen erfordert die Einhaltung der gleichen Prozessparameter wie bei der Herstellung, was oftmals nicht realisiert werden kann. Zudem ist eine Beseitigung oder ein Recyceln von verbundenen Werkstoffen aus verschiedenen Materialien aufwändiger als bei mechanischen Verfahren. Da die meisten Klebeverbindungen auf organischen Polymeren beruhen, können sie mit der umgebenden Atmosphäre oder mit eindiffundierenden Medien der Fügeile wechselwirken, was zu einer erhöhten Anfälligkeit für Alterungserscheinungen führt. Auch die Beständigkeit hinsichtlich Temperatur und Feuchtigkeit ist aus diesem Grund deutlich geringer als für andere Fügeverfahren, was bei der Auswahl des entsprechenden Prozesses berücksichtigt werden muss.

Nach chemischer Basis lassen sich Klebstoffe in anorganische und organische Klebstoffe unterteilen. Letztere stellen dabei den weitaus größten Anteil dar. Während zu den organischen Klebstoffen natürliche Kohlenstoffverbindungen wie Proteine, Kohlenhydrate und Harze und der gesamte Raum der künstlichen Polymere zählen, so werden den anorganischen Klebstoffen Silicate, Borate, Phosphate und Metalloxide zugerechnet.<sup>48</sup> Häufig erfolgt die Einteilung jedoch nach dem Abbindemechanismus (Abbildung 2.1). Hier wird zum einen in physikalisch abbindende Systeme unterschieden, die schon zu Beginn des Klebevorgangs als Polymere vorliegen und durch Lösungsmittel oder erhöhte Temperatur in einen benetzungsfähigen Zustand überführt werden. Zum anderen wird in chemisch abbindende Systeme differenziert, die als Monomere oder Prepolymere vorliegen und durch chemische Reaktion zur Klebschicht polymerisieren. Eine Mischform der genannten Abbindemechanismen stellen die reaktiven Schmelzklebstoffe dar. Dabei werden Polymere in

erwärmtem Zustand auf Füge­teile aufgebracht und reagieren dabei zu vernetzten Polymeren, die nach Abkühlung vollständig aushärten.



**Abbildung 2.1.** Schema zur Einteilung der Klebstoffe nach Abbindemechanismus.

Für eine effektive Klebung muss der Klebstoff in der Lage sein die Oberfläche des Füge­teils gut zu benetzen und somit fließfähig sein. Das wird über Lösungsmittel, in denen die Grundstoffe gelöst oder als Dispersion vorliegen, oder durch erhöhte Temperaturen realisiert. Das Abbinden, auch *Setting* genannt, führt dann über die verschiedenen aufgeführten Mechanismen zur Ausbildung der Polymere, welche die eigentlichen Klebschichten ausmachen. Ist eine einfache Benetzung nicht zu realisieren oder sollen die Haftungseigenschaften weiter verbessert werden, können unterschiedliche Oberflächenvorbehandlungen stattfinden um die Oberflächentopologie und/oder chemische Struktur zu verändern und die Oberfläche somit zu aktivieren. Diese umfassen mechanische Verfahren wie Schleifen, Bürsten oder Strahlen. Auch chemische Verfahren werden genutzt, wozu die Behandlung mit nicht-oxidierenden Säuren oder oxidierenden Säuren, gegebenenfalls unter Zusatz oxidierender Salze, zählt. Zudem kann auch Gasphasenoxidation mit Ozon oder Fluor eingesetzt werden und darüber hinaus kommen elektrochemische Verfahren zum Einsatz.<sup>48</sup> Weiterhin können kombinierte

Verfahren wie das Sandstrahl Coating oder Silicoating angewendet werden, welche die Oberfläche abtragen und gleichzeitig chemisch modifizieren. Alternativ können Plasma-, Corona-Entladungs- oder Laserbehandlung als physikalische Verfahren zur Modifikation der Oberfläche eingesetzt werden. Die verschiedenen Verfahren werden zum Teil mit Haftvermittlern oder Primern kombiniert, welche die Wirkung der üblichen chemischen Oberflächenbehandlungen ergänzen oder ersetzen. Haftvermittler basieren zumeist auf Silanen, die eine reaktive Endgruppe tragen, die in Abstimmung mit dem Polymer der Klebschicht eingesetzt wird (Amin-, Hydroxyl-, Vinyl-, Methacryl- oder Epoxy-Gruppen).<sup>48</sup> Nach Hydrolyse durch geringe Wassermengen, sind die Haftvermittler dann in der Lage durch Kondensation mit einer anorganischen Fügeiteiloberfläche sowie durch die funktionelle Gruppe mit den Klebstoff-Polymeren zu reagieren. Primer werden häufig eingesetzt, wenn zwischen Vorbehandlung und Klebung längere Zeit vergeht und die Oberfläche konserviert werden soll. Zumeist bestehen sie aus einer verdünnten Lösung des Klebstoffgrundstoffes, der für die Klebung eingesetzt wird. Sie werden auf die aktivierte Oberfläche aufgetragen und bei niedrigeren Temperaturen vorgehärtet, sodass sie anschließend noch in der Lage sind zusammen mit dem Klebstoff ergänzend auszuhärten und gemeinsame Polymerstrukturen zu bilden.

Klebstoffgrundstoffe und -zusammensetzungen sind sehr vielfältig und werden den gewünschten Anwendungen angepasst. Der genutzte Grundstoff bestimmt dabei nicht zwangsweise die Eigenschaften und Struktur des Klebstoffs. Durch die Kontrolle der Reaktionsbedingungen und durch Additive, wie Härter, Vernetzer, Beschleuniger, Weichmacher, Harze, Füllstoffe und Stabilisatoren können die Eigenschaften gezielt verändert und die Polymertopografie (linear, verzweigt oder vernetzt) gesteuert werden. Als Paradebeispiel für diesen Sachverhalt lässt sich die Verbindungsklasse der Polyurethane nennen, die als Duroplaste, Thermoplaste oder Elastomere vorliegen können.

Polyurethane stellen neben Epoxid-Harzen die wichtigsten Grundstoffe für Polyadditionsklebstoffe dar. Als bedeutende Grundstoffe für Polykondensationsklebstoffe sind Phenol-Formaldehyd-Harze, Polyvinylformaldehyd, Polyamide, Silikone und silanmodifizierte Polymere zu nennen. Bezüglich der Klebeanwendung werden Polymerisationsklebstoffe weiter in Einkomponenten- und Zweikomponentenklebstoffe unterteilt. Erstere bestehen häufig aus Polycyanacrylaten und wird auch als Sekundenkleber oder Superkleber bezeichnet. Polymethacrylate und ungesättigte Polyester bilden zum größten Teil die Basis der Zweikomponentenklebstoffe.

Auf der Seite der physikalisch abbindenden Klebstoffe sind Kontakt- und Haftklebstoffe häufig mit dem Grundstoff Polychloropren zu finden. Die Haftklebstoffe sind darüber hinaus vielfältiger und bestehen des Öfteren auch aus Poly(styrol-*block*-butadien), Poly(styrol-*block*-isopren), Poly(ethylen-*co*-vinylacteat), Polyisobutylen, Polyurethan, Polyacrylat oder Polysiloxan. Bei den Schmelzklebstoffen

werden ebenso vielfältige Grundstoffe wie Polybuten, Poly(propylen-*co*-hexen), Poly(styrol-*block*-butadien), Poly(styrol-*block*-isopren), Poly(ethylen-*co*-vinylacetat), Polyurethane, Polyamidharze oder Poly(amid-*co*-siloxan) eingesetzt. Häufig genutzte Grundstoffe für Plastisole sind Polyvinylchlorid, Polymethylmethacrylat, Polyethylen oder Poly(styrol-*co*-acrylsäure), die dispergiert als pulverförmige thermoplastische Polymere in Weichmachern, meist Phthalsäureestern, vorliegen. Für Lösungsmittelklebstoffe bilden Polyvinylacetat, Polychlorbutadien, Nitrilkautschuk, Styrol-Butadien-Kautschuk, Cellulosenitrat und weiterhin kautschukähnliche Thermoplaste wie Polyisobutylen, Polyvinylether, Polyvinylester oder Polyacrylat häufig die Basispolymere. Als Grundstoffe für Dispersionsklebstoffe finden Polyvinylacetat, Polyacrylat, Polyvinyliden, Polyurethan oder Polychloropren Verwendung.

Wasserbasierte Klebstoffe sind in den meisten Fällen Dispersionsklebstoffe, können in einigen Fällen aber auch als Lösungsmittelklebstoffe vorliegen. Letztere sind auf wasserlösliche Polymere wie Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol oder Polyethylenoxid angewiesen und stellen wichtige Vertreter für Klebstoffe im medizinischen Bereich dar.

Bei Dispersionsklebstoffen befinden sich feste Polymerpartikel (innere Phase) in einem wässrigen Dispersionsmittel (äußere Phase). Es können hohe Festkörpergehalte von bis zu 70 % erreicht werden, die trotzdem eine relativ geringe Viskosität aufweisen, um eine gute Benetzung des Fügeteils zu erhalten. Durch weitere Zusätze wie Schutzkolloide oder Emulgatoren werden die Partikel stabilisiert und voneinander getrennt gehalten, wodurch sie in einem thermodynamisch metastabilen Zustand verbleiben. Für das Abbinden sind wasserbasierte Klebstoffe auf die vollständige Entfernung von Wasser in Form von Verdunstung, Verdampfen oder Diffusion ins Füge teil angewiesen. Daher werden sie bisher hauptsächlich für poröse Substrate wie Holz, Papier oder Pappe eingesetzt. Im Abbindeprozess erhöht sich bei Dispersionsklebstoffen die Partikelkonzentration bis es zur Ausbildung von Kapillarkräften kommt, die einen Oberflächenkontakt zwischen den Partikeln hervorrufen und sie oberhalb ihrer Glasübergangstemperatur zu einer homogenen Schicht verschmelzen lassen (kalter Fluss). Bei Lösungsmittelklebstoffen handelt es sich bereits um ein homogenes System bei dem die flüssige Phase beim Abbinden langsam in die feste Phase übergeht.

Der größte Vorteil von wasserbasierten Klebstoffen liegt darin, dass Wasser günstig, nicht-brennbar und nicht-toxisch ist. Allerdings kann Wasser beim Klebeprozess auch bei der Ausbildung von Wechselwirkungen zu bestimmten Substraten favorisiert werden und Schichten auf der Substratoberfläche bilden, die den adhäsiven Kontakt einschränken. Außerdem weisen die Klebungen, obwohl sie auf wässrigem Lösungsmittel basieren, eine verminderte Feuchtigkeitsbeständigkeit durch die Verwendung von Emulgatoren auf. Des Weiteren sorgt die Anwesenheit von Zusatzstoffen in der

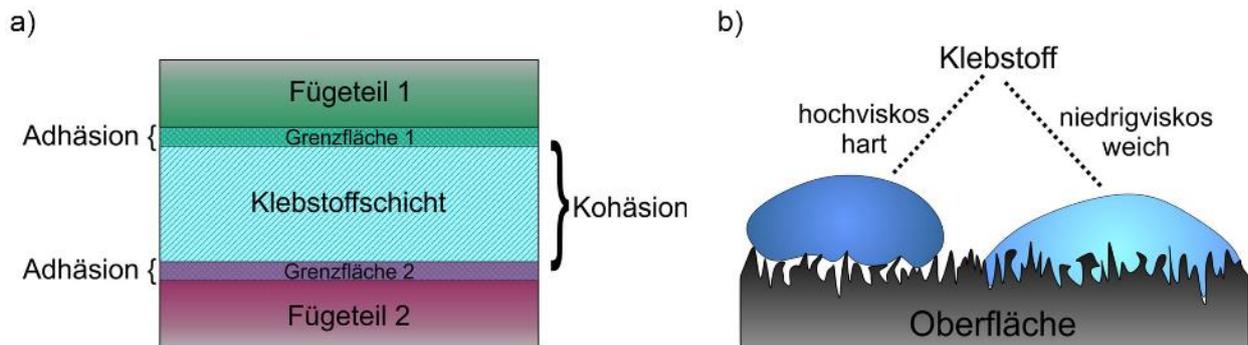
Klebschicht zu einer geringeren Festigkeit im Vergleich zu chemisch reagierenden Systemen. Daher sind bio-inspirierte, wasserbasierte Klebstoffe, welche die Vorteile der Nutzung von wässrigen Lösungsmitteln und die der Beständigkeit der chemisch reagierenden Systeme miteinander verbinden können, besonders interessant für spezialisierte Klebeanwendungen.

## 2.2 Wechselwirkungen von Klebstoffen

Die Voraussetzung für eine gute Klebung ist, wie bereits erwähnt, eine möglichst vollständige Benetzung des Substrats für einen maximalen Oberflächenkontakt. Dieser ist nötig, damit möglichst viele Bindungen im Einflussbereich von wirkenden intermolekularen Kräften an der Oberfläche aufgebaut werden können und eine Orientierung der Moleküle im Nahbereich erfolgen kann. Die anziehenden Kräfte, die zwischen zwei verschiedenen Stoffen wirken, werden unter dem Begriff Adhäsion zusammengefasst. Welche Kräfte für die Adhäsion verantwortlich sind hängt von der jeweiligen chemischen Natur der involvierten Oberflächen und Adhäsive ab. Es existiert eine Vielzahl an Theorien, die chemische, physikalische und mechanische Wirkungsweisen beschreiben, die zur Adhäsion und Klebkraft von Polymeren beitragen. Das verdeutlicht, dass es in dem komplexen Feld der Adhäsion keine universell anwendbare Adhäsionstheorie gibt, die in der Lage ist alle bisherigen Erkenntnisse zu vereinen.<sup>48</sup>

Laut Adsorptionstheorie, die in der Literatur häufig auch als spezifische Adhäsion zu finden ist,<sup>49</sup> werden anziehende Kräfte über primäre Bindungen, oder sekundäre Bindungen ausgebildet, sobald ein Adhäsiv mit einem Substrat in Kontakt kommt und eine ausreichend gute Benetzung stattfindet. Zu den primären Bindungen werden kovalente Bindungen, Komplexverbindungen aber auch Lewis-Säure-Base-Wechselwirkungen<sup>50</sup> gezählt. Die Theorie der Säure-Base-Grenzflächenbindungen umfasst verschiedene Elektronen Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Bindungen und Ionen-Dipol-Wechselwirkungen. Diese konnten alle auch experimentell bei Klebevorgängen von Polymethylmethacrylat (PMMA) an verschiedenen Mineraloberflächen nachgewiesen werden.<sup>51</sup> In Abhängigkeit der Acidität oder Basizität der reaktiven Zentren an den Oberflächen wurden verschiedene Interaktionsmodi der Ester-Gruppen des PMMA beobachtet. Zwischen den sauren OH-Zentren von SiO<sub>2</sub> und dem Carbonyl-Sauerstoff des Esters fand die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen statt. Die stark basischen Zentren auf Kupferoxid- und Nickeloxid-Oberflächen bauten durch nukleophilen Angriff an den Carbonyl-Kohlenstoff des Esters Ionen-Dipol-Wechselwirkungen auf. Durch Hydrolyse des Esters an Eisenoxid- und Aluminiumoxid-Oberflächen kam es zur Ausbildung ionischer Bindungen zu den schwach basischen reaktiven Zentren. Die Anwesenheit von Komplexverbindungen konnte in Phenol- und

Epoxidharzschichten auf Aluminiumoxid-Oberflächen nachgewiesen werden.<sup>52</sup> Die chemische Struktur von Adhäsiv und Substrat bestimmt also die Art der primären Bindung, wohingegen sekundäre Bindungen universell bei allen Adsorptionsvorgängen wirken. Letztere werden als van-der-Waals-Wechselwirkungen bezeichnet und umfassen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Keesom-Wechselwirkung), Wechselwirkungen permanenter Dipole und induzierte Dipole (Debye-Wechselwirkung) und Dispersionswechselwirkungen zwischen transienten Dipolen (London-Kräfte).



**Abbildung 2.2.** a) Schematische Darstellung der Komponenten und Wirkungsbereiche einer Klebung von zwei Fügeteilen. Adhäsion findet an der Grenzfläche von Fügeteiloberfläche und Klebstoffschicht statt, die Kohäsion wirkt innerhalb der Klebstoffschicht. b) Schematische Darstellung des Wirkungsprinzips der mechanischen Adhäsion. Weiche Klebstoffe sind besser in der Lage raue Oberflächen zu benetzen, was zu einer größeren effektiven Grenzfläche führt. Nach Aushärtung kommt es zu einer mechanischen Verankerung des Klebstoffs in den Unebenheiten der Oberfläche.

Neben den intermolekularen Wechselwirkungen spielen mechanische Effekte in Abhängigkeit der Rauheit von Oberflächen eine Rolle für die Adhäsion. Die mechanische Adhäsionstheorie besagt, dass die Adhäsionsenergie für raue Oberflächen steigt.<sup>53</sup> Zunächst erscheint dies widersprüchlich, da eine unebene Oberfläche zu einer schlechteren Benetzung führt (Abbildung 2.2b). Es entstehen Hohlräume an der Grenzfläche und Unebenheiten wirken als Spannungskonzentrationspunkte, welche die Klebkraft mindern können, wie es auch für harte adhäsive beobachtet wurde.<sup>54</sup> Jedoch führt eine Erhöhung der Rauheit, je nach Art der Mikromorphologie, zu einer teils enormen Vergrößerung der effektiven Oberfläche. Damit geht ebenfalls ein Anstieg der Oberflächenenergie einher, die überwunden werden muss, wenn die Bindungen zum Klebstoff gebrochen werden sollen. Für viele weiche Adhäsive, die in der Lage sind sich der Oberflächenmorphologie anzupassen, wird dadurch auch ein drastischer Anstieg der Klebkraft auf rauen Oberflächen im Vergleich zu einer glatten Oberflächenbeschaffenheit verzeichnet.<sup>55-57</sup> Um eine stärkere Klebung zu erreichen, zielen daher viele der besprochenen Oberflächenvorbehandlungen darauf ab eine raue, mikrofaserige oder mikroporöse Oberfläche zu erzeugen. In diesem Zusammenhang wird auch von formschlüssiger Adhäsion gesprochen, wenn der flüssige Klebstoff in Poren, Kapillaren oder Hinterschneidungen der Oberfläche eindringt, dort aushärtet und mechanisch verankert wird.<sup>48</sup> Darüber hinaus können die vielen kleinen

Luftblasen, die an unebenen Grenzflächen bei der Beklebung entstehen, für Saugeffekte sorgen, die zusätzlich die Haftung des Klebstoffes erhöhen.<sup>58</sup>

In der Klebstoffforschung wurde weiterhin diskutiert inwiefern elektrische und elektrochemische Effekte Einfluss auf die Adhäsion haben. Die elektrostatische Theorie wurde in den 1940er Jahren von DERJAGUIN und KROTOVA<sup>59</sup> postuliert und besagt, dass sich freie ionische oder elektronische Ladungen zwischen der Grenzfläche von Adhäsiv und Substrat bewegen und eine elektrische Doppelschicht erzeugen. In späteren Studien wurde die elektrische Doppelschicht zwischen Polyethylen und Aluminium untersucht und festgestellt, dass die elektrische Entladungsenergie der Doppelschicht einen Beitrag zur Bruchenergie der Klebung leistet.<sup>60</sup> Allerdings wurde angemerkt, dass auch andere energetische Mechanismen dazu beitragen. Darüber hinaus kann der energetische Beitrag der elektrischen Doppelschicht zur Adhäsion bislang nicht quantifiziert werden<sup>48</sup> und ist eher als gering einzuschätzen<sup>46</sup>. Auch der Einfluss des elektrochemischen Potentials von Metalloberflächen auf die Klebeverbindung wurde untersucht und eine Abhängigkeit des Schälwiderstandes, also des erforderlichen Drehmoments um Kleber und Füge teil in einem Schälversuch zu trennen, und Redoxpotential des Metalls nachgewiesen.<sup>61</sup> Besonders bei Carboxyl-funktionalisierten Polymeren wie Polyacrylaten ist dieser Effekt zu beobachten und wird mit mikroelektrolytischen Vorgängen<sup>62</sup> an der Oberfläche begründet.

Als letzte Theorie zu Adhäsionsvorgängen soll hier die Diffusionstheorie<sup>63,64</sup> aufgeführt werden. Dabei wird angenommen, dass es durch mikrobrownsche Molekülbewegungen zu einer gegenseitigen Diffusion von Makromolekülen in die jeweils andere Phase der Klebung kommt und die Phasengrenze verschwimmt. Über molekulardynamische Simulationen konnte die Reptationsdiffusion, also die schlangenartige Bewegung einer Polymerkette aus dem Polymernetzwerk, als wichtigster Beitrag zur Interdiffusion von Polymeren identifiziert werden.<sup>46,65</sup> Der Diffusionsprozess setzt eine Bewegungsmöglichkeit und gegenseitige Löslichkeit der Makromoleküle voraus und ist somit nur eingeschränkt hauptsächlich für Kunststoffklebungen des gleichen Kunststoffes (Autohäsion) oder höchstens sehr ähnlicher Kunststoffe anwendbar.

Wie bereits angedeutet gibt es keine übergeordnete, vereinende Theorie zur Adhäsion. Nach akzeptiertem Verständnis des Adhäsionsbegriffs sind die einzelnen vorgestellten Theorien als koexistent und als Hervorhebung bestimmter Aspekte eines umfassenderen Systems anzusehen.

Werden statt der wirkenden Kräfte an der Grenzfläche einer Klebung die Anziehungskräfte zwischen Molekülen innerhalb eines Stoffes betrachtet, so wird von Kohäsion gesprochen. Die für Kohäsion verantwortlichen Kräfte sind die gleichen wie bei den Primär- und Sekundärbindungen besprochenen Wechselwirkungen bei der Adsorption. Funktionelle Gruppen spielen bei dem Aufbau

von intermolekularen Wechselwirkungen eine besonders große Rolle. So ist die Kohäsionsfestigkeit von Polyamiden, die in der Lage sind Wasserstoffbrückenbindungen als intermolekulare Wechselwirkungen auszubilden, deutlich höher als beispielsweise für Polyethylen, bei dem nur van-der-Waals-Wechselwirkungen auftreten. Darüber hinaus ist die Struktur der Makromoleküle entscheidend für die Kohäsionsfestigkeit. Bei thermoplastischen Polymeren wird die Kohäsion zusätzlich durch mechanische Verklammerung oder Verschlaufung der linearen oder verzweigten Polymerketten maßgeblich beeinflusst.<sup>48</sup> Bei Duromeren resultiert die hohe Kohäsionsfestigkeit aus der dreidimensionalen Vernetzung der Polymerketten über kovalente Bindungen. Nicht nur die Struktur der Polymerketten, sondern auch deren Molekulargewicht ist bestimmender Faktor für die Kohäsionsfestigkeit. Erst oberhalb eines bestimmten Molekulargewichts nimmt die Kohäsionsfestigkeit stark zu. Dieser Punkt wird auch als kritischer Polymerisationsgrad bezeichnet und liegt bei den meisten Polymeren zwischen DP (engl. degree of polymerization) 500 und 1000.<sup>48</sup>

Die eigentliche Klebkraft eines Adhäsivs wird durch die Kombination von Adhäsion und Kohäsion bestimmt. Das Verhältnis von Adhäsionsfestigkeit und Kohäsionsfestigkeit muss möglichst ausgewogen sein um eine feste Klebung zu erreichen.<sup>48</sup> Somit ist auch eine Mischung von kürzeren und längeren Polymerketten für eine gute Verklebung von Füge­teilen vorteilhaft. Dabei sind kleinere Moleküle besser in der Lage sich an der Oberfläche zu orientieren und sich der Morphologie anzupassen um die Oberfläche gut zu benetzen und adhäsive Wechselwirkungen aufzubauen. Längere Polymerketten sind wiederum für eine hohe Festigkeit der darauf aufbauenden Polymerschicht verantwortlich. Nur durch eine ausgeglichene Verteilung der adhäsiven und kohäsiven Eigenschaften kann eine Klebung die Kräfte optimal übertragen und die Energie durch Deformation und Dissipation aufnehmen und verteilen ohne zu brechen.

### 2.3 Einfluss von Wasser auf Klebstoffe

Die Energie eines Adhäsionsvorgangs von Klebstoffen lässt sich thermodynamisch durch die DUPRÉ-Gleichung (Gl. 2.3.1) beschreiben. In dieser wird die Adhäsionsenergie, oder auch Adhäsionsarbeit  $W_A$ , als die Arbeit definiert, die nötig ist um zwei verbundene Phasen voneinander zu trennen.

$$W_A = \gamma_1 + \gamma_2 - \gamma_{12} \quad (\text{Gl. 2.3.1})$$

Bei dem Vorgang entstehen zwei neue Oberflächen, der Phase 1 und Phase 2, mit den freien Oberflächenenergien je Flächeneinheit ( $\gamma_1$  und  $\gamma_2$ ) in Kontakt mit Luft. Die Grenzfläche mit der freien Energie  $\gamma_{12}$  zwischen Phase 1 und 2 verschwindet. Bei positiven Werten der Adhäsionsarbeit muss also

Energie aufgebracht werden um die Bindung zu lösen. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass die Klebung stabil ist. Findet die Adhäsion in einem anderen Medium als Luft statt, so wirkt sich das auf die freien Oberflächenenergien  $\gamma_1$  und  $\gamma_2$  aus. Ein häufig auftretendes Medium ist Wasser, das in flüssigem oder gasförmigem Zustand stark an Oberflächen adsorbiert und deren Oberflächenenergie senkt. In der thermodynamischen Betrachtungsweise findet somit eine Verminderung des Terms der freien Oberflächenenergien in Gl. 2.3.1 statt. Wird die Adhäsionsarbeit nun negativ ist das gleichbedeutend mit dem Versagen der Klebeverbindung bzw. der Verdrängung des Adhäsivs durch Wasser an der Grenzfläche. Dies wird für verschiedenste Klebungen beobachtet wie einige Beispiele für Epoxidharzklebungen in Tabelle 2.1 zeigen.

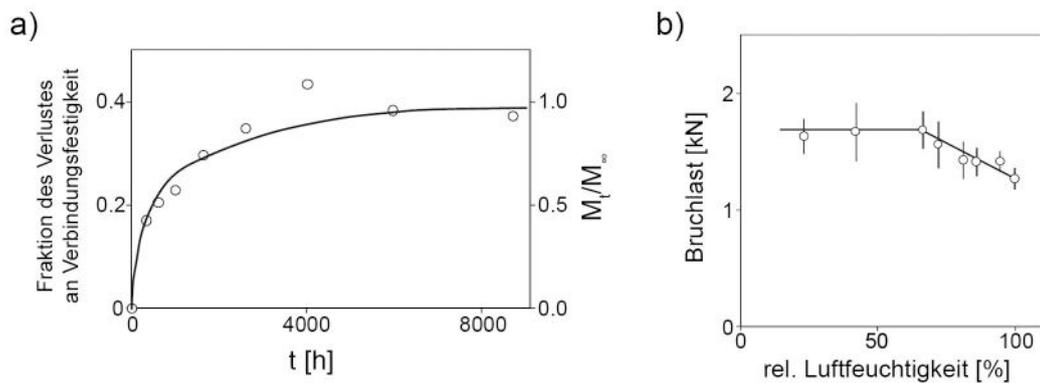
Die Gegenwart von Wasser stellt also ein großes Problem für Klebungen dar und schränkt häufig die Anwendung von Klebstoffen ein. Es gibt vor allem für Metallklebungen viele Beispiele für eine Schwächung der Verbindung in feuchter Umgebung.<sup>66-76</sup> Dabei muss das Wasser nicht von Beginn an bei der Herstellung der Klebung vorhanden sein um die Bindung zu schwächen, es kann auch durch Diffusion in eine Klebeverbindung eindringen und Quellung, Risse und Hydrolyse verursachen.

**Tabelle 2.1.** Vergleich von Adhäsionsarbeit verschiedener Epoxid-basierter Klebungen in trockener Luft und Wasser.<sup>46</sup>

Klebung	Adhäsionsarbeit $W_A$ [mJ/m <sup>2</sup> ]	
	Luft	Wasser
Epoxid/Stahl	291	-255
Epoxid/Aluminium	232	-137
Epoxid/Siliziumdioxid	178	-57
Epoxid/CFK	88-90	22-44

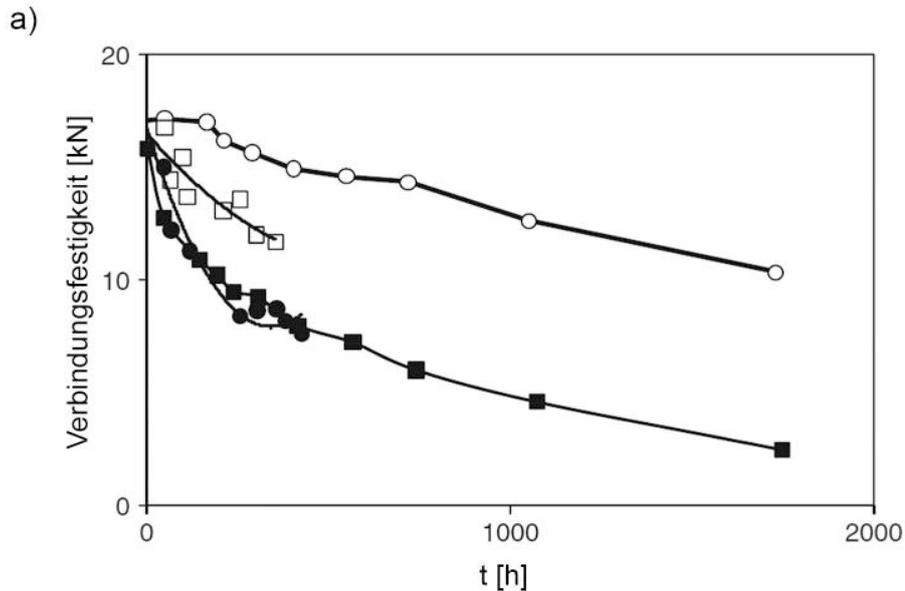
In einer feuchten Umgebung kann das Eindringen von Wasser praktisch nicht verhindert werden, auch Lacke oder andere Abdichtungen der Klebestellen werden von Wasser durchdrungen. Zudem greift es auch die Grenzfläche der Klebung an und spielt dort die größte Rolle bei der Minderung der Klebkraft.<sup>1,77</sup> Die hohe Permittivität  $\epsilon$  von Wasser beeinflusst ionische Bindungen an der Grenzfläche. Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Dispersionskräfte werden dadurch sogar in noch höherem Maße geschwächt, da sie proportional zu  $1/\epsilon^2$  sind.<sup>78</sup> Darüber hinaus trägt die hohe Oberflächenspannung dazu bei, dass vor allem van-der-Waals-Kräfte zwischen Adhäsiv und Metalloberfläche beeinträchtigt werden.<sup>1,67</sup> Wie stark die Klebkraft durch Wasser gemindert wird hängt dabei auch von der Menge des Wassers ab. Eine geringe Wasserkonzentration hat kaum Einfluss auf die Stärke der Klebeverbindung. In verschiedenen Langzeitstudien zu Epoxidharzklebungen, die geringer Feuchtigkeit von bis zu 55 % relativer Luftfeuchtigkeit ausgesetzt wurden, konnte kein signifikanter Verlust der Klebkraft festgestellt werden.<sup>67,79-81</sup> Wenn es zu einer Verminderung der Verbindungsfestigkeit durch

Wassereinwirkung kommt, wurde in einigen Fällen auch festgestellt, dass diese reversibel ist und nach Trocknung der Verklebung vollständig oder teilweise wiederhergestellt werden kann.<sup>66,67,81</sup> Zudem sind einige Polymerisationsklebstoffe wie Cyanacrylate auf Spuren von Wasser angewiesen um zu Polymerisieren und die Abbindung einzuleiten. Lösungsmittel- oder Dispersionsklebstoffe auf Wasserbasis enthalten zwar hohe Wassermengen, sind aber darauf angewiesen, dass das Wasser verdunstet oder absorbiert wird, um abbinden zu können. Nach dem Trocknungsvorgang weisen sie trotzdem eine geringe Resistenz gegen Wasser auf.



**Abbildung 2.3.** Einfluss von Wasser auf Klebeverbindungen. a) Vergleich des Verlustes an Verbindungsfestigkeit (Punkte) mit berechneter Wasseraufnahme (Linie) einer Epoxidharz-Klebeverbindung von Aluminiumfügeteilen.<sup>82</sup> b) Abhängigkeit der Verbindungsfestigkeit einer Epoxidharz-Klebeverbindung von Aluminiumfügeteilen von der relativen Luftfeuchtigkeit nach Exposition in entsprechender feuchter Umgebung für 420 Tage.<sup>69</sup>

In verschiedenen Studien wurde ein proportionaler Zusammenhang von Verbindungsfestigkeit und Wasseranteil in der Klebeschicht festgestellt.<sup>67,72,73,81,82</sup> Das geht auch aus Abbildung 2.3a von BREWIS, COMYN und TEGG<sup>82</sup> hervor, in der die Korrelation von gemessenen Verbindungsfestigkeiten von Epoxidharz geklebten Fügeteilen aus einer Aluminiumlegierung mit dem berechneten Wasseranteil der Klebung deutlich sichtbar ist. Die Geschwindigkeit des Festigkeitsverlustes steht im Zusammenhang mit der Diffusionsrate des Wassers im Adhäsiv und ist somit materialspezifisch. Das führte zu weiteren Untersuchungen bezüglich des Wasseranteils, bei denen Epoxidharz-Aluminium-Klebungen und Epoxidharz-Stahl-Klebungen in unterschiedlich feuchten Umgebungen, bei verschiedenen Temperaturen oder unterschiedlicher Dauer der Wasserexposition auf Bruchfestigkeit geprüft wurden. Daraus konnten kritische Wasserkonzentrationen von 1.35-1.45 % ermittelt werden, ab der eine signifikante Schwächung der Klebefestigkeit auftritt.<sup>68,69</sup> Das entspricht einer relativen Luftfeuchtigkeit der Umgebung von 65 %, wie der Abbildung 2.3b aus der Studie von BREWIS *et. al.*<sup>69</sup> entnommen werden kann. Die meisten Klebstoffe sind in der Lage deutlich höhere Wassermengen als die kritische Wasserkonzentration aufzunehmen und erreichen Massenanteile von bis zu 41 % (bei einem Melamin-Formaldehyd-Harz) nach Equilibrierung in Wasser.<sup>1</sup>



**Abbildung 2.4.** Einfluss verschiedener Oberflächenvorbehandlungen auf die Klebefestigkeit. Die Einwirkung von Wasser (rel. Luftfeuchtigkeit von 97 % und 43 °C) führt zu einem zeitabhängigen Festigkeitsverlust einer Epoxid-Polyamid-Klebung von Aluminiumfügeteilen. Oberflächenvorbehandlungen erfolgten durch Chromschwefelsäure-Ätzung (weiße Kreise), alkalische Ätzung (weiße Quadrate), Lösungsmittelentfettung (schwarze Quadrate) und Phosphorsäureanodisierung (schwarze Kreise).<sup>71</sup>

Durch Oberflächenvorbehandlungen von Metallen kann die Resistenz einer Klebung gegen Wasser optimiert werden. In Abbildung 2.4 ist die die von BUTT und COTTER untersuchte Verbindungsfestigkeit für Aluminiumklebungen mit einem Epoxid-Polyamid-Klebstoff und verschiedenen Oberflächenvorbehandlungen in Abhängigkeit der Zeit dargestellt.<sup>71</sup> Daraus ist ersichtlich, dass das Ätzen mit Chromschwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{CrO}_3$ ) das beste Ergebnis liefert, bei dem der geringste Verlust der Verbindungsfestigkeit verzeichnet wird. Weiterhin können Silan-Haftvermittler, die kovalente Bindungen zwischen Füge­teil und Klebstoffschicht ausbilden (siehe Abschnitt 2.1), eingesetzt werden um die Wasserresistenz von Klebungen zu erhöhen. So zeigen beispielsweise Klebungen von Glasoberflächen, die mit 3-Aminopropyltriethoxysilan vorbehandelt wurden, einen moderaten Abfall der Verbindungsfestigkeit, wenn sie Luft mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % ausgesetzt sind. Die Klebkraft von unbehandelten Glasoberflächen hingegen geht unter den gleichen Bedingungen vollständig verloren.<sup>70</sup> Das zeigt die Notwendigkeit starker, spezifischer Bindungen um effektive Klebungen in feuchter Umgebung zu realisieren und einen Kontakt zur Oberfläche aufrecht zu erhalten, damit auch sekundäre Wechselwirkungen stattfinden können. Diesen Umstand machen sich viele biologische Systeme zu Nutze um wasserresistente Haftung und Klebung zu erzeugen.

## 2.4 Biologische Unterwasserklebstoffe

Im Meerwasser haben sich Organismen entwickelt, die um zu überleben auf biobasierte Adhäsion an Oberflächen angewiesen sind. Die Oberflächen von Metalloxiden, Tonen und anderen Mineralien im Wasser sind mit einer vielfältigen Mischung aus adsorbierten Ionen, ionischen Komplexen, organischen Polymeren und mikrobiellen Biofilmen bedeckt.<sup>4</sup> Da die Metallionen der Mineraloberflächen eine unvollständige Koordination aufweisen, können sie als Lewis-Säuren agieren. Sind die Oberflächen Wasser ausgesetzt, fungieren die Wassermoleküle als Lewis-Basen und reagieren durch dissoziative Koordination mit den Metallzentren zu Metallhydroxiden.<sup>83</sup> Somit werden durch den amphoteren Charakter der Hydroxidionen pH-abhängige Oberflächenladungen generiert. Die Ladungen ermöglichen spezifische Wechselwirkungen von kationischen Metallionen oder anionischen Liganden, die im Meerwasser vorhanden sind und die Grenzflächenenergie senken. Biologische Adhäsive haben spezielle Mechanismen entwickelt an solch niedrigerenergetischen Oberflächen zu binden.<sup>4</sup> Das wird durch die Verdrängung von oberflächengebundenen Ionen, Liganden und gebundenem Wasser durch Seitenketten und Modifikationen von Klebemolekülen bewerkstelligt.<sup>84</sup> Dieses Merkmal unterscheidet die biologische Adhäsion von den synthetischen Klebstoffen, bei denen aufwändige Oberflächenbehandlungen nötig sind um möglichst hohe Oberflächenenergien zu erhalten, damit eine effektive Klebung erzielt werden kann.

Die Substrathaftung von marinen wirbellosen Tieren kann auf unterschiedliche Arten erfolgen und dabei verschiedenen Zwecken dienen.<sup>2</sup> Zum einen können sie temporär haften und somit eine gleichzeitige Haftung und Bewegung entlang des Substrats ermöglichen, wie es zum Beispiel bei Seesternen<sup>85</sup>, Napfschnecken<sup>86</sup> oder Seeanemonen<sup>87</sup> der Fall ist. Zudem können sie auch vorübergehende Haftung erzeugen, die es dem Organismus erlaubt sich stark an das Substrat zu binden, sich dennoch wieder zu lösen und den Aufenthaltsort zu wechseln (z.B. Plattwürmer<sup>88</sup> oder Bauchhärlinge<sup>89</sup>). Zum anderen können sie sich dauerhaft an Felsen oder den Meeresgrund haften und dort ortsgebunden ihr Leben verbringen, wie es zum Beispiel bei Miesmuscheln<sup>90</sup>, Sandkorallen<sup>91</sup> oder Rankenfußkrebse<sup>92</sup> erfolgt. Letztere Form entspricht der typischen Klebung wie sie zum Materialverbund vorgesehen ist. Permanente biologische Klebstoffe bestehen fast ausschließlich aus Proteinen, während nicht-permanente Klebstoffe meist aus einer Kombination von Proteinen und Kohlenhydraten bestehen.<sup>93</sup>

Adhäsive aus reinen Kohlenhydraten werden unter anderem von Bakterien genutzt.<sup>94</sup> Diese bilden Exopolysaccharide, eine extrazelluläre Klebstoffmatrix, mit Hilfe derer sie Oberflächen besiedeln. Das können sie als einzelne Zellen oder als Teil eines Biofilms bewerkstelligen. So ist beispielsweise das

Wasserbakterium *Caulobacter crescentus* in Gewässern allgegenwärtig und eines der ersten Organismen, die Oberflächen besiedeln und somit Biofouling initiieren.<sup>95</sup>

Als Organismen, die eine Kombination von Kohlenhydraten und Proteinen nutzen sind Sporen von Braunalgen (*Undaria pinnatifida*) zu nennen. Sie sekretieren anionische Polysaccharide mit sulfurylierten und phosphorylierten Gruppen, die mit Proteinen und Ca- und Mg-Ionen adhäsive Gele bilden um sich an Oberflächen anzuheften.<sup>96</sup> Weiterhin nutzen auch viele Seegurken eine Mischform aus Kohlenhydraten und Proteinen als Biokleber um sich vor Feinden zu schützen. Sogenannte Cuviersche Schläuche werden dem Angreifer entgegengeschleudert und bilden ein klebriges Netzwerk, in dem er sich verfängt.<sup>97</sup> Die Kombination aus zugfestem Kollagen im Kern und aus hochadhäsivem Epithel macht die Schläuche robust und effizient. Der Kleber der Seegurkenart *Holothuria forskali* wurde hinsichtlich der Zusammensetzung untersucht und besteht aus Proteinen und Kohlenhydraten im Verhältnis 3:2. Die Proteine sind zum großen Teil aus polaren und geladenen Aminosäuren sowie aus Glycin aufgebaut.<sup>98</sup>

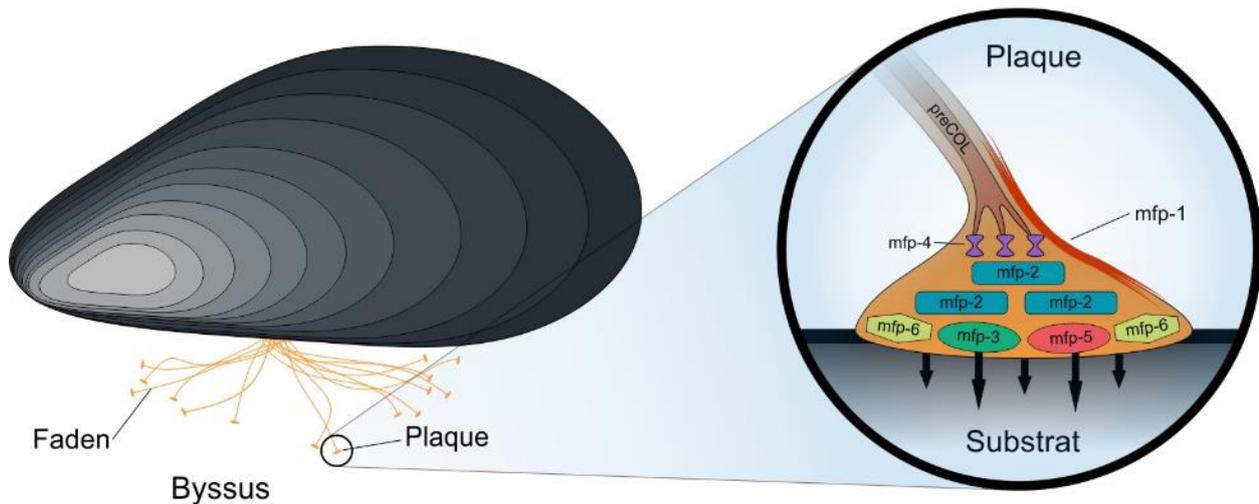
Die Mehrzahl der biologischen Adhäsive ist jedoch aus rein proteinhaltigen Substanzen aufgebaut. Vor allem polare und ionische Aminosäuren sowie Glycin kommen zu großen Teilen in adhäsiven Proteinen der Meeresbewohner vor. Während die polaren und ionischen Aminosäuren Wechselwirkungen mit der Oberfläche über Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Bindungen eingehen können, werden Aminosäuren mit kurzen Seitenketten häufig mit elastomeren Proteinen in Zusammenhang gebracht.<sup>99</sup> Diese sind in der Lage erheblicher Verformung standzuhalten und nach der Belastung wieder in ihren Ursprungszustand zurückzukehren. Das zeigt, dass die adhäsiven Proteine durch die Vielseitigkeit der funktionellen Gruppen speziell angepasst werden können, um ein optimales Verhältnis von Adhäsion und Kohäsion sowie Elastizität und Plastizität zu erzielen. Beispiele für diese Art von Adhäsiven sind vielzählig. So bilden Rankenfußkrebse einen Proteinzement, mithilfe dessen sie sich permanent an Oberflächen haften und der als die haltbarste und härteste Verbindung in der lebenden Wasserwelt gilt.<sup>100</sup> Der Proteinzement der Spezies *Megabalanus rosa* wurde analysiert und besteht aus einem Proteinkomplex aus drei Gruppen von Proteinen, die einen hohen Gehalt an den hydrophilen Aminosäuren Serin und Threonin sowie den hydrophoben Aminosäuren Glycin und Alanin aufweisen, die in kurzen alternierenden Sequenzregionen auftreten.<sup>92,101</sup> Der Proteinkomplex wird über die Ausbildung von Disulfidbrücken stabilisiert<sup>92</sup> und intramolekulare Disulfide tragen zur Aufrechterhaltung der Proteinstrukturen bei der Oberflächenadhäsion bei.<sup>102</sup> Die Sandkorallen (*Sabellariidae*) sind Würmer, die Unterwasserkleber zum Bau von schützenden Röhren einsetzen, in denen sie sich niederlassen. Dazu sammeln sie mineralische Partikel wie Stücke von Muschelschalen und Sandkörner vom Meeresboden und

verkleben sie mit einem sekretierten proteinhaltigen Zement.<sup>103,104</sup> Der Zement ist widerstandsfähig und haftet schnell auf einer Vielzahl von Materialien im Meerwasser. Sandkorallen werden auch als Sandburgenwürmer bezeichnet, da sie Kolonien bilden in denen die Röhren jedes Tiers aneinandergelagert werden und somit ruffartige Hügel entstehen. Der Zement der Spezies *Phragmatopoma californica* enthält mindestens drei verschiedene Proteine *Pc-1-3* sowie Calcium, Magnesium und Phosphor. Der Phosphor ist jedoch nicht in Form von Mineralien, sondern als posttranslationale Modifikation in Form von Phosphoserin gebunden.<sup>104</sup> Phosphoserin und Glycin dominieren die Zementproteine und machen zusammen fast 60 mol-% der Proteinsequenzen aus.<sup>103</sup> In dem Serin-reichen Protein *Pc-3*, das etwa zu 80 mol-% aus Serin besteht, sind bis zu 90 mol-% der Reste phosphoryliert.<sup>103</sup> Die beiden Proteine *Pc-1* und *Pc-2* sind basisch und bestehen aus wiederholten Sequenzmotiven, die reich an Glycin, Lysin und der posttranslational modifizierten Aminosäure L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) sind.<sup>103,105</sup>

Auch das Klebesystem der Miesmuschel basiert auf Proteinen. Diese weisen Ähnlichkeiten zu *Pc-1* und *Pc-2* auf, indem sie ebenfalls basisch sind und Modifikationen zu Dopa beinhalten. Die Miesmuscheln haben jedoch weitaus mehr Aufmerksamkeit von der Forschung erhalten, da die Dopa-Anteile der Proteine besonders groß sind und sie hochrepetitive Sequenzmotive enthalten, was sie besonders attraktiv für biomimetische Materialien macht.

## 2.5 Aufbau und Funktionsweise des Klebesystems der Miesmuschel

Zur Haftung an Felsen, Holz, Metall oder sonstigen Oberflächen nutzen Miesmuscheln ein Bündel radial verteilter Proteinfäden. Diese werden als Byssus bezeichnet (Abbildung 2.5), der aus drei Teilen besteht: einem adhäsiven Plaque, einem steifen distalen Abschnitt und einem elastischen proximalen Abschnitt.<sup>3</sup> Der proximale Bereich verbindet den Byssusfaden über den sogenannten Stamm mit dem Muschelgewebe und der distale Bereich endet in einem Plaque, der auf die Adhäsion zu festen Substraten spezialisiert ist. Innerhalb der Plaques wurden bis zu 20 verschiedene Proteinkomponenten charakterisiert, von denen sechs als Muschelfußproteine (mfps) klassifiziert sind (Tabelle 2.2).<sup>3,106</sup> Der Name leitet sich vom Muschelfuß ab, der für die Produktion des Byssus verantwortlich ist. In seiner ventralen Vertiefung werden die Byssusfäden einzeln innerhalb von 30 Sekunden bis 8 Minuten, je nach Alter der Muschel, erzeugt.<sup>107</sup> Das geschieht durch die Sekretion von Proteinkomponenten durch die jeweiligen Phenol-, Kollagen- und Zusatzdrüsen, die um die Vertiefung herum angeordnet sind,<sup>108,109</sup> beginnend bei den Plaque-Proteinen im distalen Bereich an der Grenzfläche zum Substrat, gefolgt vom Bulkmaterial des Plaques und Kernmaterial der Fäden<sup>110,111</sup>.



**Abbildung 2.5.** Schematische Darstellung der Miesmuschel. Links sind die Komponenten des Byssus-Klebesystems, das über den Muschelfuß mit der Muschel verbunden ist, zu sehen. Rechts ist der Aufbau des adhäsiven Plaques eines Byssusfadens dargestellt, der eine Mischung verschiedener Muschelfußproteine (mfps) und präpolymerisierte Kollagene (preCOLs) enthält. (Adaptiert von Referenz<sup>106</sup>).

Die Muschelfußproteine werden von der Phenoldrüse sekretiert und befinden sich allesamt im Plaque, mit Ausnahme von mfp-1, das die schützende, etwa 5 µm dicke Außenhaut der Byssusfäden bildet und in der Zusatzdrüse produziert wird. Die Proteine aus der Kollagenrüse sind für den Kern des Byssusfadens bestimmt und für die mechanischen Eigenschaften des Fadens verantwortlich. Dazu gehören kollagenhaltige Proteine, preCOLs (präpolymerisierte Kollagene), die mit distaler (D), proximaler (P) und nichtgradierter (NG) Verteilung in verschiedenen Bereichen des Fadens auftreten<sup>106</sup> und neben einer Kollagen-Tripelhelix auch  $\beta$ -Faltblatt- und Elastin-Strukturen aufweisen<sup>112</sup>. Darüber hinaus enthalten die Fäden zusätzliche Matrixkomponenten, Fadenmatrixproteine (TMPs), welche die kollagenen Mikrofibrillen während der Verformung unter Spannung trennen und eventuell schmieren.<sup>113</sup> Mfp-3 und mfp-5 werden an der Grenzfläche von Plaque und Substrat verortet und sind somit für die primäre Adhäsion an die Oberfläche verantwortlich.<sup>114,115</sup> Mfp-6 wird in stöchiometrischen Mengen zu mfp-3 und -5 sekretiert und eine Rolle als Antioxidans über thiolvermittelte Redoxprozesse zugeschrieben.<sup>110,116,117</sup> Mfp-2 und mfp-4 befinden sich im Inneren des Plaques und insbesondere mfp-2 macht mit 25 - 40 % Massenanteil den größten Teil des Plaques aus.<sup>106,118</sup> Die hohe Anzahl an Disulfidbrücken sorgt für eine stabilisierende Wirkung der extrazellulären Proteinmatrix. Für mfp-4 wird, aufgrund der Position am proximalen Ende des Plaques, angenommen, dass es über Kupferkomplexe mit den preCOLs interagiert.<sup>119</sup>

**Tabelle 2.2.** Muschelfußproteine (mfps) aus dem byssalen Plaque. Es treten neben Dopa ( $Y^*$ ), das in allen mfps vorkommt, *trans*-4-Hydroxyprolin (O), *trans*-2,3-*cis*-3,4-Dihydroxyprolin ( $O^*$ ), 4-Hydroxyarginin (R), *O*-Phosphoserin (S) und Disulfid ([S-S]) als posttranslationale Modifikationen (PTM) auf. Die Daten beziehen sich auf die verschiedenen Spezies *Mytilus edulis* (Me), *Mytilus californianus* (Mc) und *Mytilus galloprovincialis* (Mg).

Protein	Spezies	Masse [kDa]	Anteil Dopa [mol-%]	Sequenz (Konsensus oder vollständig)	Wiederholungen	PTM
mfp-1	Me <sup>120</sup>	108	15	[AKPSY*O*OTY*K] <sub>n</sub>	75	O,O*
	Mc <sup>121</sup>	92	13	[PKISY*O*OTY*K] <sub>n</sub>	64	O,O*
mfp-2	Mg <sup>122,123</sup>	45	5	[TDKAY*KPNPCVVS <del>K</del> PCKNRGKCIWN GKAYRCKCAYGY*GGRHC] <sub>n</sub>	11	[S-S]
mfp-3	Me <sup>124</sup>	6	20	ADY*Y*GPNY*GPPRRY*GGGNY*NRY* NRY*GRRY*GGY*KGWNNGWNRGR GKY*W	1	R
	Mc <sup>125</sup>	6	28	GY*GY*DLGY*NAPWPY*NNGY*Y*GY* NGY*NGY*HGRY*GWNKGWNNGPWG GSY*Y*GNKGY*LY*	1	R
mfp-4	Mc <sup>119</sup>	93	2	[HVHTHRVLHK] <sub>n</sub>	36	
				[DDHVNDIAQTA] <sub>n</sub>	16	
mfp-5	Me <sup>126</sup>	9	28	SSEY*KGGY*Y*PGNAY*HY*SGGSY* HGSGY*HGGY*KGKY*Y*GKAKKY*Y*Y* KY*KNSGKY*KY*LKKARKY*HRKGY*K Y*Y*GGSS	1	S
	Mc <sup>127</sup>	9	30	Y*DGYS*SDGY*Y*PGSAY*NY*PSGSHG Y*HGHGY*KGKY*Y*GKGKKY*Y*Y*KY* KRTGKY*KY*LKKARKY*HRKGY*KKY* Y*GGSS	1	S
mfp-6	Mc <sup>127</sup>	11	1-3	GGGNYRGYCSNKGCRSGYIFYDNRGF CKYGSSSYKYDCGNYACLPRNPYGRV KYYCTKKYSCPDFYYYNNKGYYYN DKDYGCFCNGSYNGCCLRSY	1	S [S-S]

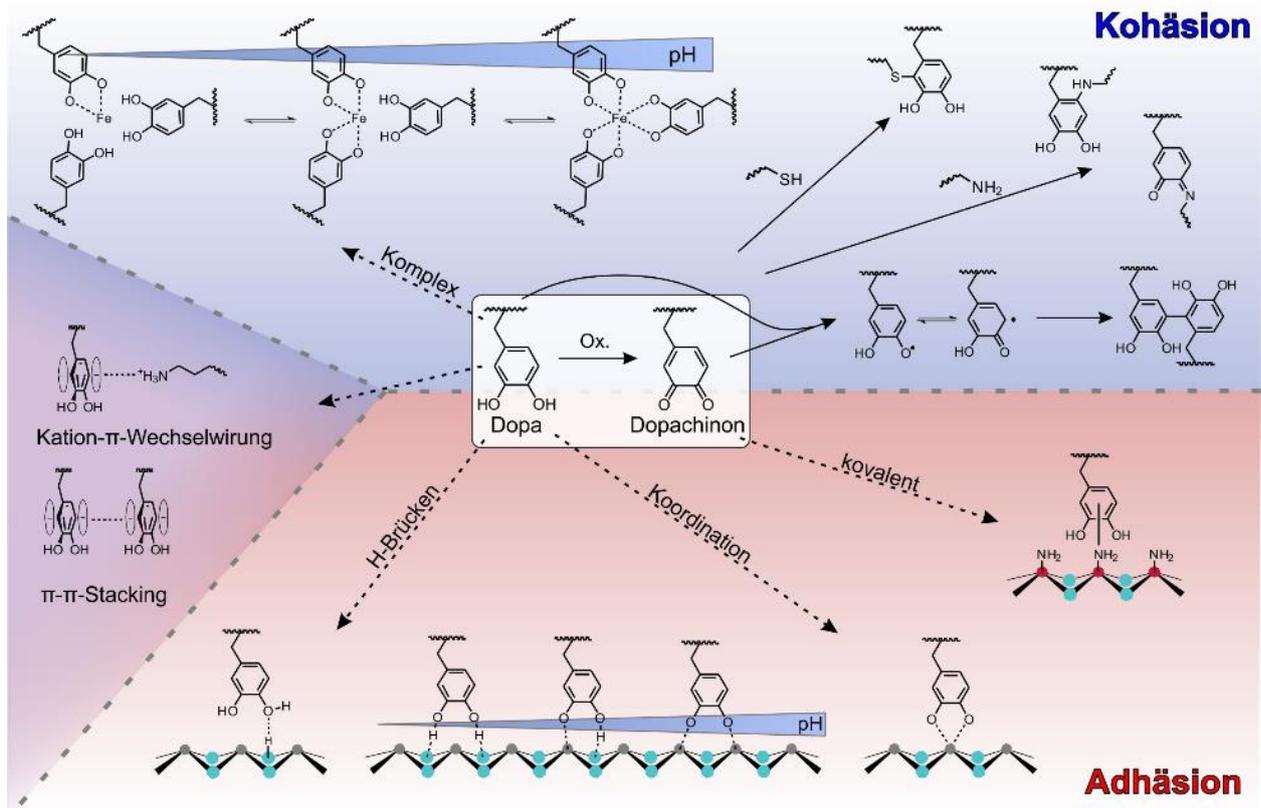
Alle mfps verbindet, dass sie die posttranslationale Modifikation Dopa aufweisen und moderat bis stark kationisch sind. Manche mfps enthalten repetitive Peptidsequenzen, wobei *Mefp*-1 aus der gemeinen Miesmuschel *Mytilus edulis* mit den meisten Wiederholungen hervorzuheben ist. Dessen Konsensussequenz ist ein Decapeptid mit der Sequenz AKPSY\*O\*OTY\*K, die 75 - 80 mal wiederholt wird und neben Dopa ( $Y^*$ ) weitere Hydroxylierungen in Form von *trans*-4-Hydroxyprolin (O) und *trans*-2,3-*cis*-3,4-Dihydroxyprolin ( $O^*$ ) aufweist.<sup>120,128</sup> Auch wenn mfp-1 die Bedeutung einer protektiven Beschichtung des Byssus zukommt, so wurden aufgrund des relativ hohen Anteils an Dopa von 15 mol-% trotzdem adhäsive Eigenschaften festgestellt.<sup>32,129-133</sup> Da Dopa in den Grenzflächenproteinen des Plaques mfp-3 und mfp-5 in besonders hohen Mengen bis zu 30 mol-% vorkommt,<sup>127</sup> wurde die Modifikation der Proteine hauptsächlich für die starke Adhäsion des Byssus verantwortlich gemacht.

Einzelmolekül-Rasterkraftmikroskopische Messungen der Wechselwirkungen von Dopa auf nassen TiO<sub>2</sub>-Oberflächen konnten die hohe Bindungskraft der Catechol-Funktionalität bestätigen. Diese ist mit 800 pN stärker als jede andere nicht-kovalente Wechselwirkung.<sup>134</sup> DFT Berechnungen an SiO<sub>2</sub>-

Oberflächen legen zudem nahe, dass Dopa-Funktionalitäten adsorbierte Wassermoleküle verdrängen und mit Bindungsenergien von 60 - 140 kJ/mol direkt an die Oberfläche adsorbieren.<sup>135,136</sup> Darüber hinaus ist Dopa vielseitig in Bezug auf die Art der Wechselwirkung (Abbildung 2.6), was dazu beiträgt, dass Muscheln auf praktisch allen Oberflächen haften können.<sup>115,137</sup> Mit mineralischen oder Metalloxid-Oberflächen wie TiO<sub>2</sub> werden in Abhängigkeit vom pH Wert entweder zwei Wasserstoffbrückenbindungen, einzählige Koordination in Kombination mit einer Wasserstoffbrückenbindung oder zweizählige Koordination über Charge-Transfer-Komplexe ausgebildet.<sup>138</sup> Die Wasserstoffbrückenbindungen können entweder zwischen Hydroxyl-Gruppen<sup>139</sup> oder an der Oberfläche exponierten Sauerstoffatomen<sup>138</sup> von Metalloxiden und den Catechol OH-Gruppen entstehen und der Abstand der Wasserstoffbrückenakzeptoren an der Oberfläche ist entscheidend für die Ausbildung ein- oder zweizähliger Bindungen<sup>32</sup>. Auf aromatischen oder organischen Oberflächen bzw. sonstigen Oberflächen, die von Biofouling betroffen sind, können zusätzlich  $\pi$ - $\pi$ - und Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen zur Adhäsion beitragen.<sup>140,141</sup> Darüber hinaus können auch kovalente Bindungen mit organischen Oberflächen nach der Oxidation von Dopa zu Dopachinon auftreten. So wurde beispielsweise für eine Amin-funktionalisierte SiO<sub>2</sub>-Oberfläche eine 200-fach höhere Bindungskraft für Dopachinon gemessen als für Dopa.<sup>134</sup>

Durch die Oxidation nimmt Dopa nicht nur eine Schlüsselrolle bei den adhäsiven Wechselwirkungen zu Oberflächen ein, sondern ist auch maßgeblich für die Kohäsion der adhäsiven Plaques verantwortlich. Über die verschiedenen Folgereaktionen mit der Chinon-Funktionalität wird eine kovalente Vernetzung der Proteine und folglich eine Aushärtung (*Curing*) der Proteinmatrix erreicht. Die Chemie dieses Prozesses ist komplex, da es keinen definierten Reaktionsweg gibt und verschiedene Arten von Vernetzungen möglich sind (Abbildung 2.6).<sup>142</sup> Einerseits wurden 5,5'-Di(3,4-dihydroxyphenylalanin) Bindungen (5,5'-diDopa) für die Vernetzung verantwortlich gemacht, die durch Reaktion von Semichinonen über umgekehrte Disproportionierung von Dopa und Dopachinon entstehen.<sup>143,144</sup> Mittels NMR-Experimenten wurden diDopa Bindungen im gesamten Plaque von *Mytilus edulis* mit einer Konzentration von 1 mol-% nachgewiesen.<sup>145</sup> Andererseits eröffnet die Oxidation zu Dopachinon eine Reihe von nukleophilen Additionsreaktionen in Form von Imin-Bildung oder Michael-Addition. Es wurde gezeigt, dass  $\alpha$ -Amine,  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysin, Imidazolfunktionen von Histidin und Thiolgruppen von Cystein in der Lage sind, Additionsreaktionen ans konjugierte  $\pi$ -System von Dopachinon durchzuführen.<sup>146</sup> Dabei nimmt Cystein den Platz als reaktivster Reaktionspartner ein,<sup>147</sup> da es eine bis zu 4000 mal höhere Reaktivität beim nukleophilen Angriff an Chinone aufweist als Amine.<sup>148,149</sup> Das zeigt, dass die Addition von Cystein an Dopachinon eine sehr effektive Reaktion darstellt. Trotz dieser Umstände gibt es bislang

nur wenige Studien in denen Cysteinyl-Dopa-Bindungen in Muschelproteinen untersucht wurden. So wurden 5- und 2-S-Cysteinyl-Dopa-Konzentrationen von 1 mol-% und höher in *Pcfp-1* der Grünschalmuschel (*Perna canaliculus*)<sup>150</sup> und in *Mcfp-6* Fußspuren der kalifornischen Muschel (*Mytilus californianus*)<sup>127</sup> gefunden. Letzteres Beispiel zeigt, dass mfp-6 neben der Funktion als Antioxidans auch zum Vernetzen der Proteine im Plaque eingesetzt wird, wenn die reduzierende Wirkung zum Erliegen kommt.<sup>110</sup>



**Abbildung 2.6.** Adhäsive und kohäsive Wechselwirkungen von Dopa bzw. Dopachinon. Wechselwirkungen, die zu Adhäsion führen, sind rot hinterlegt. Kohäsive Wechselwirkungen sind blau hinterlegt. Der violett hinterlegte Bereich verdeutlicht, dass die Wechselwirkungen sowohl für Adhäsion als auch Kohäsion genutzt werden.

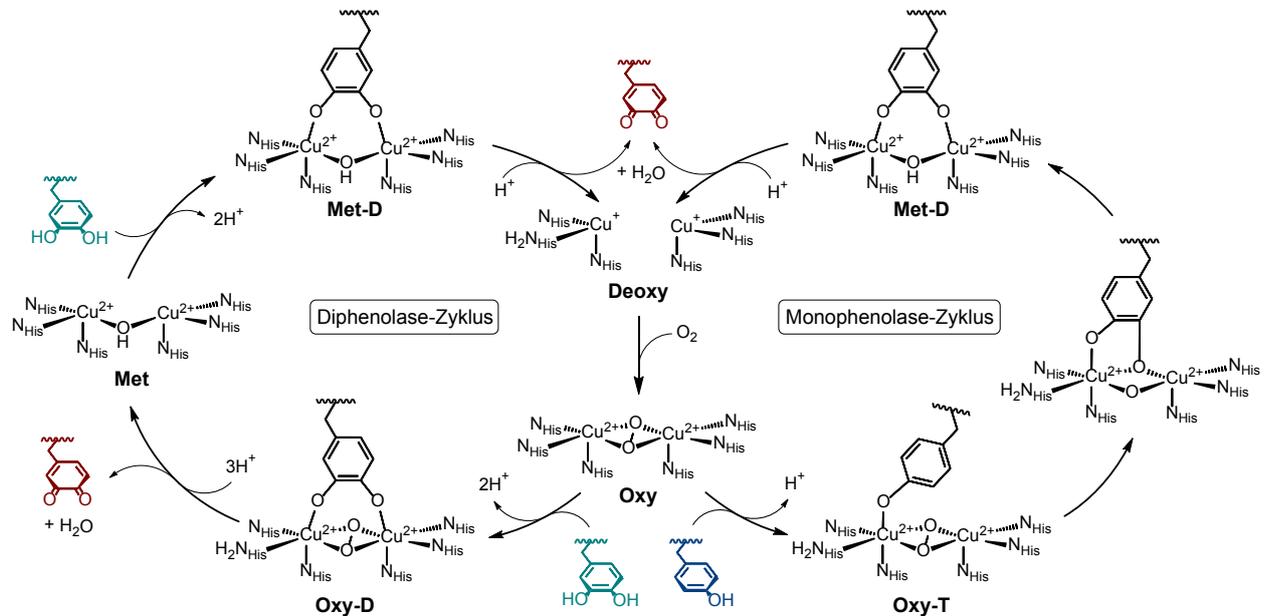
Auch ohne Oxidation trägt Dopa über nicht-kovalente Wechselwirkungen zur Kohäsion der Protein-Matrix bei. Studien an *Mcfp-1* haben gezeigt, dass Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen und  $\pi$ - $\pi$ -Stacking vorkommen und wesentlich die Kohäsion zweier beschichteter Glimmer-Oberflächen vermitteln.<sup>131</sup> Erstere Wechselwirkungen treten zwischen Dopa-Resten und positiv geladenen Amin-Resten, die 20 % der Aminosäurereste in mfp-1 ausmachen, auf und letztere werden zwischen den aromatischen Dopa-Resten ausgebildet. Weiterhin kann Dopa durch die Komplexbildung von Metallionen Kohäsion zwischen den Proteinen generieren. Fe- und Ca-Ionen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie und Elementaranalyse im Byssus von *Mytilus galloprovincialis* lokalisiert wobei festgestellt wurde, dass sie entscheidend zur Festigkeit von *Mgfp-1* beitragen.<sup>151</sup> Zusätzlich zu *Mytilus galloprovincialis* wurden auch in *Mcfp-1* von *Mytilus californianus* mittels *in situ* Resonanz-

Raman-Spektroskopie  $\text{Fe}^{3+}$ -Catecholato-Komplexe beobachtet.<sup>152</sup> Diese spielen für die Kohäsion des Byssus ebenso eine wichtige Rolle. Das konnte in Studien exemplarisch belegt werden, in denen nach Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen eine starke Erhöhung der Kohäsion zwischen *Mefp*-1 beschichteten Glimmer-Oberflächen festgestellt wurde.<sup>153</sup> Das liegt darin begründet, dass  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen mit Dopa besonders stabile Komplexe, mit einer der höchsten bekannten Stabilitätskonstanten für Metall-Ligand-Chelate ( $\log K_S \approx 35-44$ ), ausbilden.<sup>154</sup> In Abhängigkeit des pH Wertes und der damit einhergehenden Deprotonierung der Catechol-Hydroxyl-Gruppen werden dabei Mono-, Bis- oder Tris-Catecholato- $\text{Fe(III)}$ -Komplexe gebildet (Abbildung 2.6).<sup>155,156</sup> Da die Sekretion der mfps bei vergleichsweise niedrigem pH von 2.5 - 5.5 erfolgt,<sup>116,157</sup> liegen vorab gebundene  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen währenddessen hauptsächlich als Mono-Komplexe vor. Nach einem pH Sprung zu  $\sim 8$  bei Kontakt mit Meerwasser erfolgt die spontane Vernetzung über Bis- und Tris-Komplexe.<sup>155</sup> Darüber hinaus können  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen die Oxidation zu Dopachinon erleichtern, was neben der Autooxidation von Dopa bei erhöhtem pH<sup>144,158</sup> wiederum die Bildung kovalenter Vernetzungen fördert. Da die Oxidation von Dopa bei ähnlichem Potential wie die Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  erfolgt,<sup>159</sup> sind die Ionen in der Lage komplexierte Semichinon-Spezies zu generieren, die radikalisch vernetzen können.<sup>160</sup>

Ein weitere Strategie zur Kontrolle der Dopa Oxidation ist der Einsatz von Enzymen im Muschel Byssus. Dazu werden Polyphenoloxidasen (PPO) eingesetzt, die aus der Enzymklasse der Oxidoreduktasen stammen. Sie sind kupferhaltige Metalloproteine, die in der Lage sind die Reaktionen der Orthohydroxylierung von Phenolen zu Catecholen (Monophenolase-Aktivität) und der Dehydrogenierung von Catecholen zu *ortho*-Chinonen (Diphenolase-Aktivität) zu katalysieren.

Im Muschelfuß liegt latente Polyphenoloxidase zusammen mit mfps in heterogenen Sekretionsgranulen vor.<sup>108,161</sup> Sie wird bei der Sekretion über einen unbekanntem Mechanismus aktiviert und wirkt auf die Dopa-Reste der mfps.<sup>161</sup> Erste Studien an der Enzymdrüse der Miesmuschel haben demonstriert, dass Catecholoxidase-Aktivität vorhanden ist.<sup>162-164</sup> Später konnten die Catecholoxidase Enzyme im Muschelfuß<sup>165-168</sup>, Byssusfaden<sup>169</sup> und Plaque<sup>169</sup> identifiziert werden. Zur genauen Zusammensetzung der Byssus Enzyme ist bislang wenig bekannt. WAITE *et al.* haben eine aktive Form von Catecholoxidase aus dem Byssus von *Mytilus edulis* extrahiert, die aus 120 kDa großen Untereinheiten besteht und haben abgeleitet, dass diese eventuell aus latenter PPO entstanden ist.<sup>166</sup> Zudem konnten zwei weitere Catecholoxidasen mit hohem (174 kDa) und niedrigem (60 kDa) Molekulargewicht aus *Mytilus edulis* extrahiert werden.<sup>169</sup> Catecholoxidasen gehören ebenso wie Tyrosinasen zu den Polyphenoloxidasen, sind aber auf Diphenolase-Aktivität beschränkt. Tyrosinasen besitzen zusätzlich Monophenolase-Aktivität und können daher zur Oxidation von Dopa, aber auch

zur Generierung von Dopa aus Tyrosin eingesetzt werden. Auch wenn bisher keine Tyrosinasen aus dem Byssus identifiziert werden konnten, so wurden im Transkriptom des Muschelfußes 5 zu verschiedenen Tyrosinasen homologe Proteinsequenzen gefunden.<sup>170</sup> Bei einer weiteren aus dem Muschelfuß von *Mytilus edulis* extrahierten PPO mit einem Monomer-Molekulargewicht von 34 kDa wurde zumindest eine geringe Aktivität bezüglich Phenolen wie Tyrosin festgestellt.<sup>167</sup>



**Abbildung 2.7.** Mechanismus der Tyrosinase katalysierten Oxidation von Mono- und *ortho*-Diphenolen. Edukte sind Tyrosin (blau) und Dopa (türkis). Als Produkt der katalysierten Reaktionen wird Dopachinon (rot) gebildet.

Tyrosinase besitzt ein nahezu allgegenwärtiges Vorkommen in Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien.<sup>171</sup> Sie gehört dem Typ 3 der Kupferenzyme an und besetzt ein aktives Zentrum aus antiferromagnetisch gekoppeltem binuklearem Kupfer. Während des katalytischen Zyklus liegt das aktive Zentrum in drei verschiedenen Formen vor (Abbildung 2.7), die je nach Oxidationszustand der Kupferatome und An- oder Abwesenheit von Sauerstoff als Met, Oxy oder Deoxy bezeichnet werden. Der auf die Substrate zu übertragende Sauerstoff stammt dabei aus gelöstem molekularem Sauerstoff.<sup>172</sup>

In der Deoxy-Form sind die Kupferatome zu Cu<sup>+</sup> reduziert. Sie werden durch das Binden von molekularem Sauerstoff in den Oxidationszustand Cu<sup>2+</sup> überführt und es bildet sich die Oxy-Form. In dieser ist der Sauerstoff als Peroxid in einem μ-η<sup>2</sup>:η<sup>2</sup> „side-on“ Bindungsmodus koordiniert, wodurch die O-O-Bindung destabilisiert und somit aktiviert wird.<sup>173</sup> Nach Bindung der Tyrosin- oder Dopa-Substrate an die Oxy-Form, werden die katalytischen Mono- bzw. Diphenolase-Zyklen initiiert.

Im Monophenolase-Zyklus erfolgt zunächst eine Koordination von Tyrosin an ein Cu<sup>2+</sup>-Zentrum, wodurch der Oxy-T-Komplex gebildet wird. Es folgt eine *ortho*-Hydroxylierung zu Dopa über den

Met-D-Komplex und anschließend eine  $2e^-$ -Oxidation zu Dopachinon. Dieses wird freigegeben, wodurch die Deoxy-Form des aktiven Zentrums ausgebildet wird. Es erfolgen für Tyrosin also immer zwei gekoppelte Oxidationsschritte zum Dopachinon und keine Freigabe von Dopa während des katalytischen Zyklus.<sup>174</sup>

Im Diphenolase-Zyklus wird durch die Bindung von Dopa zunächst der Oxy-D-Komplex gebildet. Nach einer  $2e^-$ -Oxidation wird Dopachinon frei und das aktive Zentrum liegt in der Met-Form vor. Von dieser wird angenommen, dass sie der Ruhezustand der Tyrosinase ist in dem kleinen Liganden, wie Wasser oder Hydroxidionen an die  $Cu^{2+}$ -Atome, gebunden sind. Um erneut Sauerstoff binden und damit Tyrosin als Substrat oxidieren zu können, muss vorerst ein weiteres Dopa-Substrat oxidiert und die Deoxy-Form regeneriert werden. Das führt zu einer sogenannten Induktionsphase (auch *lag*-Phase) um das aktive Zentrum von der, bezüglich der Tyrosin-Aktivität, ruhenden Met- in die aktive Deoxy-Form zu überführen. Das geschieht wie erwähnt durch die Reaktion mit *o*-Diphenolen. Die Induktionsphase wird demzufolge mit steigender Dopa-Konzentration autokatalytisch beschleunigt. Aber auch durch Zugabe von diphenolischen Aktivatoren wie Ascorbinsäure kann die Induktionsphase verkürzt werden.<sup>175</sup>

Wegen der Mono- und Diphenolase-Aktivität sowie der guten Verfügbarkeit von Tyrosinase wurde sie in einer Vielzahl von Studien für die Oxidation von Tyrosin oder Dopa in mfps eingesetzt.<sup>139,176-188</sup>

## 2.6 Muschel-inspirierte Materialien

Aufgrund der außerordentlichen adhäsiven Eigenschaften von Muscheln in wässriger Umgebung dienen die Proteine des Muschelfußes als Inspiration für zahlreiche Bestrebungen biomimetische Materialien zu entwickeln. Insbesondere Dopa, das zum großen Teil für die einzigartigen Eigenschaften der mfps verantwortlich ist und durch seine Vielseitigkeit möglicher Wechselwirkungen auffällt, geriet dabei in den Fokus dies zu realisieren. Daher wurden in den letzten Jahrzehnten viele Dopa- oder catecholhaltige Polymere entwickelt. Erste Beispiele für Muschel-inspirierte Polymere reichen bis in die 80er Jahre zurück und beinhalten synthetische Polypeptide und Copolypeptide, die durch Polykondensation von Aktivestern<sup>39,189-191</sup> oder Ringöffnungspolymerisation von N-Carboxyanhydriden (NCA)<sup>190,192-195</sup> hergestellt wurden. Die dabei entstandenen Polypeptide bestanden einerseits aus sich wiederholenden Di-, Tri- oder Tetrapeptid-Einheiten aus Dopa und Lysin<sup>189</sup> oder aus Tyrosin und Lysin sowie weiteren Aminosäuren.<sup>191</sup> Neben kürzeren Peptideinheiten wurden auch Decapeptide der *Mefp*-1 Konsensussequenz mittels Polykondensation zu längeren Polypeptiden polymerisiert.<sup>39,190,191</sup> Andererseits waren auch statistische Copolypeptide aus Lysin und Dopa<sup>190,194,195</sup> oder Lysin und Tyrosin<sup>192,193</sup> zugänglich. Die Tyrosin-Reste wurden in verschiedenen

Studien durch enzymatische Reaktion mit Tyrosinase oxidiert, um die Polypeptide miteinander zu vernetzen und somit dreidimensionale Netzwerke aufzubauen.<sup>191-193</sup>

Abgesehen von synthetischen Polypeptiden, erfolgte ebenfalls die rekombinante Produktion von mfps, um eine detailgetreue Nachbildung der natürlichen Proteine zu erzeugen. Diese wurde in verschiedenen Wirten wie Bakterien, Hefen, Insektenzellen und Muschelprimärzellen durchgeführt.<sup>38</sup> Die ersten Versuche rekombinante mfps zu erzeugen konzentrierten sich auf *Mefp*-1 und resultierten in Proteinen, die in *Escherichia coli* Bakterien produziert wurden und 6 - 20 Wiederholungen der Konsensus Decapeptidsequenz aufwiesen.<sup>178,186,187</sup> Die Expression in Hefezellen von *Saccharomyces cerevisiae* führte zu einem rekombinanten *Mefp*-1, das bis zu 80 Wiederholungen des Decapeptids trug und ein Molekulargewicht von 24 - 94 kDa aufweisen konnte.<sup>182</sup> Mfp-3 und mfp-5 der Spezies *Mytilus galloprovincialis* wurden als Fusionsproteine mit einem Hexahistidin-Affinitäts-TAG, zur verbesserten Aufreinigung über Affinitätschromatografie, ebenfalls in *E. coli* Bakterien exprimiert.<sup>177,184,185</sup> Darüber hinaus wurde eine Reihe von Hybridproteinen konstruiert, die Peptidsequenzen verschiedener mfps oder anderer Proteine kombinieren, um deren Eigenschaften zu verbessern. So wurden beispielsweise ABA Block-Copolymere aus mfp-1 und mfp-5 (fp-151)<sup>180</sup> sowie mfp-1 und mfp-3 (fp-131)<sup>181</sup> exprimiert, bei denen die beiden Termini von mfp-5 bzw. mfp-3 jeweils mit mehreren Wiederholungen der mfp-1 Konsensussequenz erweitert wurden. Ein ähnliches Hybridprotein bestehend aus mfp-3 und mfp-5 (fp-353) konnte ebenfalls exprimiert werden und wies im Vergleich zu den einzelnen rekombinanten mfp-3 und mfp-5 eine erhöhte Löslichkeit auf, wodurch Adhäsionstests ermöglicht wurden.<sup>183</sup> Darüber hinaus formten Hybridproteine aus mfp-3 bzw. mfp-5 mit CsgA Proteinen aus *E. coli*, welche die Amyloid Fibrillen der Bakterien bilden, selbstorganisierende Nanofasern, die bis zu 3 mal höhere Adhäsionsenergien als die entsprechenden rekombinanten mfps aufwiesen.<sup>188</sup> Auch wenn dies das Potential jener Verfahren verdeutlicht, so birgt die rekombinante Herstellung von mfps den Nachteil, dass eine Post-Modifikation der Tyrosine mit Tyrosinase stattfinden muss, um funktionale adhäsive Proteine zu erzeugen. Das ist, bedingt durch schlechte Löslichkeit und Aggregation der Proteine bei neutralem pH Wert, schwierig umzusetzen und führt zu einem geringen Umsatz der *in vitro* Modifizierung mit 1 - 2 mol-% Dopa.<sup>38</sup> Zudem ist die praktische Anwendung häufig durch geringe Ausbeuten bei Produktion und Reinigung sowie geringe Löslichkeit nach der Reinigung limitiert.

Der Großteil der Arbeiten zu Muschel-inspirierten Materialien basiert daher auf synthetischen Polymeren, die Dopa oder Catechol-Einheiten tragen. Sie kombinieren die Catechol-Chemie der mfps mit der Flexibilität sowie der einfachen und kostengünstigen Synthese von einfachen Bulk-Polymeren. Das Peptidrückgrat ist dabei substituiert und die funktionalen Peptidreste, bis auf Dopa, entfallen,

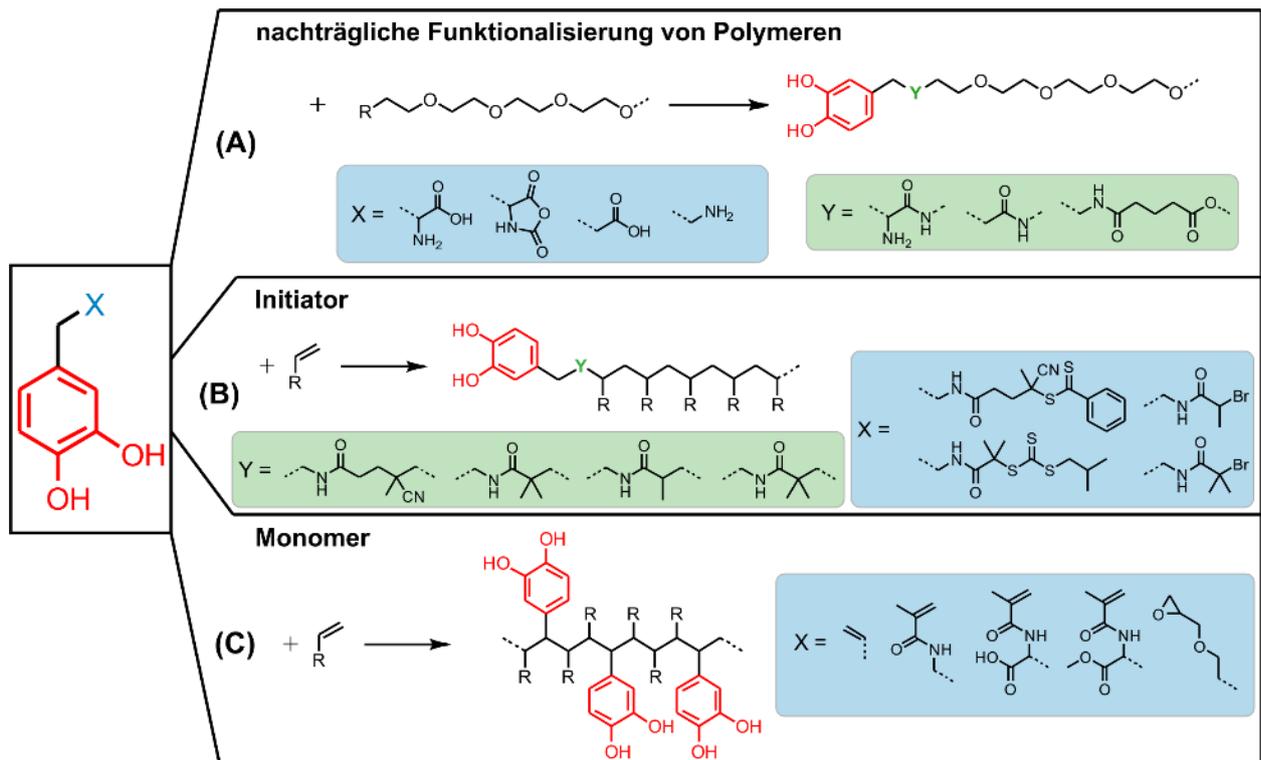
was die Komplexität verringert. Ein Möglicher Ansatz zur Realisierung solcher Systeme ist die direkte Funktionalisierung von Polymeren über Reaktion von funktionellen Gruppen wie Aminen, Carboxylen oder Hydroxylen mit Dopa oder Dopamin (Abbildung 2.8, A). Dafür können Polymere wie beispielsweise lineares oder verzweigtes Polyethylenglykol (PEG),<sup>9,14,16-18,196-198</sup> oder Polyallylamin<sup>24</sup> genutzt werden und mit Catechol-tragenden Molekülen funktionalisiert werden. PEG ist aufgrund seiner physiologischen Verträglichkeit, Inertheit und guten Wasserlöslichkeit ein beliebtes Polymer für derartige Untersuchungen und kann in Kombination mit adhäsiven Catechol-Funktionalitäten häufig für Antifouling Beschichtungen<sup>11-15</sup> oder biomedizinische Gewebekleber<sup>16-21</sup> eingesetzt werden. Nicht nur Dopa, sondern auch Dopa-haltige Oligopeptide als kurze mfp-Analoga, wurden mit PEG zu Peptid-PEG Konjugaten verknüpft.<sup>14,199-201</sup> Weiterhin zeigten Catechol-funktionalisierte Blockcopolymere aus PEG und anderen Polymeren wie Polycaprolacton,<sup>202,203</sup> Polypropylenoxid,<sup>13,21</sup> Polymethacrylat<sup>204</sup> und PMMA<sup>205</sup> verbesserte Materialeigenschaften hinsichtlich Wärmeempfindlichkeit<sup>13</sup> und Quellung<sup>21</sup> sowie Selbstorganisation der hydrophoben Blöcke<sup>202,203</sup>.

Ebenfalls zu terminal funktionalisierten Polymeren führt der Einsatz von Catechol-modifizierten Initiatoren für kontrolliert radikalische Polymerisationsmethoden (Abbildung 2.8, B). So wurden RAFT-Reagenzien mit Dopamin funktionalisiert und führten zu monofunktionalen Catechol-modifizierten Polymeren wie Polystyrol, Poly(*N*-isopropylacrylamid) und Poly(*tert*-butylacrylat).<sup>206,207</sup> Ebenso konnte ATRP zur Herstellung Muschel-inspirierter Polymere eingesetzt werden, indem Dopamin oder Dopa mit Bromalkylen funktionalisiert und als Initiator eingesetzt wurde.<sup>208-211</sup> Als Monomere kamen Methylmethacrylat mit Oligo(ethylenglykol)-Seitenketten<sup>208,209</sup>, Carboxybetainmethacrylat<sup>210,211</sup> und Sulfobetainmethacrylat<sup>211,212</sup> zum Einsatz, deren Polymere für Antifouling-Beschichtungen genutzt wurden. Analog zu funktionalisierten PEG-Polymeren konnte statt eines einzelnen Dopa-Moleküls auch eine kurze Tripeptideinheit (Dopa-Lys-Dopa) als mit Bromalkyl funktionalisierter Initiator für ATRP eingesetzt werden.<sup>212</sup> Weiterhin gelang auch die Synthese von Poly(pentadecafluorooctyl-5-norbornen-2-carboxylat) über ROMP mit einem Norbornen modifizierten Dopamin-Initiator.<sup>213</sup> Bei diesen Methoden wurde häufig der „grafting from“ Ansatz gewählt, bei dem der adhäsive Initiator an einer Metalloberfläche gebunden war, von dem aus die Polymerisation gestartet wurde und zur Ausbildung von Bürstenpolymeren geführt hat.<sup>207-</sup>

<sup>209,212,213</sup>

Eine weitere Strategie zur Synthese Muschel-inspirierter Polymere ist die Nutzung von Catechol-modifizierten Monomeren (Abbildung 2.8, C). So konnte Methacrylamid-funktionalisiertes Dopa<sup>214-217</sup> und Dopamin<sup>22,23,216,218</sup> als Monomer für freie radikalische Polymerisation von Homo-<sup>216,217</sup> und Copolymeren<sup>22,23,214-218</sup> eingesetzt werden. Eine besondere Anwendung von Dopa-tragenden

Polymeren stellt ein Copolymer aus Dopamin Methacrylamid und Methoxyethylacrylat dar, das als dünne Schicht auf eine Anordnung von Nanosäulen aufgebracht und für reversible Adhäsion in feuchter Umgebung eingesetzt wurde.<sup>23</sup> Damit wurde ein bio-inspirierter Hybridkleber geschaffen, der die Nanostruktur von Geckfüßen mit der chemischen Beschaffenheit der Muschelproteine vereint. Die Catechol-Funktionalitäten erhöhten die Nasshaftung des Materials um das 15-fache, das über tausend Kontaktzyklen standhielt. Das zeigt, dass bereits relativ einfache mfp-Analoga die Klebeeigenschaften von Polymeren deutlich verbessern können.



**Abbildung 2.8.** Strategien zur Synthese von synthetischen catecholhaltigen Polymeren. (A) Nachträgliche terminale Funktionalisierung von Polymeren erfolgt über Reaktion von Catechol-tragenden Molekülen mit endständigen Amin- oder Carboxyl-Gruppen des Polymers. (B) Mit einer Catechol-Funktionalität modifizierte Initiatoren werden für kontrolliert radikalische Polymerisation eingesetzt und führen zu terminal funktionalisierten Polymeren. (C) Über freie radikalische Polymerisation werden Catechol-funktionalisierte Monomere polymerisiert. Die hier dargestellten Strukturen sind in vereinfachter Form ohne Schutzgruppenchemie gezeigt.

Neben Acrylamid-basierten Polymeren kamen kürzlich auch Catechol-modifizierte Epoxidmonomere zum Einsatz.<sup>219</sup> Diese Catecholglycidylether wurden mit Ethylenoxid und Glycidol copolymerisiert und führten zu linearen Polyethylenglykol- und hyperverzweigten Polyglycerol-Copolymeren, die nach Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen pH induziert quervernetzte Hydrogele bildeten.

Weiterhin wurden Polymere auf Styrolbasis durch die Polymerisation von 3,4-Dihydroxystyrol-Monomeren hergestellt. Häufig genutzte Polymersysteme stellen Copolymere aus Styrol und 3,4-Dihydroxystyrol dar,<sup>8,220-223</sup> aber auch andere Monomere wie das Oligoethylenglykol-Monomer 4-Vinylbenzyl[methyltetra(ethylenglykol)]<sup>224</sup>, 4-Styrolsulfonat<sup>225</sup> oder kationisches

4-Vinylbenzyltriethylammoniumchlorid<sup>226</sup> wurden zur Copolymerisation mit 3,4-Dihydroxystyrol eingesetzt. Letzteres Copolymer versucht, neben der Catechol-Funktionalität mit Ähnlichkeit zu Dopa, auch die positiv geladenen Aminosäurereste von Lysin und Arginin, die zu großen Teilen in mfps vorkommen, nachzuahmen. Während der überwiegende Anteil der Studien freie radikalische Polymerisation nutzt, konnte auch die anionische Polymerisation von 3- und 4-Vinylcatecholen zu Block- und Gradient-Copolymeren mit Styrol umgesetzt werden.<sup>227</sup> Auf dem Gebiet der styrolbasierten Polymere sind WILKER *et al.* besonders aktiv und haben zur Erweiterung des Kenntnisstands erheblich beigetragen. Sie variierten Molekulargewichte und Catechol-Anteile von Poly[(3,4-dihydroxystyrol)-*co*-styrol] und stellten fest, dass die Adhäsion zu Aluminiumoberflächen mit steigendem Molekulargewicht im untersuchten Bereich bis 110 kg/mol zunimmt.<sup>220</sup> Wenn die Polymere jedoch mittels Tetrabutylammoniumperiodat quervernetzt wurden, stellte sich ein Adhäsionsmaximum bei  $M_w \approx 50 - 65$  kg/mol mit leicht erhöhter Adhäsion im Vergleich zu nicht vernetztem Polymer ein. Darüber hinaus ergaben Studien, dass eine optimale Adhäsion bei einem Catecholgehalt von 33 mol-% auftrat,<sup>222</sup> was ungefähr dem Dopa-Anteil in den Muschelproteinen mit höchster Adhäsionskraft und höchstem Dopagehalt, mfp-3 und mfp-5, entspricht. Ein Vergleich der Unterwasser-Klebkraft des styrolbasierten Muschel-inspirierten Polymers mit kommerziellen Klebern ergab zudem, dass das catecholhaltige System üblichen Klebern wie Epoxidharzen, Polyurethan- oder Polyacrylatklebstoffen, mit ca. drei Mal so hoher Scherfestigkeit wie der stärkste Epoxidkleber, überlegen ist.<sup>8</sup> Dies verdeutlicht, dass die Inspiration durch biologische Systeme die Entwicklung von Klebstoffen vorantreibt und dazu verhilft das Potenzial zu Verbesserung von Materialeigenschaften weiter auszuschöpfen. Allerdings ist die Synthese solcher Polymersysteme, obwohl eine vereinfachte Struktur erhalten wird, nicht immer trivial und in den meisten Fällen müssen Schutzgruppen für die Catecholfunktion eingesetzt werden. Andernfalls besteht die Gefahr, dass während der Synthese Nebenreaktionen auftreten, die aus radikalischen Reaktionen sowie Oxidation und daraus folgende Quervernetzung von Dopa und Dopachinon folgen. Das ist auch für die Lagerstabilität von catecholhaltigen Polymeren problematisch und schränkt zum Teil die praktische Anwendung ein. Zudem bewirkt eine Vereinfachung der chemischen Zusammensetzung, dass weitere strukturelle Merkmale und Funktionalitäten von mfps vernachlässigt werden, die neben Dopa für die herausragenden Eigenschaften der Muschelproteine mitverantwortlich sind.

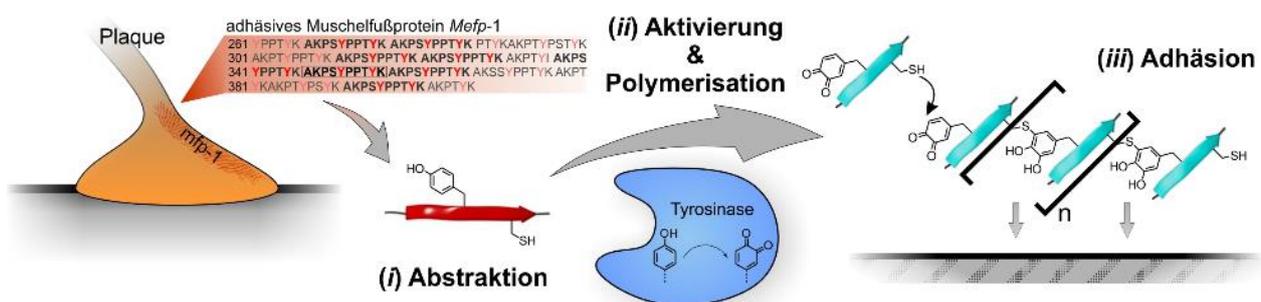
Ein weiterer Nachteil der synthetischen Polymersysteme ist, dass sie wasserunlöslich sind und daher organische Lösungsmittel eingesetzt werden müssen, um den Klebstoff auf ein Substrat aufzutragen. Das würde dazu führen, dass giftige Substanzen ins Ökosystem gelangen würden. So wurden beispielsweise für die Klebung von Aluminiumsubstraten unter Wasser 3,4-Dihydroxystyrol

Copolymere in Chloroform gelöst auf die Substrate aufgetragen.<sup>8,226</sup> Durch die höhere Dichte des Chloroforms verglichen zu Wasser, konnte sich die Polymerlösung auf dem Substrat absetzen und adhäsive Bindungen ausbilden. Mit wasserbasierten, wasserlöslichen Polymeren kann auf den Einsatz von toxischen organischen Lösungsmitteln verzichtet werden, wodurch ökologisch unbedenkliche Anwendungen ermöglicht werden.

### 3 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit soll ein Polymerisationsverfahren entwickelt werden, das zu adhäsiven wasserbasierten Muschel-inspirierten Polymeren führt. Diese sollen, im Gegensatz zu den meisten synthetischen bio-inspirierten Polymeren, die Diversität der Protein-Funktionalitäten nicht vernachlässigen. Gleichzeitig soll das Verfahren einfach durchzuführen sein und einen geringen Arbeits- und Aufreinigungsaufwand erfordern, wodurch es sich von rekombinanten Verfahren zur Herstellung von Proteinen oder der Extraktion natürlicher Proteine unterscheidet. Daher sollen in einem einstufigen bio-inspirierten Prozess Oligopeptide (Unimere) durch enzymatische Reaktion zu längeren Proteinanaloga verknüpft und adhäsive Dopa-Funktionalitäten generiert werden. Das geschieht durch Tyrosinase-vermittelte Oxidation von Tyrosin zu Dopachinon, das dann, in Analogie zu Prozessen der Aushärtung von mfps im Byssus, über die Addition der Thiolgruppe aus Cystein zu Unimer-verknüpfenden Cysteinyl-dopa-Gruppen reagiert (Abbildung 3.1).

Auf Basis der *Mefp-1* Konsensussequenz sollen Unimere entwickelt werden, die für das Polymerisationsverfahren geeignet sind. Dies setzt eine Erweiterung der Sequenz mit Cystein und eine enzymatische Aktivierbarkeit der Tyrosin-Reste durch Tyrosinase voraus. Aktivierungsstudien sollen dazu verhelfen die bestmögliche Unimerstruktur und optimalen Aktivierungsbedingungen zu finden. Die erhaltenen Polymere sollen charakterisiert und hinsichtlich ihres Beschichtungs- und Adhäsionsverhaltens untersucht werden.



**Abbildung 3.1.** Schema der Muschel-inspirierten Polymerisation. **(i)** Die Konsensussequenz von *Mefp-1* wird abstrahiert und mit Cystein erweitert, um die Basis der Unimere zu bilden. **(ii)** Die Polymerisation der Unimere wird durch enzymatische Oxidation von Tyrosin zu Dopachinon initiiert, das mit Thiol-Gruppen der Cystein-Reste reagiert und zur Bildung von Cysteinyl-dopa-Bindungen führt. **(iii)** Die erhaltenen mfp-Analoga können durch die Dopa-Funktionalitäten starke Haftung auf verschiedenen Substraten erreichen und somit für Beschichtungen oder Klebstoffe eingesetzt werden.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

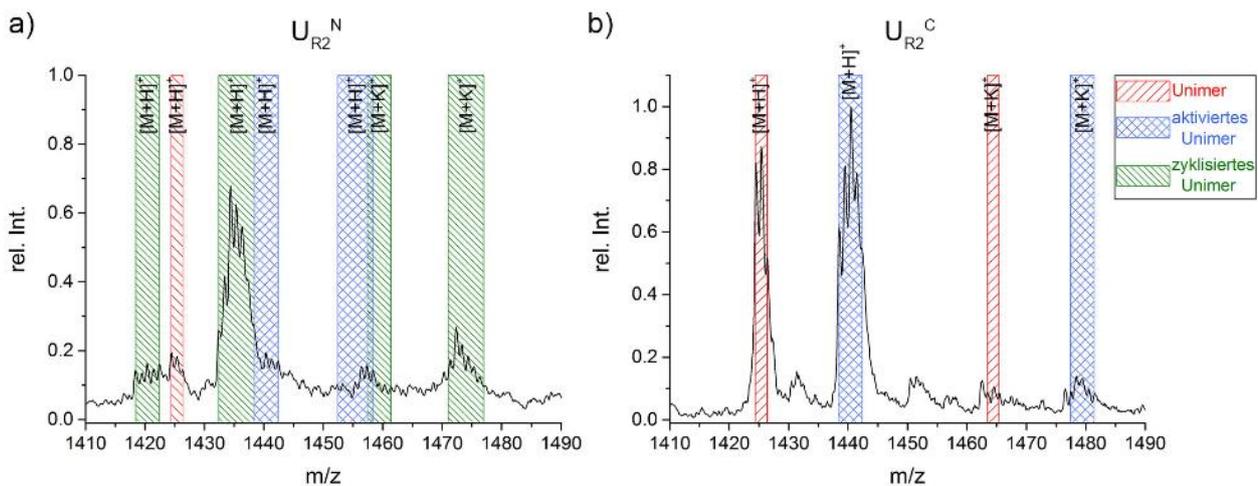
### 4.1 Studien zur enzymatischen Aktivierbarkeit von Unimeren

#### 4.1.1 Position der Cysteinerweiterung

Der Aufbau der polymerisierbaren peptidbasierten Makromonomere (Unimere) sollte auf der unmodifizierten Konsensussequenz AKPSYPPTYK des *Mefp-1* Muschelfußproteins basieren. Ursächlich dafür war zum einen, dass die enzymatische Aktivierbarkeit der Tyrosine in dieser Peptidsequenz bekannt ist.<sup>143,179,200,228,229</sup> Zum anderen lag nahe, dass eine Polymerisation der Konsensussequenz zu einem Produkt führen würde, das in seinen Eigenschaften dem Muschelfußprotein *Mefp-1* ähnlich ist. Da das Decapeptid der Konsensussequenz kein Cystein enthält, wurde die Sequenz um ein Cystein erweitert, um polymerisierbare Unimere zu erhalten. Dieses wurde über einen Glycin-Spacer mit der Konsensussequenz verbunden. Der Glycin-Spacer erhöht den Abstand der Thiolgruppe des Cysteins zu den Seitenkettenfunktionalitäten der Tyrosine, beziehungsweise der Dopa-Einheiten. Somit sollte das Risiko einer intramolekularen Michael-Addition minimiert werden, die zu einer Endgruppenzyklisierung anstelle von einer Polymerisation führen würde. Darüber hinaus könnten die erhöhte Flexibilität und die reduzierte sterische Belastung des Cysteins zu schnellen Additionsraten beitragen. Weiterhin wurden die Lysine aus der nativen *Mefp-1* Konsensussequenz durch Arginine ersetzt, um mögliche Nebenreaktionen der Amine der Lysin-Seitenketten mit Dopachinon auszuschließen. Aufgrund der guten und kostengünstigen Verfügbarkeit, wurden die ersten Untersuchungen mit kommerziell erwerblicher Tyrosinase durchgeführt.

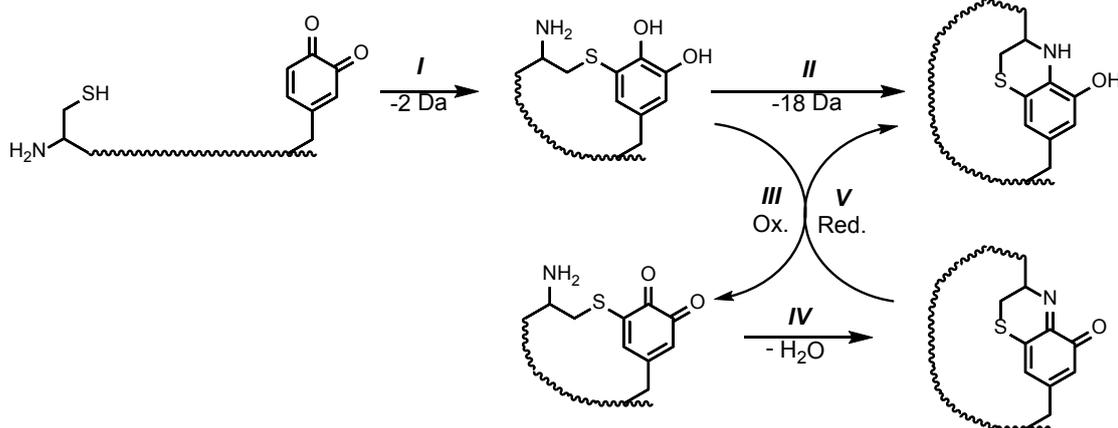
In Vortests sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Spacerlänge und die Position der Cystein-Erweiterung auf das Aktivierungsverhalten der Unimere haben. Denkbar ist die Erweiterung an der *N*-terminalen sowie der *C*-terminalen Position des Decapeptides. Dazu wurden die beiden Unimere  $U_{R_2^N}$  (CGGARPSYPPTYR) und  $U_{R_2^C}$  (ARPSYPPTYRGGC) mit 100 U/mL kommerzieller Tyrosinase in 17 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.5) umgesetzt und die Aktivierung mittels MALDI-TOF-MS verfolgt. In Abbildung 4.1 sind die MALDI-Spektren nach 1 h Reaktionszeit abgebildet. Bei der enzymatischen Aktivierung von  $U_{R_2^C}$  (Abbildung 4.1b) ist wie zu erwarten eine Oxidation von Tyrosin zu Dopa und Dopachinon zu sehen, die durch Signale mit +16 und +14 Da (blau schattiere Bereiche) gegenüber dem nicht-aktivierten Unimer sichtbar ist. Obwohl die Sequenz von  $U_{R_2^C}$  zwei Tyrosine beinhaltet, ist nur eine einfache Oxidation zu erkennen. Im Bereich, der einer

Peptidmodifikation mit zwei Dopachinon- oder Dopa-Einheiten entspricht (+28/32 Da gegenüber dem nicht-aktivierten Unimer), sind keine weiteren Signale zu erkennen. Im Spektrum der  $U_{R2}^N$  Aktivierung (Abbildung 4.1a) sind hingegen die Signale der aktivierten Spezies sehr schwach ausgeprägt. Stattdessen werden deutliche Signale mit -6/-4 Da und +8/+12 Da (grün schattierte Bereiche) gegenüber dem nicht-aktivierten Unimer beobachtet. Diese entsprechen einer einfachen bzw. zweifachen Oxidation der Tyrosine (+14/+28 Da) mit anschließender intramolekularer Additionsreaktion (-2 Da) und Kondensation (-18 Da). Dabei tritt eine Addition des Cystein-Thiols an eine Dopachinon-Seitenkettenfunktion auf, die zu einer Zyklisierung des Unimers führt. Die Kondensation verläuft vermutlich durch eine Reaktion mit dem freien *N*-terminalen Amin des Cysteins zu einem 5-Hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzothiazin-Derivat (Abbildung 4.2).<sup>230</sup> Durch die Intramolekulare Cysteinyl-dopa-Addition steht keine freie Thiolgruppe mehr zur Verfügung und eine Polymerisation des Unimers ist inhibiert. Ob eine Thiol-Addition ans Dopachinon in Position 5 oder 9 stattfindet, kann in dem Experiment nicht festgestellt werden.



**Abbildung 4.1.** MALDI-TOF-MS-Spektren der Aktivierung von  $U_{R2}^N$  und  $U_{R2}^C$ . a) Das Spektrum des *N*-terminal erweiterten Unimers  $U_{R2}^N$  weist intramolekular zyklisierte Spezies auf. b) Das Spektrum des *C*-terminal erweiterten Unimers  $U_{R2}^N$  zeigt hauptsächlich einfach aktivierte Spezies sowie nicht-aktivierte Spezies. (Bedingungen: 0.25 mM Unimer, 100 U/mL kommerzielle Tyrosinase in Kaliumphosphatpuffer (17 mM, pH 6.5), 1 h Reaktionszeit; Messung in  $\alpha$ -CHCA Matrix).

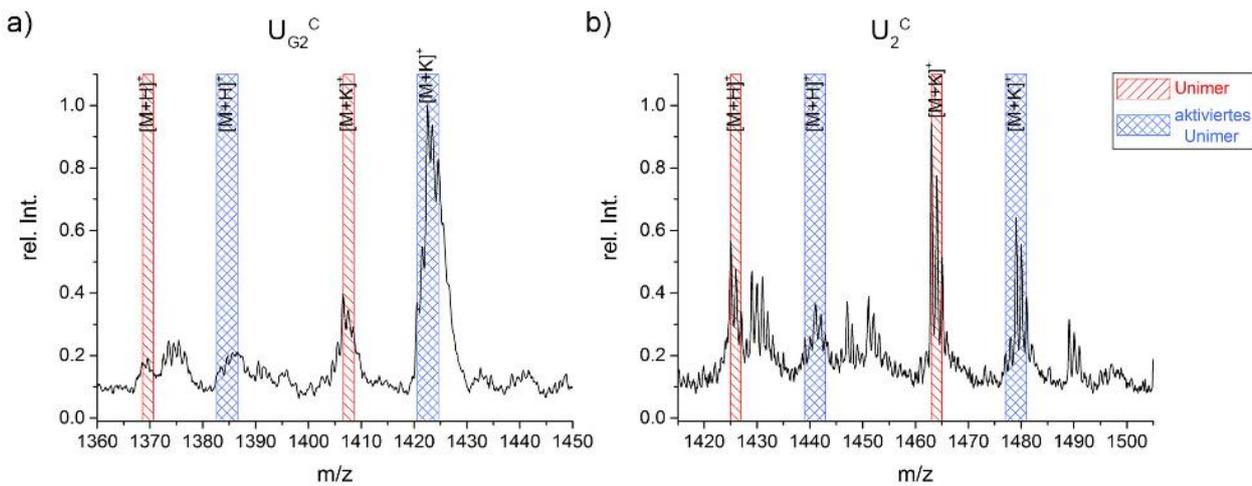
Die Signale des nicht-aktivierten Unimers (rot schattierte Bereiche) bei  $U_{R2}^C$  sind deutlich intensiver als bei  $U_{R2}^N$ . Zudem zeigen die Spektren, dass bei  $U_{R2}^N$ , im Gegensatz zu  $U_{R2}^C$ , zu einem geringen Teil beide Tyrosine oxidiert werden. Nichtsdestotrotz findet bei der Aktivierung von  $U_{R2}^N$  eine Zyklisierung statt, die eine effektive Polymerisation verhindern würde. Daher wurde davon abgesehen Unimere mit *N*-terminaler Cystein-Erweiterung für die Polymerisation einzusetzen.



**Abbildung 4.2.** Reaktionsschema der intramolekularen Zyklisierung und Kondensation von  $U_{R_2}^N$ . *I* Intramolekulare Cysteinyldopa-Addition. Es folgt ein Kondensationsschritt (*II*) durch Reaktion mit dem freien Amin des *N*-Terminus, das nach Oxidation des Dopa-Derivats zum Dopachinon-Derivat (*III*) ein Imin unter Wasserabspaltung bildet (*IV*). Durch Reduktion (*V*) kommt es zur Bildung des 5-Hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzothiazin-Derivats. Gewellte Linien repräsentieren das Peptidrückgrat.

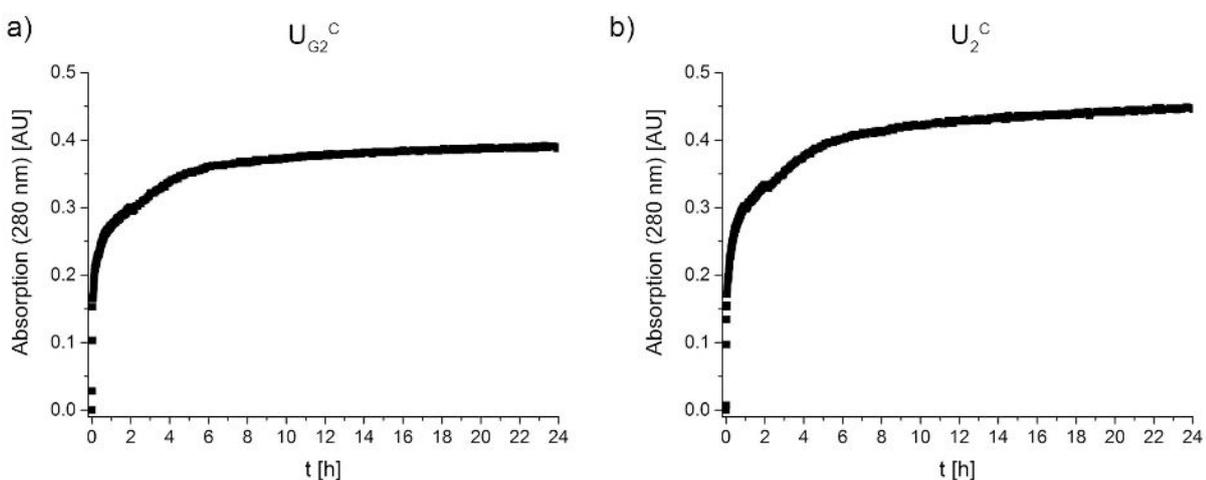
#### 4.1.2 Länge des Glycin-Spacers

Um den Einfluss der Spacerlänge auf das Aktivierungsverhalten zu untersuchen, wurden die beiden Unimere  $U_{G_2}^C$  (AKPSYPPTYKGGC) und  $U_2^C$  (AKPSYPPTYKGGGC) verwendet, die jeweils einen Diglycin- bzw. Triglycin-Spacer für die *C*-terminale Separation des Cysteins von der Konsensussequenz enthalten. Wie in der ursprünglichen Konsensussequenz von *Mefp*-1, enthalten die Peptide Lysin. Dadurch kann zusätzlich untersucht werden, ob durch die Amine der Lysin Seitenketten Nebenreaktionen, wie intramolekulare Addition an Dopachinon, auftreten. Analog zu den vorherigen Aktivierungsstudien wurden die gleichen Bedingungen für die enzymatische Reaktion gewählt und die Aktivierung mittels MALDI-TOF-MS verfolgt (Abbildung 4.3). Den Spektren ist zu entnehmen, dass das Aktivierungsverhalten der beiden Unimere ähnlich ist. Beide Spektren enthalten nach 1 h Reaktionszeit Restsignale nicht-aktivierter Unimere und ausschließlich Signale der oxidierten Spezies mit einer Tyrosin-Modifikation zu Dopachinon oder Dopa (+14/+16 Da). Eine Aktivierung beider Tyrosine wird, wie bei dem Arginin enthaltenden Unimer  $U_{R_2}^C$ , nicht beobachtet. Ebenfalls spielt bei den beiden Lysin tragenden Unimeren  $U_{G_2}^C$  und  $U_2^C$  eine intramolekulare Zyklisierung keine Rolle. Das würde sich in Signalen von -2 Da bzw. mit Wasserabspaltung von zusätzlich -18 Da bezüglich des aktivierten Unimers zeigen, die bei dem Aktivierungsexperiment nicht beobachtet werden. Folglich wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit Unimere basierend auf der ursprünglichen lysinhaltigen Konsensussequenz AKPSYPPTYK verwendet.



**Abbildung 4.3.** MALDI-TOF-MS-Spektren der Aktivierung von  $U_{G_2^C}$  und  $U_2^C$ . a) Unimer  $U_{G_2^C}$  mit Diglycin-Spacer. b) Unimer  $U_2^C$  mit Triglycin-Spacer. Beide Spektren weisen sowohl nicht-aktivierte Unimere als auch einfach aktivierte Unimer-Spezies auf. Es werden keine Signale zweifach aktivierter Spezies beobachtet. (Bedingungen: 0.25 mM Unimer, 100 U/mL kommerzielle Tyrosinase in Kaliumphosphatpuffer (17 mM, pH 6.5), 1 h Reaktionszeit; Messung in  $\alpha$ -CHCA Matrix).

Der Einfluss der Spacer-Länge auf die Aktivierungskinetik wurde zudem mit UV/VIS-Spektroskopie untersucht. Dazu wurde die enzymatische Aktivierung der Unimere zeitaufgelöst gemessen und die Oxidation von Tyrosin zu Dopa beim Absorptionsmaximum von 280 nm verfolgt (Abbildung 4.4).<sup>231</sup> Auch in diesem Experiment sind sich die Spektren ähnlich. Um ein vergleichbares Maß für die Aktivierungsdauer zu bestimmen, wurde der Zeitpunkt  $t_{50}$ , zu dem die Absorption 50 % der Endabsorption bei 24 h beträgt, bestimmt. Von je drei Messungen wurde  $t_{50}$  bestimmt und der Mittelwert berechnet, woraus sich Aktivierungszeiten von  $t_{50} = 5.9 \pm 1.5$  min für  $U_{G_2^C}$  und  $t_{50} = 5.2 \pm 4.5$  min für  $U_2^C$  ergeben.



**Abbildung 4.4.** Kinetische UV/VIS-Spektroskopie der enzymatischen Aktivierungsreaktion. a) Aktivierungskinetik von  $U_{G_2^C}$  mit Diglycin-Spacer. b) Aktivierungskinetik von  $U_2^C$  mit Triglycin-Spacer. (Bedingungen: 0.25 mM Unimer, 100 U/mL Tyrosinase in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8)).

Trotz eines ähnlichen Kurvenverlaufs für die Aktivierung der beiden Unimere, stellt sich somit  $U_2^C$  als etwas schneller aktivierbar heraus, was folglich aus dem längeren Triglycin-Spacer resultiert. Auch wenn der Unterschied in der Aktivierungsdauer geringfügig ist, so fiel im Bestreben nach bestmöglichen Aktivierungskonditionen die Wahl auf einen Triglycin-Spacer bei der Synthese und Verwendung weiterer Unimere.

#### 4.1.3 Einfluss der Tyrosinase

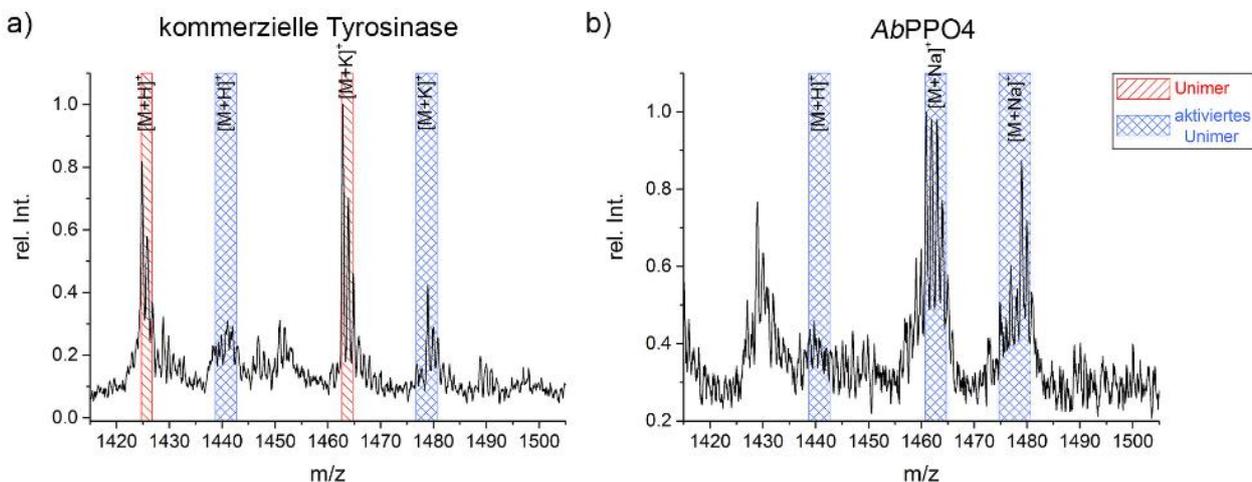
Um bei einer Polyaddition Polymere mit hohem Molekulargewicht zu erhalten, muss ein möglichst quantitativer Umsatz angestrebt werden.<sup>232</sup> So findet, nach der Carothers Gleichung für Stufenwachstumsreaktionen, beispielsweise bei der Synthese eines Polymers mit  $DP_n = 100$ , bestehend aus bifunktionalen AB-Typ Monomeren, 90 % des Wachstums der Polymerkette in den letzten 9 % des Umsatzes statt. Eine vollständige Aktivierung der hier eingesetzten Unimere ist also Voraussetzung für eine effektive Polymerisation. Die bisher beobachtete unvollständige Aktivierung stellt somit ein Problem für die Polymerisation dar. Es wurden daher weitere Einflussfaktoren auf die Aktivierbarkeit untersucht und neben der Struktur der Unimere scheint die Form der verwendeten Tyrosinase als bestimmender Faktor für die erfolgreiche Oxidation der Tyrosin-Reste naheliegend.

Insgesamt wurde bei der Verwendung der kommerziellen Tyrosinase eine starke Variation der Aktivität bei verschiedenen Chargen des Enzyms beobachtet. Das deckt sich mit Erkenntnissen von Studien die sich mit der Beschaffenheit und Reinheit kommerziell erhältlicher Tyrosinasen beschäftigt haben.<sup>233-235</sup> Es wurden verschiedene kommerzielle Tyrosinaseprodukte untersucht und in fast allen Proben Aktivitäten von Cellulase, Chitinase, Laccase, Mannase,  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Xylosidase und Xylanase neben der Tyrosinase-Aktivität gefunden.<sup>233,234</sup> Die Menge der Verunreinigungen unterschied sich stark zwischen den einzelnen Proben, auch bei unterschiedlichen Chargen des gleichen Herstellers oder bei verschiedenen Proben aus der gleichen Charge. Weiterhin enthalten kommerzielle Tyrosinaseprodukte Kohlenhydrate, die bis zu 50 % der Pulvermasse dieser Produkte ausmachen, sowie andere Protein- und Phenolverunreinigungen.<sup>234</sup> Zuletzt wurde auch eine Variation der Enzym Isoformen in verschiedenen Proben beobachtet, die Einfluss auf die Aktivität der Probe haben kann.<sup>234,235</sup> Fast alle Beobachtungen lassen sich darauf zurückführen, dass kommerzielle Tyrosinasen aus Kostengründen häufig aus biologischen Quellen extrahiert werden und die Aufreinigung nicht quantitativ ist. Insgesamt lässt sich feststellen, dass kommerzielle Tyrosinaseprodukte oft nicht gereinigtes Enzym enthalten, inhomogen sind und somit die Studien, die durch deren Verwendung angefertigt werden, beeinflussen können. Dennoch ist das kommerzielle

Produkt für viele materialwissenschaftliche Anwendungen ausreichend und aufgrund des geringen Preises eine attraktive Alternative.

Wegen der angesprochenen Nachteile der kommerziell erwerblichen Tyrosinase wurde jedoch in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PROF. ROMPEL (Universität Wien) eine genetisch exprimierte und aufgereinigte Variante der Tyrosinase für Untersuchungen bezogen. Diese ist eine aktive Form der *Agaricus bisporus* Polyphenoloxidase Isoform 4 (*AbPPO4*)<sup>236,237</sup> und wurde im Folgenden mit dem kommerziellen Tyrosinase Produkt verglichen.

In Abbildung 4.5 sind MALDI-TOF-MS-Spektren von  $U_2^C$  nach 5 min Reaktionszeit mit 100 U/mL der jeweiligen Tyrosinase abgebildet. Bei der Aktivierung mit kommerzieller Tyrosinase ist wie zuvor in Abschnitt 4.1.2 eine unvollständige Oxidation der Tyrosin-Reste zu beobachten. Die intensivsten Signale im Spektrum, die rot hinterlegt sind, lassen sich dem unmodifizierten  $U_2^C$  Unimer zuordnen. Des Weiteren sind nur die Signale der aktivierten Spezies mit einer Tyrosin-Oxidation zu Dopa/Dopachinon zu sehen (+16/+14 Da, blau schattierter Bereich, Abbildung 4.5a). Neben den Quasi-Molekülonen  $[M+H]^+$  werden auch  $[M+K]^+$  Signale beobachtet, die die gleichen Spezies zeigen.

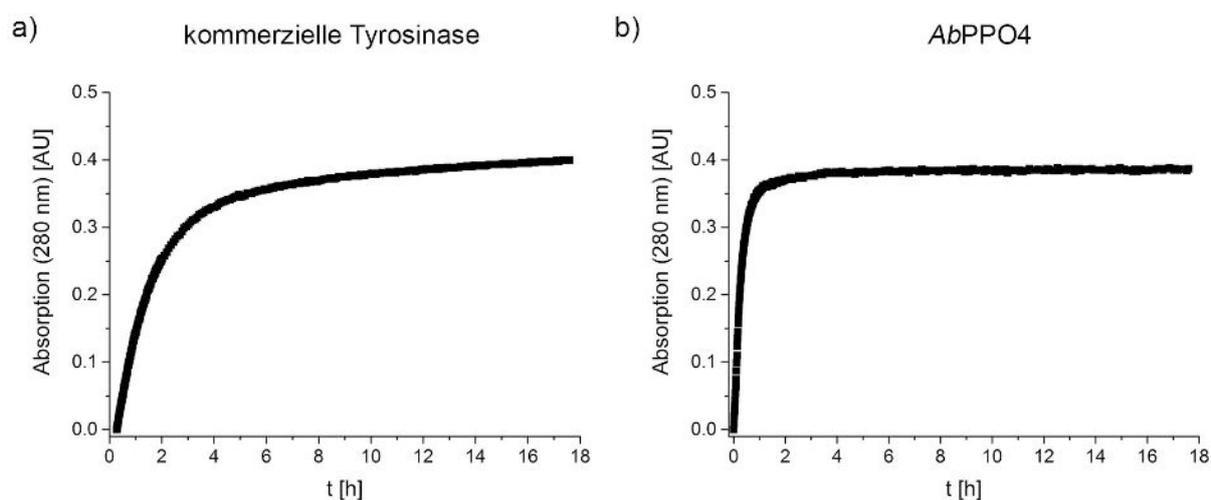


**Abbildung 4.5.** Vergleich der Aktivierung von  $U_2^C$  mit unterschiedlichen Enzymen. a) MALDI-TOF-MS-Spektrum der Aktivierung mit kommerzieller Tyrosinase. Es wird eine unvollständige Aktivierung mit restlichem nicht-aktiviertem Unimer und die Oxidation nur eines Tyrosin-Restes beobachtet. b) MALDI-TOF-MS-Spektrum der Aktivierung mit *AbPPO4*. Die Signale des nicht-aktivierten Unimers verschwanden und eine einfache und zweifache Aktivierung der Tyrosine wird beobachtet. (Bedingungen: 0,25 mM Unimer, 100 U/mL Tyrosinase/*AbPPO4*; a) in Kaliumphosphatpuffer (17 mM, pH 6,5); b) in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6,8), 5 min Reaktionszeit; Messung in  $\alpha$ -CHCA Matrix).

Das Spektrum der Aktivierung mit der genetisch exprimierten Tyrosinase *AbPPO4* zeichnet hingegen ein anderes Bild. Nach 5 min Reaktionszeit sind keine Signale des unmodifizierten Unimers zu sehen (Abbildung 4.5b), was auf eine quantitative Umsetzung hinweist. Weiterhin sind Quasi-Molekülonen  $[M+H]^+$  und  $[M+Na]^+$  für eine (+14/+16 Da) und zwei (+28/+32 Da) Tyrosin-

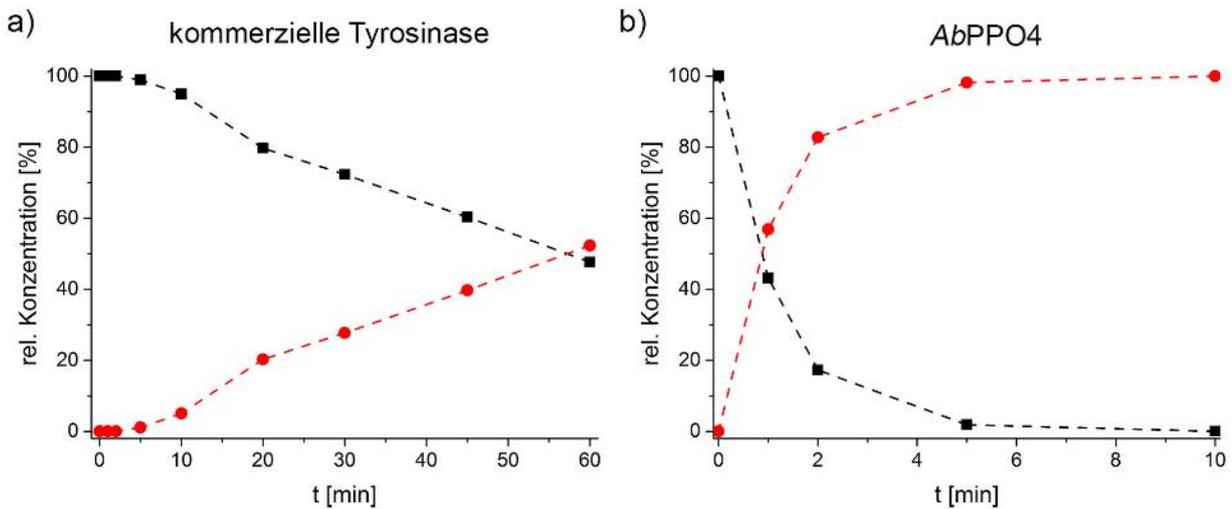
Oxidationen (blau schattierte Bereiche) zu sehen. Damit erreicht *Ab*PP<sub>4</sub> eine deutlich bessere Aktivierung als die kommerzielle Tyrosinase bei gleicher Aktivität und unter den gleichen Bedingungen. Das ist ebenfalls aus dem Vergleich der kinetischen UV/VIS-Spektroskopien des Modell-Unimers  $U_1^S$  (AKPSSPPTYKGGGS) mit den beiden Tyrosinasen ersichtlich (Abbildung 4.6).

Beim  $U_1^S$  Unimer ist das Cystein durch Serin ersetzt, womit eine Polymerisation über Cysteinyl-dopa ausgeschlossen ist. Ebenfalls ist das Tyrosin in Position 5 mit Serin ersetzt, um die Aktivierung eines Tyrosins genau verfolgen zu können. Die Aktivierungen mit 50 U/mL des jeweiligen Enzyms, zeigen deutliche Unterschiede. Die initiale Steigung der Absorption ist für *Ab*PP<sub>4</sub> (Abbildung 4.6b) bedeutend höher und die maximale Absorption wird wesentlich schneller erreicht. Die analog zu 4.1.2 bestimmte Aktivierungszeit  $t_{50}$  ist für die kommerzielle Tyrosinase mit  $t_{50} = 85.3$  min ca. sechs Mal so lang wie für *Ab*PP<sub>4</sub> mit  $t_{50} = 13.4$  min.



**Abbildung 4.6.** Vergleich der kinetischen UV/VIS-Spektroskopie der Aktivierung von  $U_1^S$  mit verschiedenen Enzymen. a) Kinetik der Aktivierung mit kommerzieller Tyrosinase. b) Kinetik der Aktivierung mit *Ab*PP<sub>4</sub>. (Bedingungen: 0.25 mM Unimer, 50 U/mL Tyrosinase/*Ab*PP<sub>4</sub> in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8)).

Noch deutlicher wird der Unterschied in der Aktivität der beiden Tyrosinasen beim Vergleich von kinetischen HPLC-Messungen des gleichen Unimers (Abbildung 4.7). Während der Aktivierung mit 50 U/mL der jeweiligen Tyrosinase wurden zu unterschiedlichen Zeiten Proben genommen und der Umsatz der enzymatischen Reaktion bestimmt. Die zugehörigen HPLC-Chromatogramme und ESI-MS-Spektren der jeweiligen Spezies sind in Abschnitt 6.6.1 dargestellt. Die Aktivierung mit *Ab*PP<sub>4</sub> zeigt nach 5-10 min Reaktionszeit eine quantitative Oxidation des Tyrosins (Abbildung 4.7b). Im gleichen Zeitraum wird für die kommerzielle Tyrosinase ein Umsatz von 1-5 % beobachtet und selbst nach 60 min ist mit 52 % nur etwas mehr als die Hälfte des Unimers unter den gleichen Bedingungen wie für die Reaktion mit *Ab*PP<sub>4</sub> oxidiert.



**Abbildung 4.7.** Vergleich der HPLC-Aktivierungskinetiken von  $U_1^S$  mit verschiedenen Enzymen. a) Kinetik der Aktivierung mit kommerzieller Tyrosinase. b) Kinetik der Aktivierung mit *AbPPO4*. Nicht-aktiviertes Unimer  $U_1^S$  - schwarze Quadrate; aktiviertes Unimer  $U_1^{S*}$  - rote Kreise; gestrichelte Linien dienen zur Orientierung. (Bedingungen: 0.25 mM Unimer, 50 U/mL Tyrosinase/*AbPPO4* in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8)).

Die Zeiten zu denen 50 % Umsatz erreicht ist liegt für die Aktivierung mit *AbPPO4* bei  $t_{50} = 0.9$  min und für die kommerzielle Tyrosinase bei  $t_{50} = 57.2$  min. Dieser gravierende Unterschied wird beobachtet, obwohl für beide Enzyme zuvor die Aktivität in einem Assay bestimmt wurde und gleiche Konzentrationen bezüglich der Aktivität für die Aktivierungsexperimente zum Einsatz kamen. Im Aktivitätsassay wird die enzymatische Oxidation von Tyrosin spektroskopisch verfolgt und diesbezüglich die Aktivität bestimmt. Die beiden Enzyme scheinen also ein unterschiedliches Verhalten in der Substratspezifität aufzuweisen. Dabei differenziert die kommerzielle Tyrosinase stark zwischen der Peptidsequenz der Unimere und Tyrosin als Substrat, wohingegen *AbPPO4* toleranter gegenüber unterschiedlichen Substraten ist.

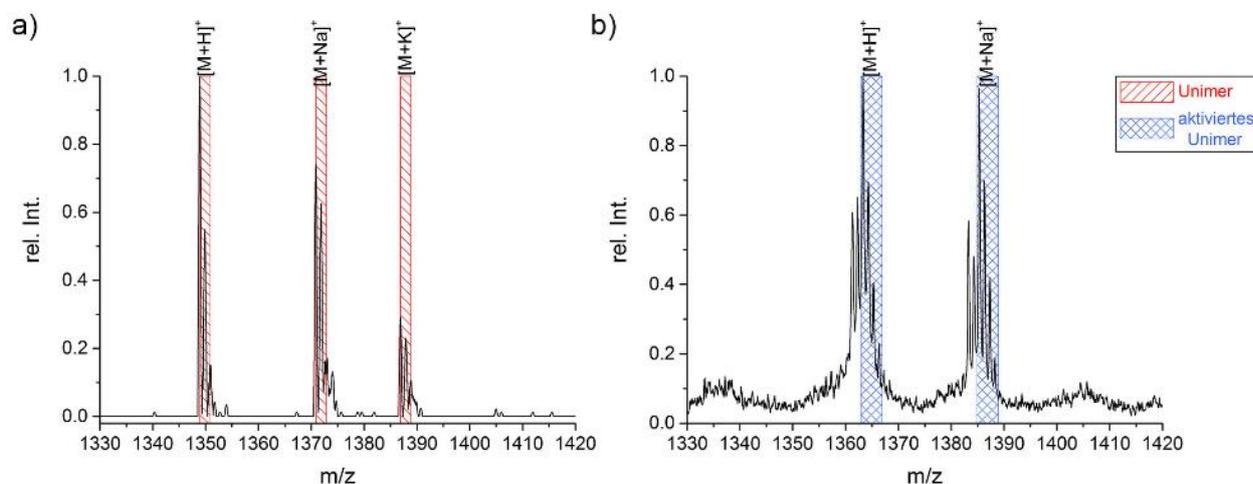
In den vorliegenden Experimenten wurde gezeigt, dass die Verwendung von genetisch exprimierter Tyrosinase zu kürzeren Aktivierungsdauern und zu quantitativen Umsätzen führt. Das konnte im Gegensatz dazu mit der kommerziellen Tyrosinase nicht erreicht werden, die durch Qualitätsabweichungen zwischen verschiedenen Chargen und unvollständige Aktivierung der Unimere auffiel.

#### 4.1.4 Aktivierung der Unimere $U_1^C$ und $U_2^C$

Die Voruntersuchungen haben ergeben, dass eine C-terminale Cystein-Erweiterung der Konsensussequenz aus *Mefp-1* mit einem Triglycin-Spacer zur besten Aktivierung führt. Dementsprechend hat das Unimer, das für die muschel-inspirierte enzymatische Polymerisation genutzt werden soll, die Sequenz AKPSY<sup>5</sup>PPTY<sup>9</sup>KGGGC ( $U_2^C$ ). Da  $U_2^C$  zwei aktivierbare Tyrosin-Reste enthält, stehen für die Polymerisation mehrere Reaktionszentren pro Unimer für die Addition

von Cystein zu Verfügung. Das bedeutet, dass eine Verzweigung oder Quervernetzung der Ketten bei der Polymerisation möglich ist. Daher sollte auch das Unimer  $U_1^C$  für eine Polymerisation genutzt werden, bei dem das Tyrosin in Position 5 mit Serin ersetzt ist und dessen Peptidsequenz entsprechend AKPSS<sup>5</sup>PPTY<sup>9</sup>KGGGC ist. Es wurde auf das Tyrosin in Position 5 verzichtet, da Studien zuvor gezeigt haben, dass sich das Tyrosin des Decapeptids der *Mefp-1* Konsensussequenz in Position 9 schneller aktivieren lässt.<sup>200,229</sup> Durch nur ein verbleibendes Reaktionszentrum, in Form des Tyrosins, ist für  $U_1^C$  eine lineare Polymertopografie vorherzusagen.

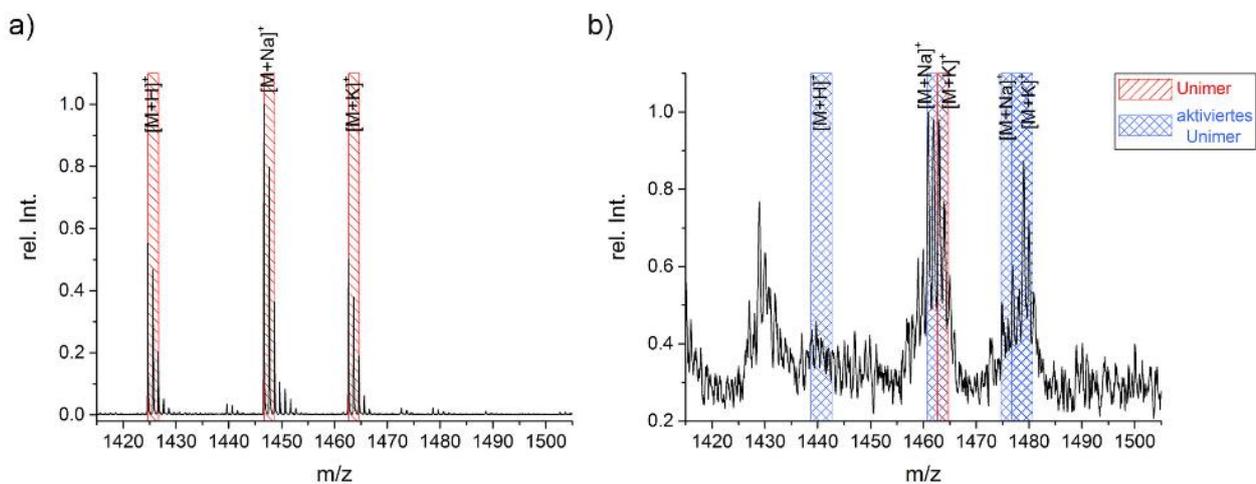
Die Aktivierung der beiden Unimere mit nach Standardbedingungen (allgemeine Arbeitsvorschrift - AAV4), mit 100 U/mL *AbPPO4* und einer Unimerkonzentration von 0.25 mM, verläuft schnell und quantitativ, wie in MALDI-TOF-MS-Messungen gezeigt werden konnte. In Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9 sind Spektren von  $U_1^C$  und  $U_2^C$  vor und unmittelbar nach der Aktivierung (weniger als 5 min) gegenübergestellt. Bei der Aktivierung von  $U_1^C$  wird das Tyrosin des Unimers vollständig zu Dopa (+16 Da) und Dopachinon (+14 Da) oxidiert, dargestellt durch die blau schattierten Bereiche für die jeweilige Quasi-Molekülionspezies (Abbildung 4.8b). Die Signale des unmodifizierten Unimers sind nach der enzymatischen Reaktion nicht mehr nachweisbar.



**Abbildung 4.8.** MALDI-TOF-MS-Messungen der Aktivierung von  $U_1^C$ . a) Spektrum vor Aktivierung; Es sind nur nicht-aktivierte Unimer Signale zu sehen. b) Spektrum unmittelbar nach der Aktivierung mit *AbPPO4*; Es sind keine Signale des nicht-aktivierten Unimers sichtbar, stattdessen werden die Signale der aktivierten Unimer-Spezies beobachtet. (Bedingungen: 0.25 mM Unimer, 100 U/mL *AbPPO4*, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8); Messung in  $\alpha$ -CHCA Matrix).

Es werden neben den Signalen der Dopa und Dopachinon tragenden Unimere auch Signale bei  $m/z$  1361.06 und 1383.10 beobachtet, also Spezies mit -2 Da Unterschied bezüglich der zu Dopachinon oxidierten Spezies. Das könnte zwei Ursachen haben. Zum einen wäre eine Tautomerisierung von Dopachinon im aktivierten Unimer zu  $\alpha,\beta$ -Dehydrodopa ( $\Delta$ Dopa) denkbar, was nach anschließender erneuter Oxidation zu  $\alpha,\beta$ -Dehydrodopachinon ( $\Delta$ Dopachinon) zu einer

Massendifferenz von  $-2$  Da führt. Diese Tautomerisierung wurde in neutralen bis alkalischen Lösungen von Dopa tragenden Molekülen beobachtet<sup>116,238,239</sup> und scheint in dem Zusammenhang wahrscheinlich zu sein. Zum anderen könnte auch eine intramolekulare Michael-Addition des Thiols ans Dopachinon mit anschließender Oxidation des so entstandenen Cysteinyl-dopas zu Cysteinyl-dopachinon eine Massenänderung von  $-2$  Da herbeiführen. Da die Zyklisierungsreaktion in Abschnitt 4.1.1 allerdings mit einer Abspaltung von Wasser und damit einer Massenänderung von  $-20$  Da einhergehend, scheint es unwahrscheinlich, dass sich bei  $U_1^C$  der Mechanismus der Zyklisierung ändert. Erstere Reaktion würde im Zusammenhang mit der Polymerisation keine Probleme verursachen, da die Chinon-Funktionalität für die Additionsreaktion erhalten bleibt.



**Abbildung 4.9.** MALDI-TOF-MS-Messungen der Aktivierung von  $U_2^C$ . a) Spektrum vor Aktivierung; Es sind nur nicht-aktivierte Unimer Signale zu sehen. b) Spektrum unmittelbar nach der Aktivierung mit *AbPPO4*; Es werden ausschließlich Signale der einfachen und zweifachen Tyrosin-Oxidation beobachtet. (Bedingungen: 0.25 mM Unimer, 100 U/mL *AbPPO4*, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8); Messung in  $\alpha$ -CHCA Matrix).

Auch bei  $U_2^C$  wird eine vollständige Aktivierung des Unimers beobachtet. Durch die Oxidation zweier Tyrosine ist das Spektrum in Abbildung 4.9b etwas komplexer und es kommt zur Überlagerung von Signalen verschiedener Spezies. So lässt sich nicht absolut ausschließen, dass bei  $m/z$  1462.98 ein Restsignal vom nicht-aktivierten Unimer ( $[M+K]^+$ ) vom Signal der aktivierten Spezies mit einem oxidiertem Tyrosin ( $[M+Na]^+$ ) überlagert wird. Die H- und Na-Addukte des nicht-aktivierten Unimers sind jedoch im Spektrum nicht aufzufinden, was ein starkes Indiz für eine quantitative Aktivierung ist. Für die Quasi-Molekülion-Spezies  $[M+Na]^+$  wird ein Signal beobachtet, das der Oxidation beider Tyrosine entspricht ( $+28/+32$  Da). Für die restlichen Quasi-Molekülion-Spezies  $[M+K]^+$  und  $[M+K]^+$  werden Signale für eine einfache Tyrosin-Oxidation ( $+14/+16$  Da) beobachtet. Signale, die auf eine Bildung von  $\Delta$ Dopachinon-Einheiten hinweisen, sind für  $U_2^C$  deutlich schwächer als für  $U_1^C$ .

#### 4.1.5 Teilzusammenfassung

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurden Untersuchungen in Form von Aktivierungsstudien durchgeführt, um zu ermitteln welche Unimerstruktur auf Basis des Decapeptids der *Mefp-1* Konsensussequenz AKPSYPPTYK zu optimalen Umsätzen der enzymatischen Tyrosin-Oxidation führt. Es wurde über MALDI-TOF-MS-Messungen festgestellt, dass eine *N*-terminale Erweiterung der Sequenz mit Cystein bei der Aktivierung zu einer Nebenreaktion führt, bei der eine Zyklisierung der Unimere mit einhergehender Wasserabspaltung auftritt. Über Kinetiken aus UV/VIS-Spektroskopie wurde gezeigt, dass die Verwendung eines Triglycin-Spacers zwischen Cystein und Konsensussequenz zu einer leicht erhöhten Aktivierungsgeschwindigkeit im Vergleich zu einem Diglycin-Spacer führt. Um also eine möglichst schnelle Aktivierung ohne Nebenreaktionen, die eine Polymerisation beeinträchtigen könnten, zu erreichen, wurden die beiden Unimere  $U_2^C$  (AKPSYPPTYKGGGC) und  $U_1^C$  (AKPSSPPTYKGGGC) konzipiert, die eine *C*-terminale Cysteinerweiterung über einen Triglycin-Spacer aufweisen und je nach Anzahl der Tyrosine zu einer verzweigten oder linearen Polymertopografie führen. Die quantitative Aktivierung der beiden Unimere gelingt innerhalb kürzester Zeit (<5 min) mit der rekombinanten Tyrosinase *AbPPO4*, die eine deutliche schnellere Aktivierungskinetik aufweist als kommerzielle Tyrosinase und zu höheren Ausbeuten führt.

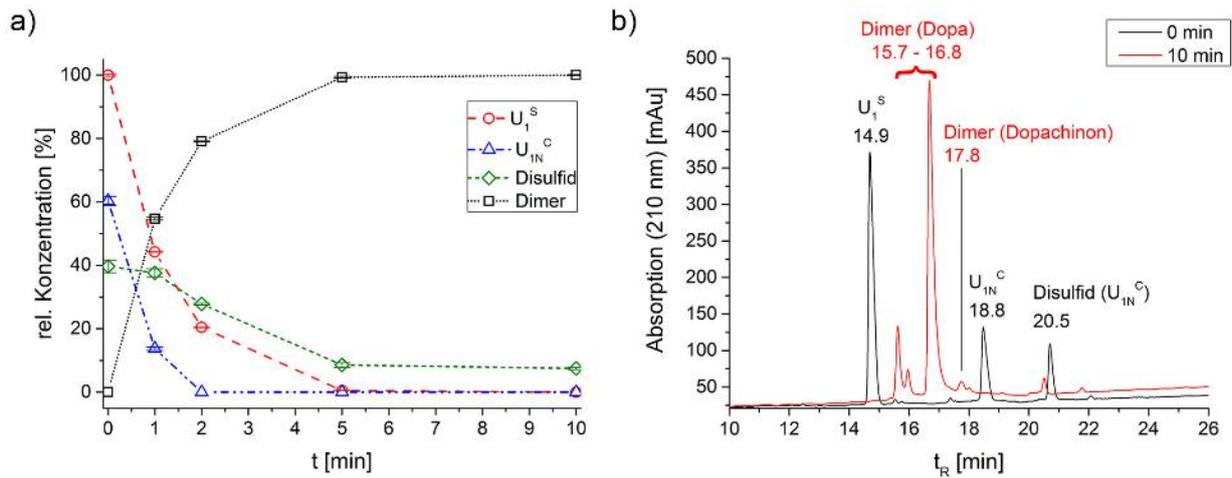
## 4.2 Untersuchungen am Modellsystem

### 4.2.1 Kinetische Messungen der Aktivierung und Verknüpfung

Mit Hilfe eines vereinfachten Modellsystems sollten die einzelnen Teilreaktionen der Muschel-inspirierten Polymerisation genauer untersucht werden. Dazu wurden die Unimere auf nicht-polymerisierbare, monofunktionale Unimere reduziert. Das Unimer  $U_1^S$  (AKPSS<sup>5</sup>PPTY<sup>9</sup>KGGGS) dient als Tyrosin-Komponente, bei der Cystein und Tyrosin in Position 5 mit Serin ersetzt sind. Somit kann die Aktivierung des einzelnen Tyrosins in Position 9 verfolgt werden und eine Polymerisation von  $U_1^S$  über Cysteinyl-dopa ist nicht möglich. Das Unimer  $U_{1N}^C$  (PTF<sup>NO2</sup>KGGGC) dient als Cystein-Komponente und besteht aus einer verkürzten Sequenz des *Mefp*-1 Decapeptids, die statt eines oxidierbaren Tyrosins p-Nitrophenylalanin (F<sup>NO2</sup>) besitzt, das sich durch gute UV-Detektierbarkeit auszeichnet. Auch  $U_{1N}^C$  kann somit nicht alleine über Cysteinyl-dopa polymerisieren, beide Unimere in Kombination sind allerdings in der Lage über die Addition des Thiols von  $U_{1N}^C$  an das über enzymatische Aktivierung gebildete Dopachinon von  $U_1^S$  zu Dimeren zu reagieren.

Die enzymatische Aktivierung des Tyrosins in  $U_1^S$  verläuft schnell und quantitativ, wie bereits in Abbildung 4.7 gezeigt. Innerhalb von 5-10 min wird Tyrosin mit 50 U/mL *Ab*PPPO<sub>4</sub> vollständig zu Dopachinon oxidiert. Mit einer Enzymkonzentration von 100 U/mL wird dies sogar innerhalb von einer Minute erreicht (siehe Abbildung E 32), was von einer effektiven enzymatischen Aktivierung zeugt.

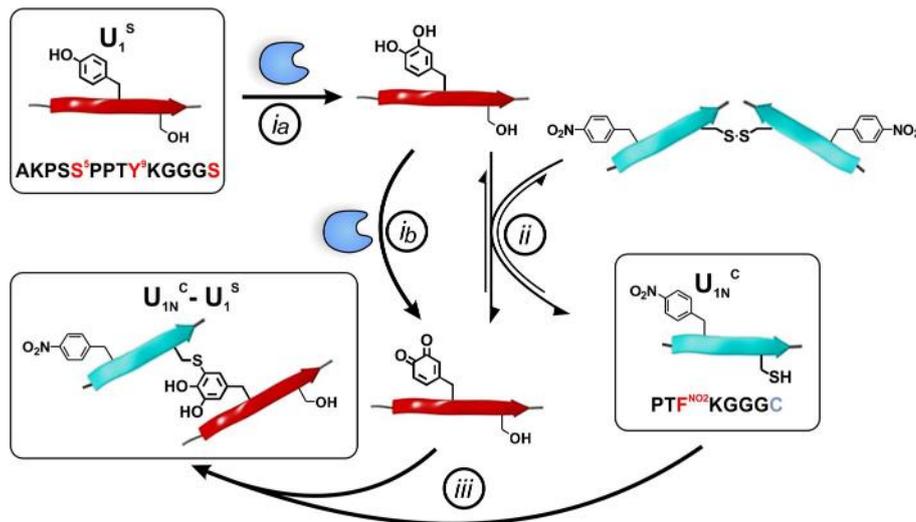
Die Dimerisierung der Unimere  $U_1^S$  und  $U_{1N}^C$  verläuft mit einer ähnlichen schnellen Kinetik wie die Aktivierung von  $U_1^S$ . Die enzymatische Reaktion nach Standardbedingungen (AAV4) führt innerhalb von 5-10 min zu einer quantitativen Ausbeute des über Cysteinyl-dopa verknüpften  $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimers (Abbildung 4.10a). Dadurch ist ersichtlich, dass die enzymatische Aktivierung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Polymerisation darstellt und die Cystein-Dopachinon-Addition wesentlich schneller abläuft. In Abbildung 4.10b ist erkennbar, dass die ursprünglichen Signale von  $U_1^S$  und  $U_{1N}^C$  nach 10 min im HPLC-Chromatogramm nicht mehr vorhanden sind und stattdessen eine Gruppe von drei Signalen im Bereich von 15.7-16.8 min Retentionszeit gebildet wurden. ESI-MS-Messungen zeigen, dass alle drei dieser Signale die gleiche Masse von 2156.4 Da aufweisen (siehe Abbildung E 36), was der Masse des  $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimers im Oxidationszustand von Cysteinyl-dopa entspricht.



**Abbildung 4.10.** Kinetische HPLC-Messungen der Modell-Dimerisierungsreaktion von  $U_1^S$  und  $U_{1N}^C$ . a) Relative Konzentrationen der verschiedenen Spezies im zeitlichen Verlauf. b) Vergleich der HPLC-Chromatogramme zu den Zeitpunkten unmittelbar nach Beginn und 10 min nach Beginn der Reaktion. (Bedingungen: 0.25 mM  $U_1^S$ , 0.26 mM  $U_{1N}^C$  (1:1.05, v/v), 50 U/mL AbPPO4, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8); gestrichelte Linien dienen zur Orientierung, Fehlerberechnung  $n = 3$ ).

Eine Studie von ITO und PROTA hat gezeigt, dass bei der enzymatischen Reaktion von Dopa und Cystein die drei Reaktionsprodukte 5-, 2-, und 6-S-Cysteinyl-dopa mit einer Strukturisomerverteilung von 83 %, 16 % und 1 % entstehen.<sup>240</sup> In Anbetracht dessen, dass die hier auftretende Verteilung der Peakflächen der Signale gleicher Masse 82 %, 13 % und 5 % ( $t_R = 17.0, 15.8$  und  $16.1$  min) beträgt, erscheint es als wahrscheinlich, dass es sich dabei ebenfalls um die Strukturisomere des 5-, 2-, und 6-S-Cysteinyl-dopa verknüpften  $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimers handelt. Weiterhin zeigen die HPLC-Chromatogramme ein Signal bei  $t_R = 17.8$  min, dessen Intensität mit der Zeit langsam zunimmt. Die Masse des Signals entspricht der des Oxidationsproduktes vom  $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimer im Cysteinyl-dopachinon Oxidationszustand (2154.4 Da). Das deutet darauf hin, dass die enzymatische Oxidation von Cysteinyl-dopa im Produkt möglich, unter den gegebenen Bedingungen jedoch gehindert ist und nur langsam voranschreitet. Dies wäre für die Klebefunktion des Polymers von Vorteil, da Dopa im Vergleich zu oxidierten Dopachinon-Form eine deutliche stärkere Adhäsion aufweist.<sup>106,116,134</sup>

Eine weitere Spezies tritt bei 20.5 min Retentionszeit im Chromatogramm auf und kann dem  $U_{1N}^C$ - $U_{1N}^C$  Disulfid-verbrückten Homodimer zugeordnet werden. Durch die kinetische Untersuchung ist erkennbar, dass ein sekundärer Reaktionsweg zu dessen Bildung führt. In Abbildung 4.10a ist gezeigt, dass das Disulfid sehr schnell gebildet wird und in der frühen Phase der Kinetik fast 40 % des  $U_{1N}^C$  Unimers zum Disulfid oxidiert sind. Interessanterweise sinkt danach dessen Konzentration und somit wird das Disulfid für die Bildung des  $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimers verbraucht. Das deutet auf eine reversible Redoxreaktion hin, die in Abbildung 4.11 aufgezeigt ist.



**Abbildung 4.11.** Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus für die Dimerisierung der Modell-Unimere. Die enzymatische Oxidation von Tyrosin in U<sub>1</sub><sup>S</sup> führt zur Bildung von Dopa (ia) und Dopachinon (ib). (ii) Die Oxidation von U<sub>1N</sub><sup>C</sup> durch Reduktion des Dopachinons führt zu Disulfid-Bildung und ist reversibel. (iii) Über die Cysteinyl-Dopa-Verknüpfung wird das U<sub>1</sub><sup>S</sup>-U<sub>1N</sub><sup>C</sup> Dimer Endprodukt gebildet.

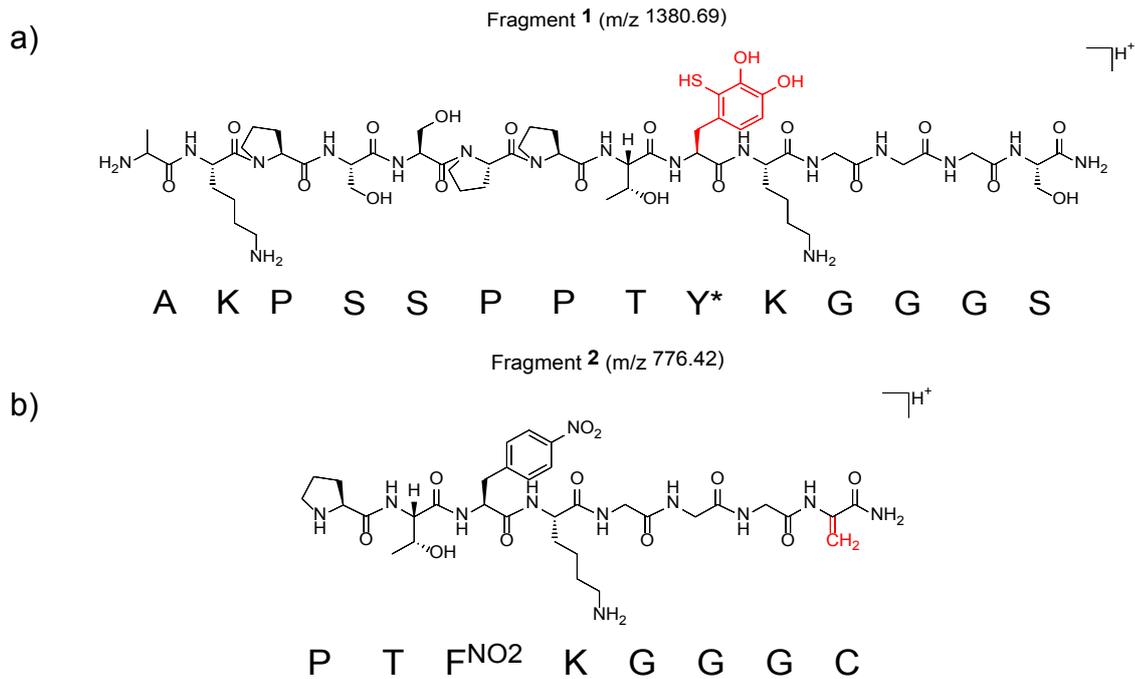
Durch die enzymatische Reaktion von *AbPPO4* mit U<sub>1</sub><sup>S</sup> (i) wird das Dopachinon-Derivat von U<sub>1</sub><sup>S</sup> gebildet. Die Oxidation von freiem Thiol in U<sub>1N</sub><sup>C</sup> zu Disulfid könnte dann eine Reduktion von Dopachinon zu Dopa bewirken (Reaktion ii). Dieser Vorgang wurde für ein *Mcfp-6* Rettungsprotein beschrieben, das im Muschelplaque co-sekretiert wird, um unter den oxidierenden Meerwasserbedingungen adhäsive Dopa-Funktionalitäten wiederherzustellen.<sup>110,117</sup> Somit scheint es wahrscheinlich, dass hier ein ähnliches Redoxsystem gebildet wird, das eine Oxidation von U<sub>1N</sub><sup>C</sup> ermöglicht. Ohne dieses Redoxsystem findet auch keine Disulfidbildung auch statt, wie in einem Referenzexperiment gezeigt werden konnte. Dort wurde in einer Lösung aus U<sub>1N</sub><sup>C</sup> und U<sub>1</sub><sup>S</sup> in Abwesenheit von *AbPPO4*, also ohne Anwesenheit von Dopa oder Dopachinon, über einen Zeitraum von 48 h nur 2.5 % des entsprechenden U<sub>1N</sub><sup>C</sup>-U<sub>1N</sub><sup>C</sup> Disulfids gebildet (siehe Abbildung E 37). Der konkurrierende Reaktionsweg, der die mit Cysteinyl-Dopa verknüpften U<sub>1</sub><sup>S</sup>-U<sub>1N</sub><sup>C</sup> Dimere erzeugt, wird jedoch favorisiert (Reaktion iii). Beide Reaktionen, ii und iii, führen zu einem quantitativen Verbrauch von freiem Thiol innerhalb von 2 Minuten (Abbildung 4.10a). Darüber hinaus wird jedoch weiterhin Dimer gebildet und Disulfid verbraucht, da das Redoxpotential  $\Delta E_0$  der Reduktion von Disulfiden durch Oxidation von Dopa ähnlich dem der Oxidation von Thiolen durch Reduktion von Dopachinon ist.<sup>117</sup> Somit ist Reaktion ii reversibel und der Verbrauch freien Thiols verschiebt das Gleichgewicht von Reaktion ii in Richtung U<sub>1N</sub><sup>C</sup>-Bildung, das dann mit U<sub>1</sub><sup>S</sup> zum Cysteinyl-Dopa verknüpften Dimer reagiert. Das restliche Disulfid, das nach der Reaktion verbleibt (siehe Abbildung 4.10a), entspricht dem eingesetzten leichten Überschuss von U<sub>1N</sub><sup>C</sup> um eine effektive Äquivalenz der funktionalen Gruppen zu erreichen. Letztendlich ist das Resultat des komplexen Redox-

Zusammenspiels die Bildung des  $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimers, das die Triebkraft der Reaktion und folglich auch der Polymerisation darstellt.

#### 4.2.2 Untersuchung der Verknüpfungsreaktion

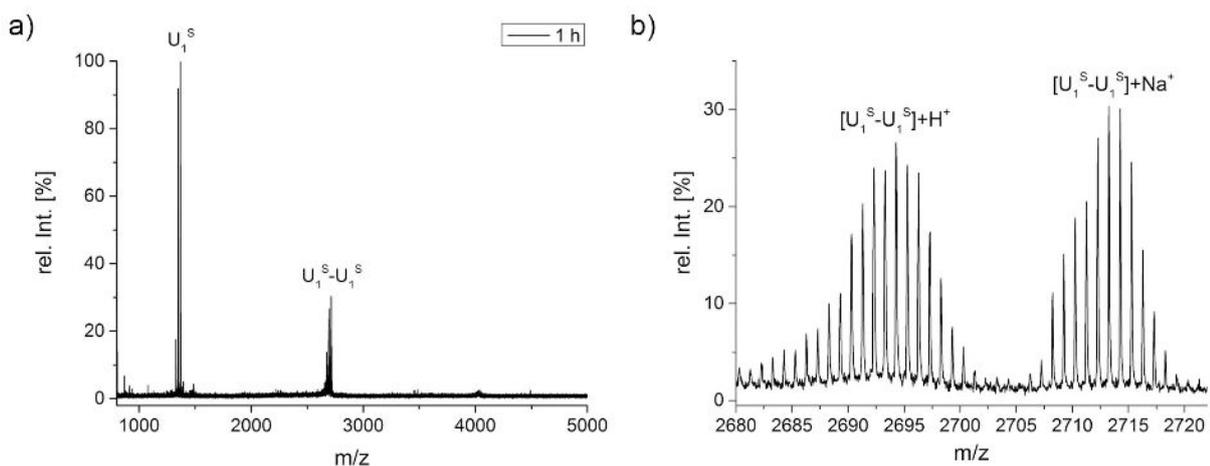
Nachdem nun gezeigt wurde, dass eine Dimerisierung der Modell-Unimere schnell und quantitativ stattfindet, sollte das Modellsystem genutzt werden, um die Art der Bindung zwischen den Unimeren in der Dimerisierungsreaktion genauer zu untersuchen. Dazu wurde Tandem-Massenspektrometrie genutzt um das Dimersignal aus der Modellreaktion von  $U_1^S$  und  $U_{1N}^C$  zu fragmentieren und die erhaltenen Fragmente nach Hinweisen für eine Cysteinyl-dopa-Bindung zwischen den Unimeren zu untersuchen. Im einfachen MALDI-TOF-MS wurde das Signal mit der Masse des  $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimers im oxidativen Zustand des Catechols bei  $m/z$  2156.10 (berechnet  $m/z$  2156.02  $[M+H]^+$ ) gefunden (Abbildung E 38) und für MALDI-TOF-MS/MS selektiert. Im resultierenden Fragmentierungsspektrum (Abbildung E 39a in Abschnitt 6.6.4) konnten 60 % der entsprechenden y und b Ionen für das Dimer mit einer mittleren Genauigkeit von  $m/z$   $0.02 \pm 0.01$  ( $15.1 \pm 16.2$  ppm) zugeordnet werden (siehe Tabelle E 1). Dabei wurden auch die Ionen  $y_{2-6}$  bis  $y_{2-9}$  (siehe Abbildung E 40) gefunden, die darüber hinaus charakteristisch für eine Cysteinyl-dopa-Bindung sind. Jene Ionen könnten nicht vorliegen, wenn die Dimerisierung über die Addition des Lysins von  $U_{1N}^C$  in Position 4 ans Dopachinon von  $U_1^S$  stattfinden würde. Somit zeigt deren Existenz wiederum, dass eine Bindung über Cysteinyl-dopa erfolgt sein muss. Wird andersherum dem Dimer eine Lysinyl-dopa-Bindung zu Grunde gelegt, so werden für diesen Fall keine charakteristischen Ionen gefunden.

Darüber hinaus zeigt das MS/MS-Spektrum neben den y und b Ionen weitere Fragmentionen, die das Vorliegen einer Cysteinyl-dopa-Bindung nachweisen. Zum einen wird ein Signal bei  $m/z$  1380.6909 gefunden (Abbildung E 39c), das sich einem Mercaptodopachinonpeptidyl Fragment **1** (berechnet  $m/z$  1380.6576  $[M+H]^+$ ) zuordnen lässt und ein Thiol am Phenylring des Dopas trägt (Abbildung 4.12a). Zum anderen wurde ein Signal mit geringer Intensität bei  $m/z$  776.4166 gefunden (Abbildung E 39d). Dieses stimmt mit der Masse eines  $\alpha$ -Methylenpeptidyl Fragments **2** (berechnet  $m/z$  776.3686  $[M+H]^+$ ), mit einer Doppelbindung am  $C_\alpha$  des Cysteins, überein (Abbildung 4.12b). Die beiden Fragmente resultieren aus einem Cysteinyl-dopa verknüpftem Dimer, dessen  $C_\beta$ -S-Bindung im Cystein gespalten wurde und sind somit ein direkter Nachweis für die bevorzugte Verknüpfung über die Thiol-Addition. Die Messungen zeigen also, dass der Hauptreaktionsweg für die Verknüpfung der Unimere über Bildung von Cysteinyl-dopa über Thioladdition an Dopachinon stattfindet.



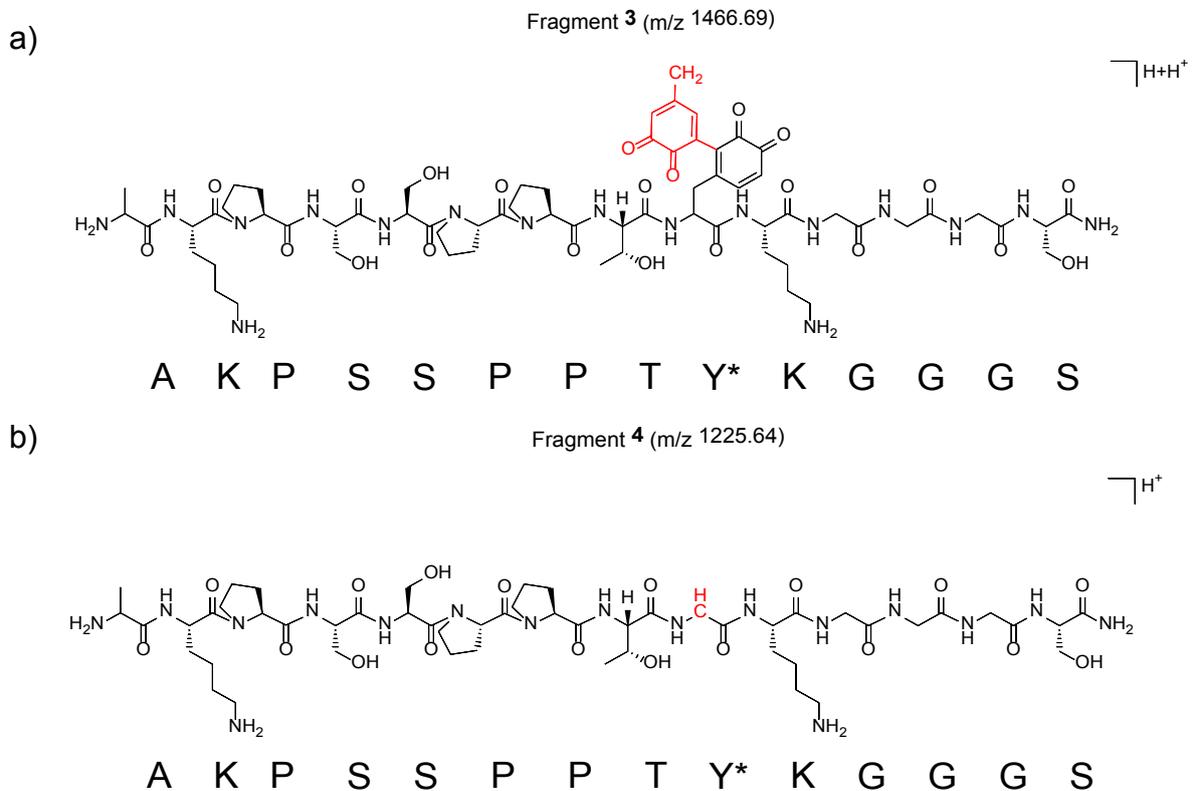
**Abbildung 4.12.** Strukturen zweier Fragmente aus MALDI-TOF-MS/MS-Messungen des  $U_1^S-U_{1N}^C$  Dimers. a) Mercaptodopachinonpeptidyl Fragment (1). b)  $\alpha$ -Methylenpeptidyl Fragment (2).

Das Modellsystem sollte weiterhin genutzt werden, um mögliche sekundäre Verknüpfungsreaktionen zu untersuchen. In einem weiteren Referenzexperiment wurde nur das Unimer  $U_1^S$  enzymatisch aktiviert. Das Fehlen von Cystein in der Unimer-Sequenz erlaubt keine Dimerisierung oder Oligomerisierung über Cysteinyl-dopa, daher müssen alle gefundenen Multimere aus einem anderen Vernetzungsmechanismus resultieren.



**Abbildung 4.13.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von enzymatisch aktiviertem  $U_1^S$  nach 1 h Reaktionszeit. a) Gesamtes Spektrum. b) Der Ausschnitt des Spektrums zeigt die Signale des  $U_1^S-U_1^S$  Dimers. Die Verteilungsmuster der Signale ergeben sich zum einen aus den verschiedenen Oxidationsstufen der Dopa-Einheiten mit jeweils 2 Da Abstand und zum anderen aus der Isotopenverteilung der jeweiligen Spezies mit 1 Da Abstand. (Bedingungen: 0.25 mM  $U_1^S$ , 50 U/mL *Ab*PP04, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8); Messung in  $\alpha$ -CHCA Matrix).

Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde hat die Messung über MALDI-TOF-MS Massen im Bereich von  $m/z$  2685.28 bis 2693.34 gezeigt und damit die Bildung geringer Mengen eines  $U_1^S-U_1^S$  Dimers bestätigt (Abbildung 4.13). Dieselbe Probe wurde daraufhin mit LC-ESI-MS gemessen, um anschließend mit Tandem-Massenspektrometrie fragmentiert zu werden. Im LC-MS-Chromatogramm lassen sich die Massen von Dimeren mit der Ladung  $z = 2$  und aktivierten Unimeren mit der Ladung  $z = 1$  nicht unterscheiden und überlagern sich gegenseitig. Die Masse  $m/z$  897.4465 mit der Ladung  $z = 3$ , die dem  $U_1^S-U_1^S$  Dimer im Oxidationszustand des Dopachinons mit der Masse 2689.3096 Da entspricht, zeigte jedoch im extrahierten Ionenchromatogramm (XIC) isolierte Signale bei 22.2, 22.9 und 27.0 min Retentionszeit. Diese wurden daraufhin für die MS/MS-Messung ausgewählt und wiesen gleiche Fragmentierungsspektren auf (Abbildung E 41c).

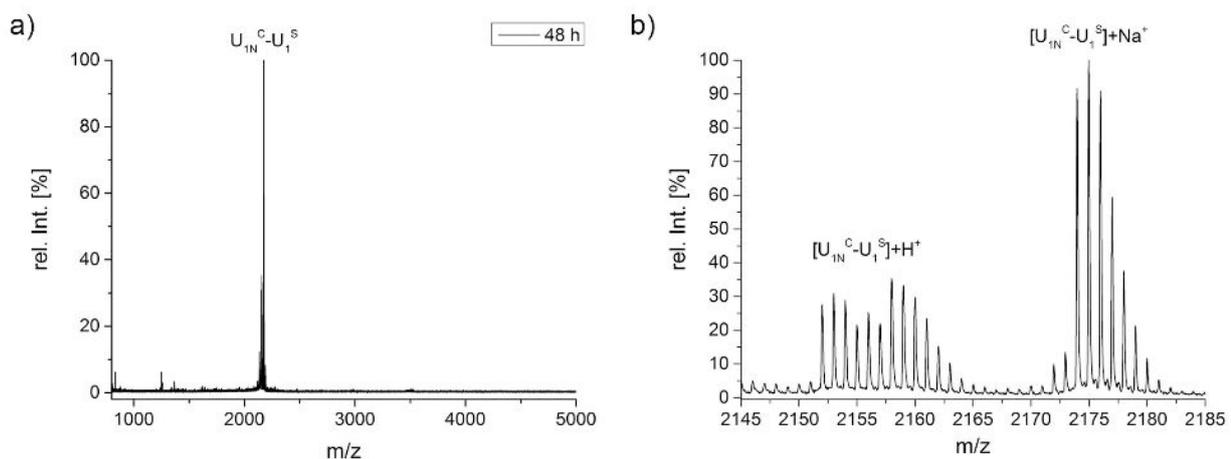


**Abbildung 4.14.** Strukturen der Fragmente aus der LC-ESI-MS/MS-Messung des Vorläuferions bei  $m/z$  897.4465. a) 5-(3,4-Dioxy-1-methylphenyl)dopachinonpeptidyl Fragment (3). b)  $\alpha$ -Hydrogenylpeptidyl Fragment (4).

Die Fragmentierung erfolgte mittels Elektronentransfer- und Kollisionsdissoziation mit höherer Energie (EThcD), wobei ladungsreduzierte Spezies von mehrfach geladenen Fragmentationen entstehen können,<sup>241</sup> die eine Auswertung komplexer machen. Zudem treten neben den y und b Fragmenten, die hauptsächlich bei der Fragmentierung mit kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) beobachtet werden und aus dem Bindungsbruch der Amidbindung resultieren, auch c und z Fragmente aus der Spaltung der N-C $\alpha$ -Bindung auf. In den MS/MS-Spektren wurden 44 % der entsprechenden y und b sowie c und z Ionen für das  $U_1^S-U_1^S$  Dimer mit einer mittleren Genauigkeit von  $0.008 \pm 0.009$  Da

( $4.8 \pm 6.1$  ppm, siehe Tabelle E 2) gefunden. Bei der Betrachtung theoretisch möglicher Fragmentationen gäbe es für Lysinyl-dopa verknüpfte  $U_1^S$ - $U_1^S$  Dimere, über Lysin in Position 2 oder 10, jeweils charakteristische Ionen verglichen zu 5,5'-diDopa verknüpftem  $U_1^S$ - $U_1^S$ . Diese konnten in den MS/MS-Spektren jedoch nicht gefunden werden. Daher lässt sich anhand der y und b sowie c und z Ionen keine Aussage über die Art der sekundären Vernetzung zwischen  $U_1^S$  Unimeren treffen. Es sind jedoch zusätzliche Fragmentationen in den MS/MS-Spektren sichtbar, die für eine Verknüpfung über 5,5'-diDopa sprechen. Es wurde das 5-(3,4-Dioxy-1-methylphenyl)dopachinonpeptidyl Fragment **3** bei  $m/z$  1466.6892 ( $z = 1+2H$ , berechnet  $m/z$  1466.6915) und das  $\alpha$ -Hydrogenylpeptidyl Fragment **4** bei  $m/z$  1225.6425 ( $z=1+H$ , berechnet  $m/z$  1225.6409) gefunden. In Abbildung 4.14 sind die Strukturen der Fragmente dargestellt und zeigen, dass sie aus einer Dopachinon  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$  Bindungsspaltung eines 5,5'-diDopa-gebundenen  $U_1^S$ - $U_1^S$  Dimermoleküls resultieren. Fragmente, die eine Vernetzung über Lysinyl-dopa nachweisen, wurden nicht gefunden. Das zeigt, dass eine sekundäre Vernetzung über eine Aryloxy-Bindung (diDopa) erfolgen kann, wenn keine Thiole für eine Cysteinyl-dopa Verknüpfung vorhanden sind.

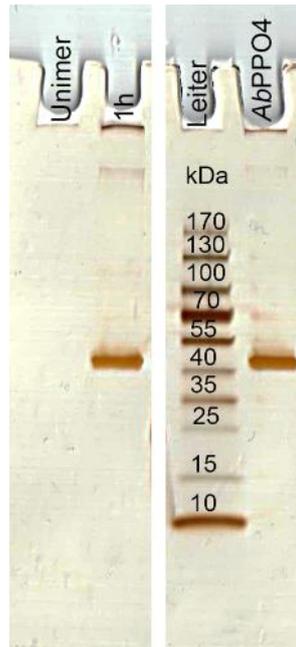
Ein weiteres Referenzexperiment wurde durchgeführt, bei dem  $U_1^S$  und  $U_{1N}^C$  enzymatisch aktiviert und dimerisiert wurden ( $m/z$  2155.01 - 2159.98). Nach einer Reaktionszeit von bis zu 48 h wurden Proben mittels MALDI-TOF-MS gemessen und zeigten keine Hinweise auf weitere Vernetzung und die Bildung von  $[U_1^S-U_{1N}^C]_2$  Tetrameren oder Multimeren höherer Ordnung (Abbildung 4.15). Daher scheint es, dass die Cysteinyl-dopa-Funktionalität nicht anfällig für weitere sekundäre Vernetzungsreaktionen ist.



**Abbildung 4.15.** Aktivierung von  $U_1^S$  und  $U_{1N}^C$  nach 48 h Reaktionszeit. a) Gesamtes MALDI-TOF-MS-Spektrum. b) Der Ausschnitt des MALDI-TOF-MS-Spektrums zeigt die Signale des  $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimers. (Bedingungen: 0.25 mM  $U_1^S$ , 0.25 mM  $U_{1N}^C$ , 50 U/mL AbPPO4, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8); Messung in  $\alpha$ -CHCA Matrix).

Dass es für die Muschel-inspirierte Polymerisation Cystein bedarf und sekundäre Vernetzungsreaktionen langsam und ineffektiv sind, zeigt sich in einem weiteren Referenzexperiment.

In dem wurde SDS PAGE genutzt, um die Molekulargewichtsverteilung der enzymatischen Aktivierung von  $U_1^S$  nach 1 h Reaktionszeit zu zeigen. In Abbildung 4.16 ist das Gel nach der Elektrophorese abgebildet und im Vergleich zur Unimer Referenzprobe sind keine neuen Banden sichtbar. Dies zeigt, dass keine Oligomerisierung oder Polymerisation stattfindet und die Reaktivität von Lysin bezüglich der Additionsreaktion ans Dopachinon und auch die Reaktion von Dopachinonen untereinander gering ist.



**Abbildung 4.16.** SDS PAGE von der enzymatischen Aktivierung von  $U_1^S$ . Die linke Spur zeigt die nicht-aktivierte  $U_1^S$  Referenzprobe ohne sichtbare Banden. Die Spur rechts davon zeigt die Probe nach 1 h Reaktionszeit. Dort sind lediglich Banden der Tyrosinase bei  $\sim 42$  kDa sichtbar. Die leichte Färbung der der Injektionstasche stammt von unlöslicher Substanz aus der *AbPPO4*-Lösung. (Bedingungen: 0.25 mM  $U_1^S$ , 100 U/mL *AbPPO4*, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8)).

### 4.2.3 Teilzusammenfassung

Mit Hilfe eines Modellsystems bestehend aus den monofunktionalen Unimeren  $U_1^S$  (AKPSS<sup>5</sup>PPTY<sup>9</sup>KGGGS) und  $U_{1N}^C$  (PTF<sup>NO2</sup>KGGGC) wurden die Teilreaktionen der Muschel-inspirierten Polymerisation getrennt voneinander untersucht. Die Dimerisierung von  $U_1^S$  und  $U_{1N}^C$  verläuft ähnlich schnell wie die Aktivierung von  $U_1^S$  und es wird ein quantitativer Umsatz innerhalb von 5-10 min erreicht, wie in HPLC-Kinetiken gezeigt wurde. Das zeigt, dass die Vernetzungsreaktion über Cysteinyl-dopa deutlich schneller verläuft, als die enzymatische Oxidation des Tyrosins. Die Cystein-Addition von  $U_{1N}^C$  an  $U_1^S$  erfolgt an drei unterschiedlichen Positionen des Phenylrings vom Dopachinon. Die drei Reaktionsprodukte sind 5-, 2-, und 6-S-Cysteinyl-dopa verknüpfte  $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimere mit einer Verteilung von 82 %, 13 % und 5 %, wie an den verschiedenen Retentionszeiten und Peakflächen der Produkte in den HPLC-Messungen festgestellt werden konnte. Die HPLC-

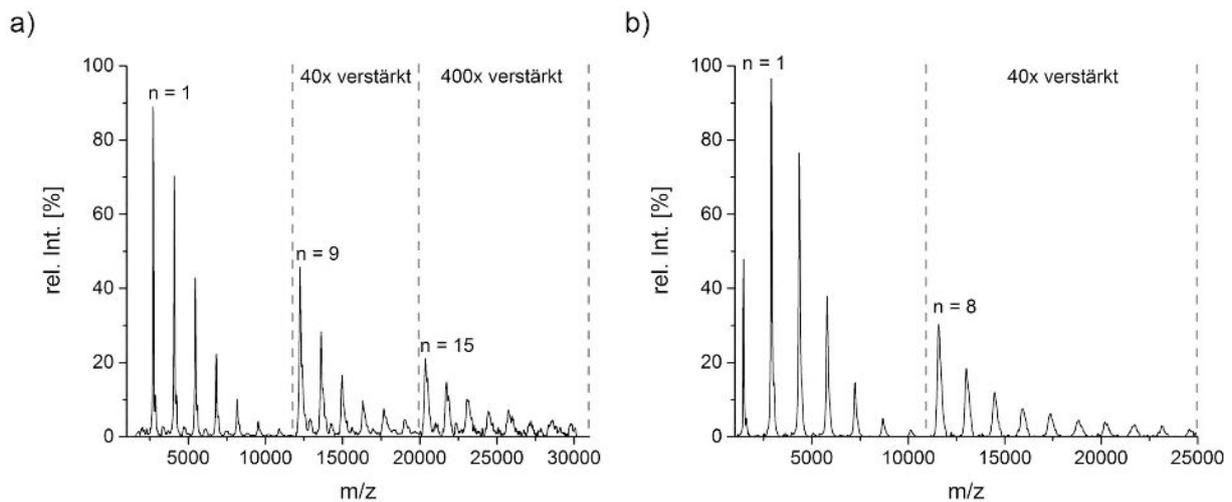
Kinetik der Dimerisierung hat zudem einen sekundären Reaktionsweg aufgedeckt, bei dem zunächst  $U_{1N}^C-U_{1N}^C$  Disulfid gebildet und dann verbraucht wird. Diese Redoxreaktionen sind an die Reduktion von Dopachinon und die Oxidation von Dopa gekoppelt und bilden somit ein Redoxsystem, ohne das die Disulfidbildung nicht stattfindet, wie in einem Referenzexperiment mit den beiden Modellunimere ohne enzymatische Aktivierung von  $U_1^S$  gezeigt wurde. Die Triebkraft der Reaktion ist die Bildung von Cysteinyl-dopa verknüpften Dimeren, die letztendlich quantitativ vorliegen. Es wurde nachgewiesen, dass die Verknüpfung über Cysteinyl-dopa den Hauptreaktionsweg darstellt, indem das  $U_1^S-U_{1N}^C$  Dimer mittels MALDI-TOF-MS/MS fragmentiert wurde. Dabei wurden für die Cysteinyl-dopa-Bindung charakteristische y und b Fragmentationen sowie weitere Fragmente **1** und **2** gefunden, die aus einem Cysteinyl-dopa verknüpften  $U_1^S-U_{1N}^C$  Dimer stammen, dessen  $C\beta$ -S-Bindung im Cystein gespalten wurde.

Eine alternative Vernetzung von Unimere kann über die Bildung von 5,5'-diDopa stattfinden, wenn keine freien Thiole für eine Addition an Dopachinon zur Verfügung stehen, wie in einem Fragmentierungsexperiment mit LC-ESI-MS/MS gezeigt wurde. Dabei führte die enzymatische Aktivierung von Cystein-freiem Unimer  $U_1^S$  zur Bildung von  $U_1^S-U_1^S$  Dimer nach 1 h Reaktionszeit, deutlich langsamer als die Addition von Cystein an Dopachinon. Über die Fragmente **3** und **4** im MS/MS Experiment wurde die Verknüpfung des  $U_1^S-U_1^S$  Dimers über 5,5'-diDopa nachgewiesen. Hinweise auf eine sekundäre Vernetzung über Amin-Gruppen des Lysins wurden nicht gefunden, genauso wenig wie eine weitere Vernetzung über Cysteinyl-dopa-Gruppen. Somit konnte gezeigt werden, dass die Vernetzung der Unimere über Cysteinyl-dopa effektiv und schnell ist und Nebenreaktionen die zu alternativen Verknüpfungen nur eine Rolle spielen, wenn die Bildung von Cysteinyl-dopa gehindert ist.

## 4.3 Untersuchung der Polymerisation

### 4.3.1 Polymerisationsgrad

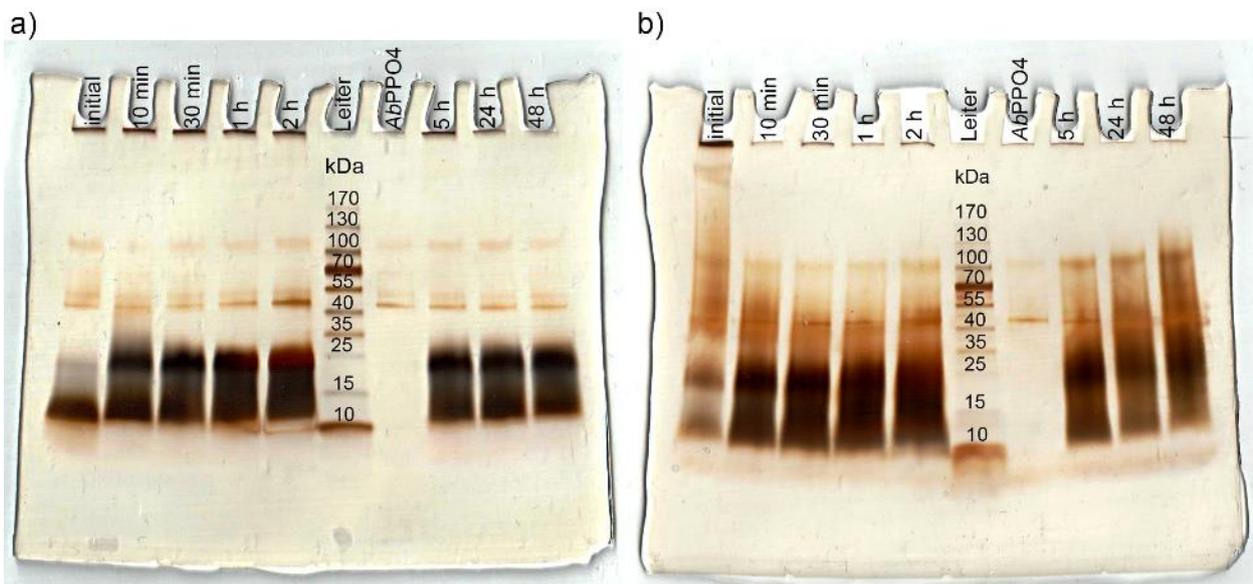
Nachdem die optimalen Bedingungen und Unimereigenschaften für eine enzymatische Aktivierung gefunden wurden und gezeigt wurde, dass der angestrebte Polymerisationsmechanismus über die Bildung von Cysteinyl-dopa-Brücken stattfindet, sollten nun die Polymerisation und die Polymerisationsprodukte untersucht und charakterisiert werden. Wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben, wurden die Unimere  $U_2^C$  (AKPSYPPTYKGGGC) und  $U_1^C$  (AKPSSPPTYKGGGC) für die Muschel-inspirierte Polymerisation konzipiert, konnten innerhalb kurzer Zeit quantitativ aktiviert werden und haben sich somit als geeignete Substrate herausgestellt.



**Abbildung 4.17.** MALDI-TOF-MS-Charakterisierung der Polymere nach 10 min Reaktionszeit. a) Spektrum von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>. b) Spektrum von PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>. Die gestrichelten Linien deuten an, dass die Spektren aus mehreren Einzelmessungen zusammengesetzt sind. Es wurde Gating und Deflection für Messungen im Massenbereich  $m/z > 11000$  genutzt, um Sättigungseffekte des Detektors durch Matrixkomponenten oder Polymere mit geringerer Masse zu reduzieren. Die Intensitäten der Spektren im höheren Massenbereich wurden für eine bessere Visualisierung verstärkt. (Bedingungen: 0.75 mM U<sub>1</sub><sup>C</sup>, 0.75 mM U<sub>2</sub><sup>C</sup>, 50 U/mL AbPPO<sub>4</sub>, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8); Messung in DHB Matrix).

Die Polymerisation unter Standardbedingungen mit 0.25 mM Unimerkonzentration und 50 U/mL AbPPO<sub>4</sub> (AAV5) verläuft, wie zuvor bei der Dimerisierung (Abschnitt 4.2.1) beobachtet, ähnlich schnell wie die Aktivierung und führt innerhalb weniger Minuten zu Polymerisationsprodukten mit hohem Molekulargewicht. MALDI-TOF-MS-Messungen in Abbildung 4.17 zeigen die Wiederholungsmuster der Polymerisationsprodukte mit Molekülmassen bis zu 30 kDa für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und 25 kDa für PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>, was Polymerisationsgraden (DP) von 21 und 17 entspricht. Der geringere Ionisierungsgrad höherer Molekularmassen bei PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> ist eine mögliche Folge dessen höherer Tendenz zur Verzweigung. Die Intensitäten sind im höheren Massenbereich um den Faktor 40 bzw.

400 verstärkt dargestellt, da sie mit steigendem Molekulargewicht sinken. Dies ist in der erschwerten Ionisierung und Desorption größerer Moleküle in Gegenwart von Analyten mit kleinerem Molekulargewicht begründet. Die Signalintensitäten können somit aufgrund der Desorptionsfraktionierung hochmolekularer Spezies nicht interpretiert werden und repräsentieren nicht die tatsächliche Molekulargewichtsverteilung. Die mittleren Massen für die Wiederholungseinheiten betragen  $\Delta m = 1359.4$  Da für die Messung von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und  $\Delta m = 1446.9$  Da für die Messung von PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>. Das ergibt eine gute Übereinstimmung mit den berechneten Massen von 1359.6 Da und 1446.6 Da, wenn man eine Oxidation aller Tyrosin-Reste zu Dopachinon zugrunde legt.

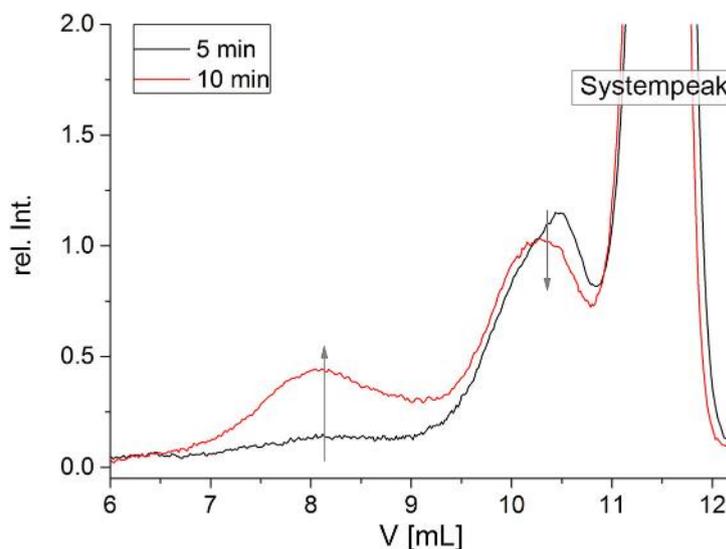


**Abbildung 4.18.** Kinetische SDS PAGE Messungen der Polymerisation. a) PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>. b) PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>. (Bedingungen: 0.25 mM U<sub>1</sub><sup>C</sup>, 0.25 mM U<sub>2</sub><sup>C</sup>, 100 U/mL ABPPO<sub>4</sub>, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8)).

Bei der Analyse mit SDS PAGE ist an der intensiven Färbung der Banden zu sehen, dass der Großteil der Polymere PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> in einem Molekulargewichtsbereich von 10-25 kDa vorliegt. Bei PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> scheint das Kettenwachstum bis zu einem apparenten Molekulargewicht von ca. 25 kDa begrenzt zu sein. Bei PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> sind die Banden weniger definiert und reichen bis zu 100 kDa, was sich durch die Verzweigung erklären lässt, die zusätzliche Dispersität verursacht. Die Messungen zeigen, dass die Polymerisation in beiden Fällen sehr schnell von statten geht. Die initialen Proben, die schnellstmöglich nach Zugabe der Tyrosinase entnommen wurden (nach ca. fünf Sekunden), zeigen bereits oligomere und polymere Reaktionsprodukte (Referenz zum Zeitpunkt Null siehe Abschnitt 6.6.6). Darüber hinaus scheint die Polymerisation nach 10 min abgeschlossen zu sein, da sich die Banden der Proben zu späteren Zeitpunkten nicht mehr verändern. Anhand der dunklen Färbung am Boden der Probentaschen ist zu erkennen, dass für beide Unimere zusätzlich eine

hochmolekulare Polymerfraktion gebildet wurde, die aufgrund des Ausschlussmolekulargewichtes nicht aufgelöst werden kann. Ein methodischer Fehler, der zu einer generellen Färbung den Probenaschen führt, kann ausgeschlossen werden, da dies bei den Proben der Proteinleiter und der Enzymreferenz nicht beobachtet wird.

Messungen für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> mittels wässriger GPC bestätigen, dass neben der im SDS PAGE aufgelösten Molekulargewichtsfraction noch eine weitere hochmolekulare Fraktion gebildet wird. Die jeweiligen apparenten Peak-Molekulargewichte liegen bei  $M_{P,app.} \approx 20$  kDa und  $M_{P,app.} \approx 530$  kDa (Abbildung 4.19). Diese sind ebenfalls schon nach 10 min Reaktionszeit vorhanden und entsprechen den Polymerisationsgraden von  $DP_{app.} \approx 15$  und 260. Die Elugramme der GPC Messungen zeigen neben den Polymerfraktionen einen immanenten Systempeak. Da dieser die niedermolekulare Polymerfraktion zu einem geringem Teil überdeckt, wurde das Peakmolekulargewicht  $M_P$  zur Auswertung des Elugramms ausgewählt. Um auszuschließen, dass der Systempeak restliches Unimersignal verdeckt, wurden UPLC-ESI-MS-Messungen von der Polymerisation von U<sub>1</sub><sup>C</sup> durchgeführt (siehe Abbildung 4.20a). Sie zeigen, dass nach 10 min Reaktionszeit kein Unimersignal nachweisbar ist und somit ist die Existenz weiteren Unimers, das vom Systempeak verdeckt wird, unwahrscheinlich.



**Abbildung 4.19.** GPC Charakterisierung von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>. Es sind Chromatogramme nach 5 min und 10 min Reaktionszeit abgebildet. (Bedingungen für Polymerisation: 0.75 mM U<sub>1</sub><sup>C</sup>, 50 U/mL AbPPO<sub>4</sub>, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8)).

Bei den GPC-Messungen konnte kein vergleichbarer Standard für Proteinanaloga als Referenz genutzt werden, sondern stattdessen wurden Pullulane für die Kalibrierung eingesetzt. Auch die SDS PAGE Messungen weisen eine gewisse Ungenauigkeit auf, da potentiell Komplexbildung von SDS

mit polykationischen Polymeren auftreten kann,<sup>177</sup> was zu erhöhten apparenten Massen führen könnte. Trotzdem liefern die eingesetzten Methoden zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung schlüssige übereinstimmende Daten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Größenbereich für die Molekulargewichte ausreichend nachgewiesen ist, auch wenn keine absolute Bestimmung mit hoher Genauigkeit erfolgt ist.

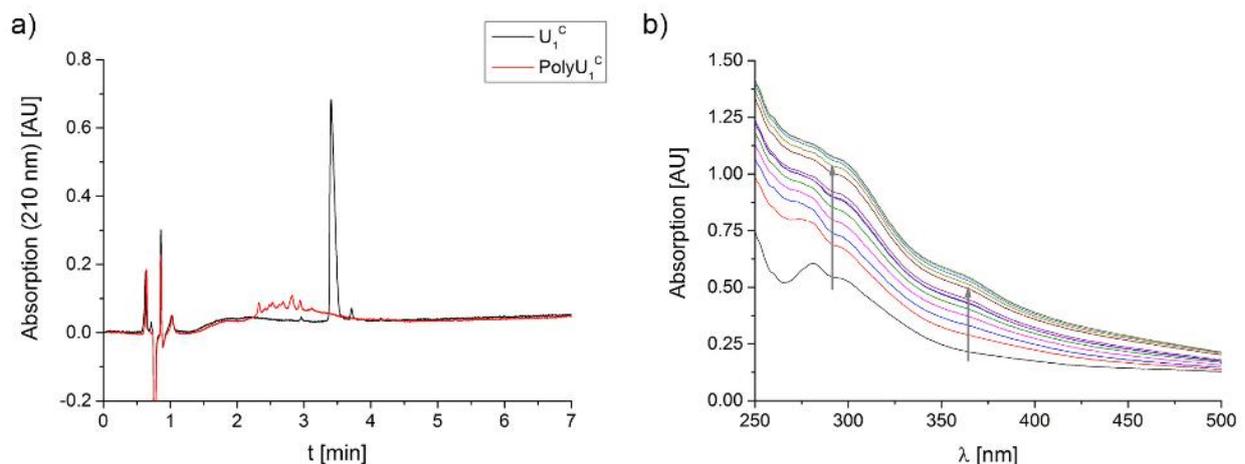
Die Bildung von hohem Molekulargewicht in kurzer Reaktionszeit mit einer bimodalen Verteilung ist untypisch für einen klassischen Stufenwachstumsmechanismus, wie er häufig für Polyadditionen von AB-Monomeren beobachtet wird. Dabei wäre zu erwarten, dass zunächst niedermolekulare Oligomere gebildet werden und es erst bei hohen Umsätzen zu Generierung hochmolekularer Produkte kommt. Es sind jedoch unmittelbar nach der enzymatischen Aktivierung Polymere mit apparentem Molekulargewicht von 10-25 kDa bzw. 530 kDa bei PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und bis zu 200 kDa bei PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> zu sehen. In Abschnitt 4.2 wurde gezeigt, dass die enzymatische Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist. Somit wäre es denkbar, dass die deutlich schnellere Addition eines weiteren Unimers unmittelbar nach der Oxidation durch *Ab*PPO<sub>4</sub> erfolgt und sich das Substrat dabei noch in der Nähe des aktiven Zentrums der Tyrosinase befindet. Möglicherweise würde dadurch die Tyrosin-Funktionalität eines neu addierten Unimers bevorzugt als Substrat dienen, was zu einer Art Kettenendaktivierung und bevorzugtem Kettenwachstum führt, obwohl die Reaktivitäten der funktionellen Gruppen im Unimer und Polymer per se gleich sind. Ab einer Molekülgröße von ca. 25 kDa könnte das Wachstum aufgrund von eingeschränkter Zugänglichkeit reaktiver Endgruppen durch strukturelle Effekte oder Diffusionsrestriktion eingeschränkt sein. Die Bildung der hochmolekularen Produkte könnte daraufhin durch sekundäre Vernetzungsreaktionen entstehen. In Abschnitt 4.2.2 wurde am Modellsystem bereits gezeigt, dass dies möglich ist und vorwiegend über die Bildung von 5,5'-diDopa geschieht. Die GPC-Messungen zeigen zudem, dass die hochmolekulare Fraktion verzögert zur niedermolekularen Fraktion entsteht, was darauf hinweisen könnte, dass sie sekundär über die Reaktion aus primären Reaktionsprodukten aufgebaut wird.

#### 4.3.2 Bestimmung des Thiolverbrauchs

Es sollte neben der Molekulargewichtsverteilung der Umsatz der Polymerisation bestimmt werden. Die Edukte und Produkte ähneln sich in ihren Eigenschaften, da die Unimere bereits Oligopeptide mit Molekulargewichten von über 1300 g/mol sind, was die Bestimmung des Umsatzes zu einer nicht trivialen Aufgabe macht. Sie sind beide gut wasserlöslich und unlöslich in organischen Lösemitteln wie ACN, THF, DCM, Chloroform oder DMAc. Ein Abtrennen der Polymerisationsprodukte über selektive Ausfällung ist daher, nicht zuletzt auch wegen möglicher Interaktionen der Unimere und

Polymere, schwierig. Dazu kommt, die Problematik der Abtrennung der Salzfracht des verwendeten Citratpuffers für die enzymatische Reaktion unter festgelegtem pH und die Abtrennung des Enzyms an sich.

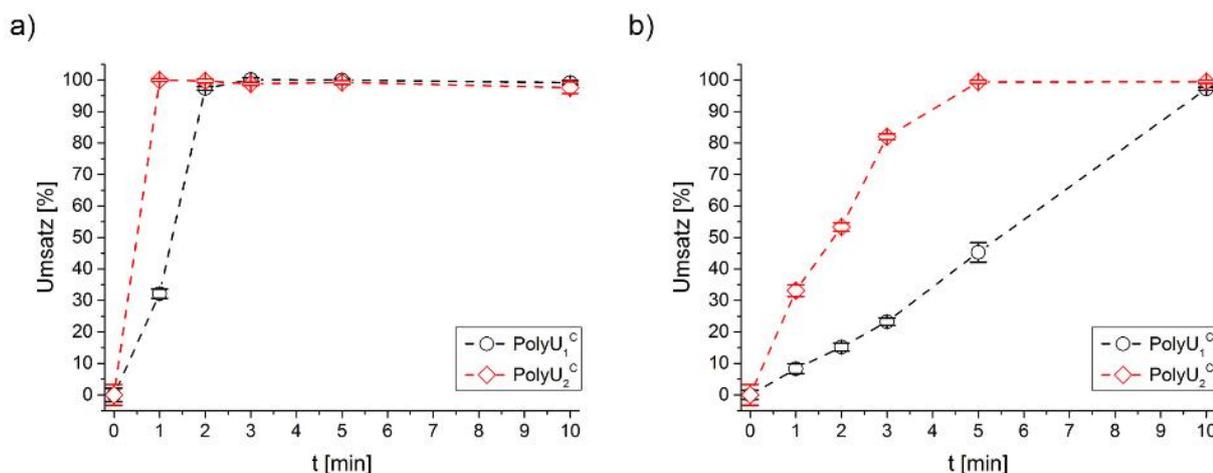
Eine chromatografische Abtrennung des Enzyms ist möglich, allerdings ist eine Bestimmung des Umsatzes über Chromatografie schwierig. Denn die Polymerisationsprodukte eluieren über einen weiten Bereich und leiden unter Peakverbreiterung, wie in vergleichenden UPLC-Messung von  $U_1^C$  und  $PolyU_1^C$  in Abbildung 4.20a gezeigt ist. Des Weiteren kann eine Co-Elution in Form von Polymer-Unimer-Komplexen nicht ausgeschlossen werden. Daher kann keine eindeutige Zuordnung der einzelnen Spezies getroffen werden. Darüber hinaus wäre bei der Bestimmung des Umsatzes von  $PolyU_2^C$  eine vollständige Elution des verzweigten Polymers unwahrscheinlich. Es ist jedoch zu erkennen, dass das Signal von  $U_1^C$  in der Polymerisationsmischung nach 10 min Reaktionszeit nicht mehr vorhanden ist und somit kann von einem weitgehend vollständigen Verbrauch der Unimere ausgegangen werden.



**Abbildung 4.20.** Chromatografische und spektroskopische Messungen der Muschel-inspirierten Polymere. a) Vergleich der UPLC-Chromatogramme vom Unimer  $U_1^C$  und dem Polymer  $PolyU_1^C$  nach 10 min Reaktionszeit. (Bedingungen: 0.75 mM  $U_1^C$ , 50 U/mL  $AbPPO_4$ , in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8)). b) Kinetische UV/VIS-Spektroskopie der Polymerisation von  $U_2^C$ . (Bedingungen: 0.25 mM  $U_2^C$ , 50 U/mL  $AbPPO_4$ , in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8), Messung alle 5 min über einen 60 min Zeitraum).

Die spektroskopische Verfolgung des Unimerverbrauchs kann ebenfalls nicht ohne Weiteres durchgeführt werden. Die Absorptionsmaxima der im Polymer gebildeten Cysteinyl-dopa-Gruppen liegen im Bereich von 292-294 nm und haben einen höheren Extinktionskoeffizienten als Dopa, dessen Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt.<sup>231,242</sup> Durch diese Umstände und die beobachteten sehr breiten Absorptionsbanden der Polymerisationsprodukte, werden die Absorptionssignale des Unimers durch die des Polymers überlagert (Abbildung 4.20b). Mithilfe des Ellmans Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB) lassen sich die Absorptionseigenschaften der Unimere jedoch verändern. Als Disulfid reagiert Ellmans Reagenz mit freien Thiolen zu gemischten Disulfiden

unter Freisetzung von 2-Nitro-5-thiobenzoat ( $\text{TNB}^-$ ), das in neutralen und basischen Lösungen deprotoniert und einen gelben Farbstoff bildet ( $\text{TNB}^{2-}$ ), der sein Absorptionsmaximum bei 412 nm hat.<sup>243</sup> In dem Bereich ist die Absorption des Polymers deutlich geringer und der Extinktionskoeffizient von  $\text{TNB}^{2-}$  ist mit  $\epsilon_{412}=14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  so hoch,<sup>243</sup> dass die Beeinflussung durch das Polymer vernachlässigt werden kann. Da die Unimere Cystein und somit freie Thiole aufweisen, kann deren Konzentration mithilfe des Ellmans Reagenz über die Absorption bei 412 nm unter Nutzung einer externen Kalibrierung bestimmt werden. Über Cysteinyldopa gebundene Thiolgruppen reagieren nicht mit DTNB und werden nicht über die Methode detektiert. In Abbildung 4.21 ist die kinetische Bestimmung des Verbrauchs von freien Thiolen und somit der Umsätze der Polymerisationen von  $\text{U}_1^{\text{C}}$  und  $\text{U}_2^{\text{C}}$  dargestellt. Unter den Standardbedingungen der Polymerisation, bei einer Enzymkonzentration von 50 U/mL, reicht die Zeitauflösung des Experiments nicht aus, um zu bestimmen wann ein vollständiger Umsatz erreicht ist. Für  $\text{U}_2^{\text{C}}$  sind nach maximal 1 min und für  $\text{U}_1^{\text{C}}$  nach ca. 2 min keine freien Thiole mehr nachweisbar. Das stellt die Effektivität der Cystein-Addition erneut unter Beweis.



**Abbildung 4.21.** Kinetische Bestimmung des Umsatzes der Polymerisationen mittels Ellmans Reagenz. a) Polymerisation mit 50 U/mL AbPPO4. b) Polymerisation mit 10 U/mL AbPPO4. (Bedingungen für Polymerisation: 0.75 mM  $\text{U}_1^{\text{C}}$ , 0.75 mM  $\text{U}_2^{\text{C}}$ , in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8);  $n=2$ ; gestrichelte Linien dienen zur Orientierung).

Für die schnellere Reaktion von  $\text{U}_2^{\text{C}}$  können mehrere Faktoren eine Rolle spielen. Zum einen könnte die Peptidsequenz der originalen *Mefp-1* Konsensussequenz, die zwei Tyrosine enthält, für die enzymatische Aktivierung besser zugänglich sein. Zum anderen wird die Tatsache, dass zwei Tyrosine und damit mehr Reaktionsstellen für die Addition von Thiolen pro Unimer vorliegen zur höheren Reaktionsgeschwindigkeit beitragen. Das Ergebnis für  $\text{U}_1^{\text{C}}$  stimmt mit dem Dimerisierungsexperiment des Modellsystems überein, bei dem ebenfalls nach 2 min von  $\text{U}_{1\text{N}}^{\text{C}}$  keine freien Thiole mehr bestimmt wurden (siehe Abbildung 4.10). Allerdings wurde dort beobachtet, dass

zu diesem Zeitpunkt ein Teil der Thiole zum Disulfid reagiert ist. Daher ist davon auszugehen, dass die Polymerisation mit einer geringeren Reaktionsgeschwindigkeit abläuft als mit der Methode über Ellmans Reagenz bestimmt wurde und der quantitative Umsatz der Polymerisation später erreicht ist, so wie es auch für die Modell-Dimerisierung in Abschnitt 4.2.1 beobachtet wurde.

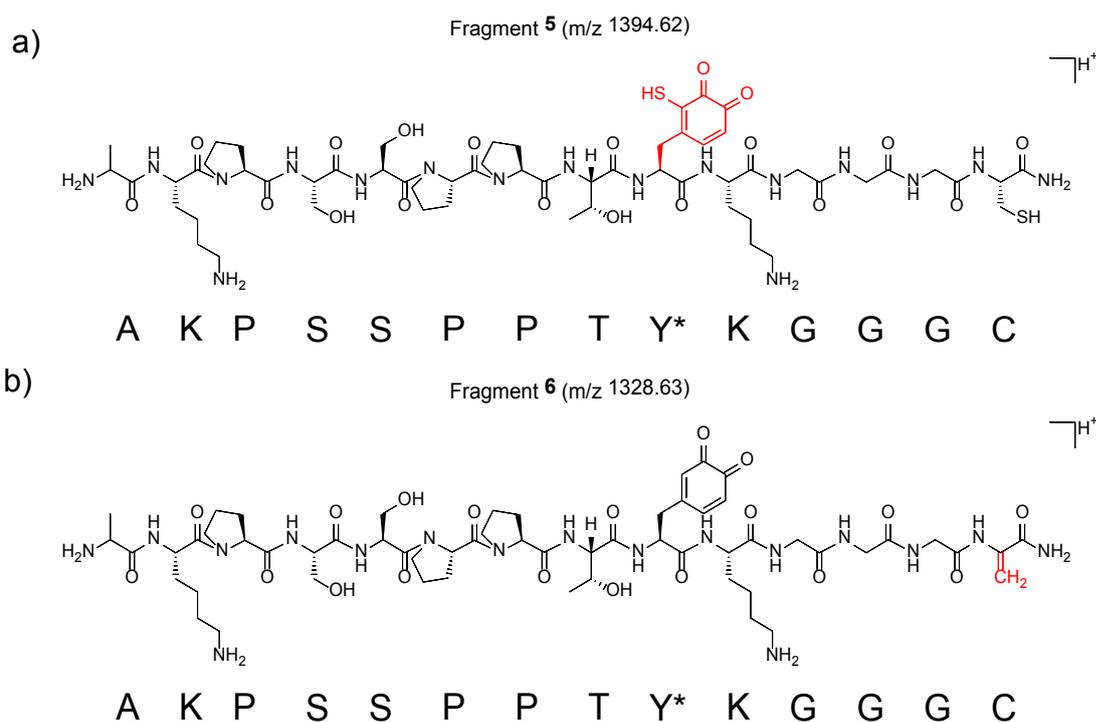
Um eine bessere Auflösung des Experimentes zu erreichen, wurde der Umsatz auch für die Polymerisation mit einer Enzymkonzentration von 10 U/mL gemessen (Abbildung 4.21b). Hier werden nach ca. 5 min bzw. 10 min keine freien Thiole für  $U_2^C$  und  $U_1^C$  nachgewiesen. Die Steigung des c-t-Diagramms, und damit die Reaktionsgeschwindigkeit, ist bei dieser Enzymkonzentration für  $U_2^C$  um den Faktor 2.6 höher als für  $U_1^C$ . Eine Bestimmung der Reaktionsordnung ist für die Experimente nicht möglich. Eine Reaktion nullter Ordnung, wie sie für die meisten enzymatisch katalysierten Reaktionen bei hohen Substratkonzentrationen beobachtet wird,<sup>244</sup> kann nicht nachgewiesen werden, da die Geschwindigkeitskonstante nicht unabhängig von der Eduktkonzentration ist (siehe Abschnitt 6.6.8). Es kann lediglich festgestellt werden, dass mit der Methode über Ellmans Reagenz innerhalb von 1-2 min ein quantitativer Thiolverbrauch unter den Standard-Polymerisationsbedingungen bestimmt wird.

### 4.3.3 Polymerisationsmechanismus

Es sollte sichergestellt werden, dass der Mechanismus über den die Unimere polymerisieren auf der Cysteinyl-dopa-Addition beruht. Dazu wurde wie beim Modellsystem in Abschnitt 4.2.2 MALDI-TOF-MS/MS genutzt um die Verknüpfung zwischen den Unimeren zu charakterisieren. In der Polymerisationsmischung von  $U_1^C$  waren im MALDI-TOF-MS die  $U_1^C$ - $U_1^C$  Dimer-Massen im Bereich von  $m/z$  2722.27 - 2726.30 sichtbar (Abbildung E 46). Bei der Tandem-Massenspektrometrie wurde das Signal bei  $m/z$  2722.19 (berechnet  $m/z$  2722.27  $[M+H]^+$ ) zum Fragmentieren ausgewählt, das dem  $U_1^C$ - $U_1^C$  Dimer im oxidativen Zustand des Chinons entspricht. Die Fragmentierung des Ions lieferte direkte Hinweise auf eine Cysteinyl-dopa-Bindung, da Fragmentionen gefunden wurden, die aus einer Spaltung der  $C_\beta$ -S-Bindung im Cystein eines Cysteinyl-dopa verknüpften Dimeres resultieren (Abbildung 4.22). Dieser Bindungsbruch wurde analog dazu auch beim  $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimer des Modellsystems beobachtet und zeigt, dass der Reaktionsmechanismus für das Modellsystem sowie für die Polymerisation gleich abläuft.

Das Signal des Mercaptodopachinonpeptidyl Fragments **5** wurde bei  $m/z$  1394.62 beobachtet (berechnet  $m/z$  1394.619  $[M+H]^+$ ) und das Signal des  $\alpha$ -Methylenpeptidyl Fragments **6** war bei  $m/z$  1328.63 aufzufinden (berechnet  $m/z$  1328.659  $[M+H]^+$ ). Darüber hinaus konnten im Fragmentierungsspektrum 57 % der entsprechenden y und b Ionen für das  $U_1^C$ - $U_1^C$  Dimer mit einer

mittleren Genauigkeit von  $m/z$   $0.03 \pm 0.02$  ( $32.0 \pm 39.7$  ppm) gefunden werden (siehe Tabelle E 5). Von diesen sind mehrere Ionen charakteristisch für eine Cysteinyl-dopa-Bindung (y2-6 bis y2-9, b2-10, b2-11, siehe Abbildung E 48). Jene Fragmentationen könnten nicht existieren, wenn vorausgesetzt würde, dass eine Verknüpfung der Unimere über Lysinyl-dopa vorliegt. Damit ist gezeigt, dass der primäre Reaktionsweg zur Bildung der Polymere über die Thiol-Addition an Dopachinon stattfindet und zur Bildung von Cysteinyl-dopa-Brücken führt.



**Abbildung 4.22.** Strukturen zweier Fragmente aus den MALDI-TOF-MS/MS-Messungen des  $U_1^C$ - $U_1^C$ -Dimers. a) Mercaptodopachinonpeptidyl Fragment (5). b)  $\alpha$ -Methylenpeptidyl Fragment (6).

#### 4.3.4 Teilzusammenfassung

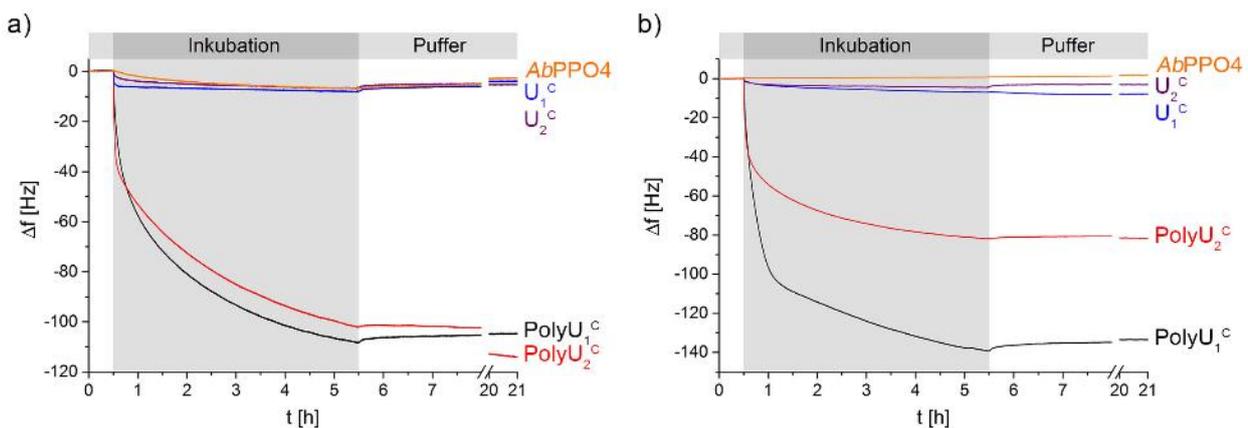
Die Unimere  $U_1^C$  und  $U_2^C$ , mit jeweils einem Tyrosin oder zwei Tyrosinen in der Peptidsequenz, wurden polymerisiert und zeigten einen Aufbau hoher Molekularmassen innerhalb weniger Minuten. Ein Kanon verschiedener Charakterisierungsmethoden wurde für die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung genutzt, die zeigten, dass der Großteil der Polymerketten im Bereich von  $M_{w,app.} = 20$ - $25$  kg/mol liegt. Über MALDI-TOF-MS kann ein sukzessiver Aufbau des Molekulargewichtes bis 30 kDa für Poly $U_1^C$  und 25 kDa für Poly $U_2^C$  beobachtet werden. SDS PAGE Analysen bestätigen dies und zeigen Hauptbanden bei 20-25 kDa. Darüber hinaus sind für das verzweigende Poly $U_2^C$  Banden mit höherer Dispersität zu sehen, die bis zu 100 kDa reichen. Für Poly $U_1^C$  scheint das Kettenwachstum ab einem apparenten Molekulargewicht von 25 kDa begrenzt zu sein. Dennoch zeigen Messungen mittels wässriger GPC, dass nach 10 min Reaktionszeit eine

weitere hochmolekulare Fraktion entsteht, die ein apparentes Molekulargewicht von  $M_{p,app.} \approx 530$  kDa besitzt. Das Molekulargewicht von *Meff*-1 liegt zum Vergleich bei 108 kDa,<sup>106</sup> was zwischen den hier beobachteten Molekulargewichtsfractionen liegt. Die Messungen zeigen auch, dass die Polymerisation schnell verläuft und nach 10 min abgeschlossen ist, da über die Zeit hinaus keine Änderung der Molekulargewichtsverteilung mehr detektierbar ist. MALDI-TOF-MS/MS-Messungen zur Charakterisierung der Verknüpfung zwischen den Unimeren zeigen, dass die Polymerketten über Cysteinyl-dopa-Brücken aufgebaut werden und somit eine Polyaddition stattfindet. Es konnten charakteristische y und b Ionen sowie die Fragmente **5** und **6** bei der Fragmentierung des  $U_1^C$ - $U_1^C$  Dimers aus der Polymerisationsmischung zugeordnet werden, die die Existenz von Cysteinyl-dopa-Gruppen nachweisen. Der schnelle Aufbau des hohen Molekulargewichtes und die bimodale Verteilung sprechen jedoch gegen eine typische Polyaddition. Es erfolgt der Aufbau von Polymeren über Cysteinyl-dopa-Bildung bis zu einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa. Sobald die Verfügbarkeit der Thiolgruppen für eine Addition zu gering ist, wäre eine Verknüpfung der Polymerketten über sekundäre Reaktion von 5,5'-diDopa-Bindungen möglich, die zur schnellen Bildung der hohen Molekulargewichtsfraction führen könnte. Der Umsatz konnte nur indirekt über den Thiolverbrauch bestimmt werden. Dazu wurde UPLC und UV/VIS-Spektroskopie in Verbindung mit Ellmans Reagenz, zum Nachweis freier Thiole, genutzt. Die kinetischen UV/VIS-spektroskopischen Messungen konnten nach 1 min für Poly $U_2^C$  und nach 2 min für Poly $U_1^C$  keine freien Thiole mehr nachweisen. Auch über eine UPLC-Messung zum Ende der Polymerisation nach 10 min konnte kein restliches Unimer mehr nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Cystein-Dopachinon-Addition sehr effektiv ist und quantitativ abläuft.

## 4.4 Adsorptionsstudien

### 4.4.1 Oberflächenabhängige Adsorption

Neben der Aufklärung des bio-inspirierten Polymerisationsmechanismus sind vor allem die Eigenschaften der daraus resultierenden Polymere von Interesse. Mittels Quarzkristallmikrowaage mit Dissipation (QCM-D) sollte das Adsorptionsverhalten von  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$  und  $\text{PolyU}_2^{\text{C}}$  untersucht werden, um festzustellen, ob ähnliche Haftungseigenschaften wie bei den natürlichen Muschelfußproteinen beobachtet werden. Da mfps vielseitige, robuste Haftung an nahezu alle Oberflächen aufweisen,<sup>115,137</sup> wurden für diese Untersuchungen zwei grundlegend verschiedene Substrate in Form von Aluminiumoxid- und Fluoropolymer-beschichteten Sensoren genutzt.  $\text{Al}_2\text{O}_3$  stellt ein Beispiel für eine polare Oberfläche dar. Der Fluoropolymer-beschichtete Sensor dient als unpolares Substrat und ist ähnlich zu Teflon, worauf Muscheln haften können, obwohl es eine schwierig zu beschichtende oder verklebende Oberfläche ist.<sup>129,245</sup>



**Abbildung 4.23.** QCM-D-Adsorptionskinetiken der Muschel-inspirierten Polymere sowie der Unimer- und Enzymreferenzen. a) Adsorptionskinetiken auf einem  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -beschichteten Sensor. b) Adsorptionskinetiken auf einem Fluoropolymer-beschichteten Sensor. (Bedingungen für Polymerisation: 0.75 mM  $\text{U}_1^{\text{C}}$ , 0.75 mM  $\text{U}_2^{\text{C}}$ , 50 U/mL AbPPO4, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8); Bedingungen für Messung: Equilibrierung und Spülen mit 0.8 mM Citratpuffer (pH 6.8), Inkubation mit 34.1  $\mu\text{M}$  Probenlösung in 0.8 mM Citratpuffer (pH 6.8); Frequenzverschiebung des dritten Obertons ( $n = 3$ )).

Die beiden Polymere  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$  und  $\text{PolyU}_2^{\text{C}}$  zeigen eine schnelle Adsorption aus wässrigen Lösungen an die QCM-Sensoren (Abbildung 4.23). Auch nach 5 h Inkubationszeit wird kein Equilibrium erreicht und es adsorbiert weiterhin Polymer aus der Lösung an die Oberfläche. Das weist auf die Bildung von Multischichten hin, wie es für verschiedenste Proteinadsorptionsprozesse beobachtet wurde.<sup>246-248</sup> Die gebildeten Beschichtungen sind irreversibel, da die Frequenzänderungen  $\Delta f$  im Spülschritt mit Puffer konstant bleiben und somit nur vernachlässigbare Mengen an Polymer abgewaschen werden. Bei der  $\text{PolyU}_2^{\text{C}}$  Beschichtung auf  $\text{Al}_2\text{O}_3$  wird sogar ein weiteres Absinken von

$\Delta f$  während des Pufferspülschrittes nach der Inkubation beobachtet (Abbildung 4.23a). Dies wird von einer Erhöhung der Dissipation begleitet (Abbildung E 49b) und deutet damit auf eine Quellung der Beschichtung und die Aufnahme von Wasser in den PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> Film während der Pufferspülung hin, was als zusätzlich gekoppelte Masse gemessen wird.<sup>249</sup>

Als Referenz wurden die unmodifizierten Unimere U<sub>1</sub><sup>C</sup> und U<sub>2</sub><sup>C</sup> sowie das Enzym *AbPPO4* in gleicher Konzentration wie bei den Polymerisationsexperimenten in zusätzlichen Experimenten gemessen. Sie zeigen im Gegensatz zu den Polymeren keine oder kaum Adsorption an die zwei Substrate und belegen somit die hohe Oberflächenaffinität der in den Polymeren gebildeten Cysteinyl-dopa- und Cysteinyl-dopachinon-Gruppen. Auf Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> findet eine leichte Adsorption aller Referenzsubstanzen mit einer maximalen Abnahme der Frequenzänderung bis  $\Delta f_3 = -8$  Hz statt, die sich nach dem Pufferspülschritt auf  $\Delta f_3 = -4$  Hz erhöht. Interessanterweise wird für U<sub>2</sub><sup>C</sup> ein ähnliches Verhalten wie für PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> beobachtet, bei dem sich  $\Delta f$  im Laufe des Spülschrittes weiter verringert. Das lässt darauf schließen, dass der beobachtete Effekt kein Resultat der höheren Vernetzung von PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> gegenüber PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> ist, sondern aus dem strukturellen Unterschied des Peptids und dessen Wechselwirkung mit der Oberfläche folgt. Auf dem Fluoropolymer-Substrat findet eine ähnlich schwache Adsorption der Unimer-Referenzen, aber keine Adsorption von *AbPPO4* an die Oberfläche statt. Die maximale Abnahme der Frequenzänderung für U<sub>1</sub><sup>C</sup> beläuft sich ebenfalls auf  $\Delta f_3 = -8$  Hz und bleibt auch nach dem Pufferspülschritt konstant.

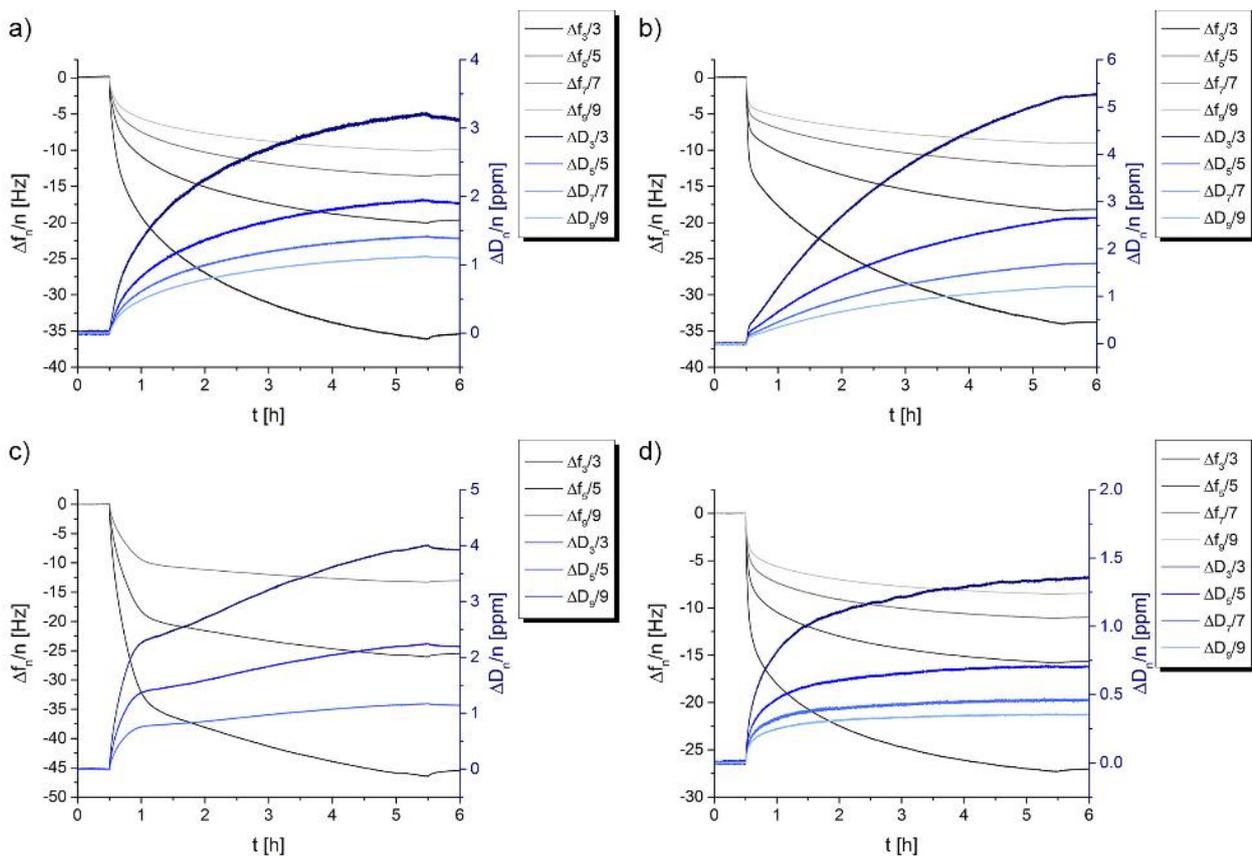
**Tabelle 4.1.** Flächenmassedichten ( $\Delta m$ ) der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>- und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Beschichtungen, berechnet mit dem SAUERBREY- und VOIGHT-Modell.

Beschichtung	$\Delta m$ SAUERBREY [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta m$ VOIGHT [ng/cm <sup>2</sup> ]	Abweichung [%]
PolyU <sub>1</sub> <sup>C</sup> @ Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1730 ± 110	4020 ± 480	132
PolyU <sub>2</sub> <sup>C</sup> @ Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1580 ± 140	2950 ± 350	87
PolyU <sub>1</sub> <sup>C</sup> @ Fluoropolymer	2260 ± 140	3090 ± 250	37
PolyU <sub>2</sub> <sup>C</sup> @ Fluoropolymer	1380 ± 30	1750 ± 120	27

Die QCM-D-Analyse erlaubt eine Einschätzung der adsorbierten Massen  $\Delta m$  (Flächenmassedichte) und der viskoelastischen Eigenschaften der gebildeten Polymerfilme. Dazu können die QCM-Daten mit verschiedenen Methoden angenähert werden. Das SAUERBREY-Modell<sup>250</sup> nutzt zur Berechnung der Flächenmassedichte nur die Frequenzverschiebung  $\Delta f$  und ist für die Anwendung auf rigide Beschichtungen geeignet. Das VOIGHT-Modell<sup>251</sup> bezieht bei der Näherung der Daten zusätzlich die Dissipationsänderung  $\Delta D$  ein und beschreibt somit viskoelastische Beschichtungen besser. Daraus folgt, dass wenn die beiden Modelle in den Ergebnissen übereinstimmen, ein rigider und elastischer Film vorliegt. Im anderen Fall führen die viskoelastischen Anteile der Beschichtung dazu, dass das

viskoelastische VOIGHT-Modell zu höheren Flächenmassedichten führt und das SAUERBREY-Modell die adsorbierte Masse unterbewertet.<sup>252</sup>

In Tabelle 4.1 sind die Berechnungen der Flächenmassedichten nach SAUERBREY und VOIGHT und deren Abweichungen gegenübergestellt. Es sind deutliche Unterschiede zwischen den durch die verschiedenen Modelle berechneten Flächenmassedichten zu erkennen, was darauf hinweist, dass die Polymerfilme viskoelastische Anteile aufweisen. Zudem ist bei allen Beschichtungen eine ausgeprägte Obertondispersion, also eine Frequenzabhängigkeit der normalisierten Frequenz- und Dissipationsänderung  $\Delta f_n/n$  und  $\Delta D_n/n$  zu erkennen (Abbildung 4.24).



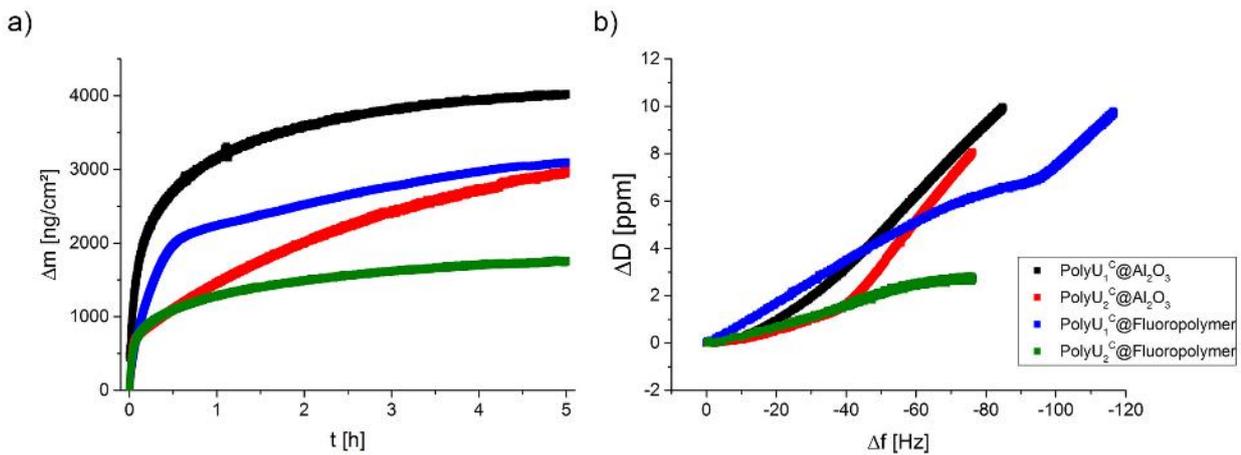
**Abbildung 4.24.** Normalisierte QCM-D-Adsorptionskinetiken von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- und Fluoropolymer-Substrate. Die normalisierten Frequenzänderungen  $\Delta f_n/n$  und Dissipationsänderungen  $\Delta D_n/n$  geben Aufschluss über die Obertondispersion. Die Aufspaltung der Signale weist auf eine Frequenzabhängigkeit und somit auf viskoelastische Eigenschaften der Beschichtungen hin. a) PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung auf Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Substrat. b) PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Beschichtung auf Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Substrat. c) PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung auf Fluoropolymer-Substrat. d) PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Beschichtung auf Fluoropolymer-Substrat.

Die frequenzabhängige Reaktion ist ein weiteres Indiz für ein viskoelastisches Verhalten der gebildeten Polymerfilme.<sup>253</sup> Somit kann davon ausgegangen werden, dass die mit dem VOIGHT-Modell für viskoelastische Beschichtungen berechneten adsorbierten Massen die Muschel-inspirierten Polymerfilme genauer beschreiben. Die so abgeschätzten Flächenmassedichten betragen  $40.2 \pm 4.8 \text{ mg/m}^2$  und  $29.5 \pm 3.5 \text{ mg/m}^2$  für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>, was zu theoretischen

Schichtdicken von  $33.5 \pm 4.0$  nm und  $24.5 \pm 2.9$  nm führt. Das liegt in einer ähnlichen Größenordnung wie es für QCM-D-Messungen mit nativem *Mefp-1* auf einer Methyl-modifizierten Goldoberfläche beobachtet wurde ( $\sim 22$  nm).<sup>249</sup>

Die adsorbierte Masse an PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> beläuft sich auf 73 % der an PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> adsorbierten Masse, was vermutlich darin begründet ist, dass die linearen, flexibleren PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Ketten besser nicht-kovalente Wechselwirkungen untereinander und somit höhere Multischichten aufbauen können. Ein weiterer Faktor könnte darin bestehen, dass die PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> Filme aufgrund der kovalenten Vernetzung weniger Wasser einlagern und daher die über QCM detektierte Masse geringer ist. Die Ergebnisse der adsorbierten Massen der Fluoropolymer-Beschichtungen unterscheiden sich nur geringfügig von denen auf Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Mit Flächenmassendichten von  $30.9 \pm 2.5$  mg/m<sup>2</sup> und  $17.5 \pm 1.2$  mg/m<sup>2</sup> für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>, ergeben sich theoretische Schichtdicken von  $25.7 \pm 2.1$  nm bzw.  $14.6 \pm 1.0$  nm, die etwas geringer sind als auf Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Die adsorbierte Masse an PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> im Verhältnis zu PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> beträgt 57 % und ist somit auch geringer als bei Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Es scheint also oberflächenspezifische Unterschiede zu geben, auch wenn die generellen Trends gleich sind.

Die Unterschiede zwischen den Berechnungen mit dem SAUERBREY- und VOIGHT-Modell sind bei den Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Substraten generell höher als bei den Fluoropolymer-Substraten, was auf größere viskoelastische Anteile der Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Beschichtungen hinweist. Das lässt auf verschiedene Interaktionsmodi der Peptide mit der unpolaren und der polaren Oberfläche schließen, wodurch auf dem Fluoropolymer-Substrat rigidere Schichten gebildet werden. Neben den diversen Seitenkettenfunktionalitäten in den Peptiden, kann auch Dopa unterschiedliche Bindungsmodi aufweisen und somit die Adhäsion zu verschiedenartigen Oberflächen modulieren<sup>3,134,138,254</sup>. Zudem sind die Abweichungen in den Modellberechnungen für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> höher als für PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>. Dies lässt sich durch die verschiedenen Arten von Vernetzung in den Beschichtungen erklären. Während PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> nur nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten ausbilden kann, hat PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> stattdessen eine verzweigte Topologie und weist kovalente Bindungen auf, welche die Netzwerkstabilität erhöhen und die Kohäsion stärken, was wiederum zu rigidere Beschichtungen führt. Dies wird von der Literatur bestätigt, in der kovalent vernetzte *Mefp-1* Proteine rigidere Beschichtungen auf methylterminierten Goldoberflächen bilden und dem SAUERBREY-Regime besser entsprechen.<sup>249</sup>



**Abbildung 4.25.** Beschichtungseigenschaften von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> auf den beiden Substratoberflächen Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und Fluoropolymer. a) Zeitabhängige Änderung der Flächenmassedichte nach dem VOIGHT-Modell. b) Auftragung von Dissipations- gegen Frequenzänderung  $\Delta D/\Delta f$  als Maß für die Viscoelastizität der gebildeten Beschichtungen.

Neben dem Vergleich der Näherungsmodelle kann auch das Verhältnis von Dissipationsänderung zu Frequenzänderung  $\Delta D/\Delta f$  Aufschluss über die Filmeigenschaften geben. Eine Auftragung des Verhältnisses kann in Abbildung 4.25b gefunden werden. Ein größerer Anstieg in  $\Delta D/\Delta f$  korrespondiert mit einer viskoelastischen offenen Struktur, wohingegen ein geringer Anstieg auf eine steifere und kompaktere Struktur hinweist.<sup>252</sup> Aus der Auftragung ergibt sich, dass, wie beim Vergleich über die Näherungsmodelle, die Beschichtungen bestehend aus PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> (schwarze und blaue Kurve) höhere viskoelastische Anteile besitzen und die PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Filme (rote und grüne Kurve) im Vergleich dazu eher rigider sind. Zusätzlich fällt auf, dass bei der PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Beschichtung auf der Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Oberfläche und bei der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung auf der Fluoropolymer-Oberfläche deutliche Änderungen im Anstieg zu verzeichnen sind. Das deutet darauf hin, dass während des Adsorptionsprozesses bedeckungsbedingte strukturelle Veränderungen in der adsorbierten Schicht auftreten.<sup>252</sup> Der Anstieg der Steigungen in der Auftragung signalisiert, dass sich im Verlauf der Adsorption die Packungsdichte verringert, was wahrscheinlich durch zunehmend schlechtere intermolekulare Wechselwirkungen der Polymere infolge von strukturellen Einschränkungen verursacht wird.

Abbildung 4.25a zeigt die zeitliche Änderung der Flächenmassedichte  $\Delta m$  bei der Adsorption von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> auf den beiden Substratoberflächen. Es fällt auf, dass obwohl die beiden PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtungen nach den 5 h Inkubationszeit die höchsten Flächenmassedichten aufweisen, sie deutliche Unterschiede in der initialen Adsorptionsgeschwindigkeit zeigen. Auf dem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Substrat ist diese höher als auf dem Fluoropolymer-Substrat. Bei den PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Beschichtungen wird jedoch eine annähernd gleiche Adsorptionskinetik beobachtet. Die Polymere mit zwei Dopa- bzw. Dopachinon-Gruppen pro Wiederholungseinheit scheinen also weniger zwischen der polaren und der

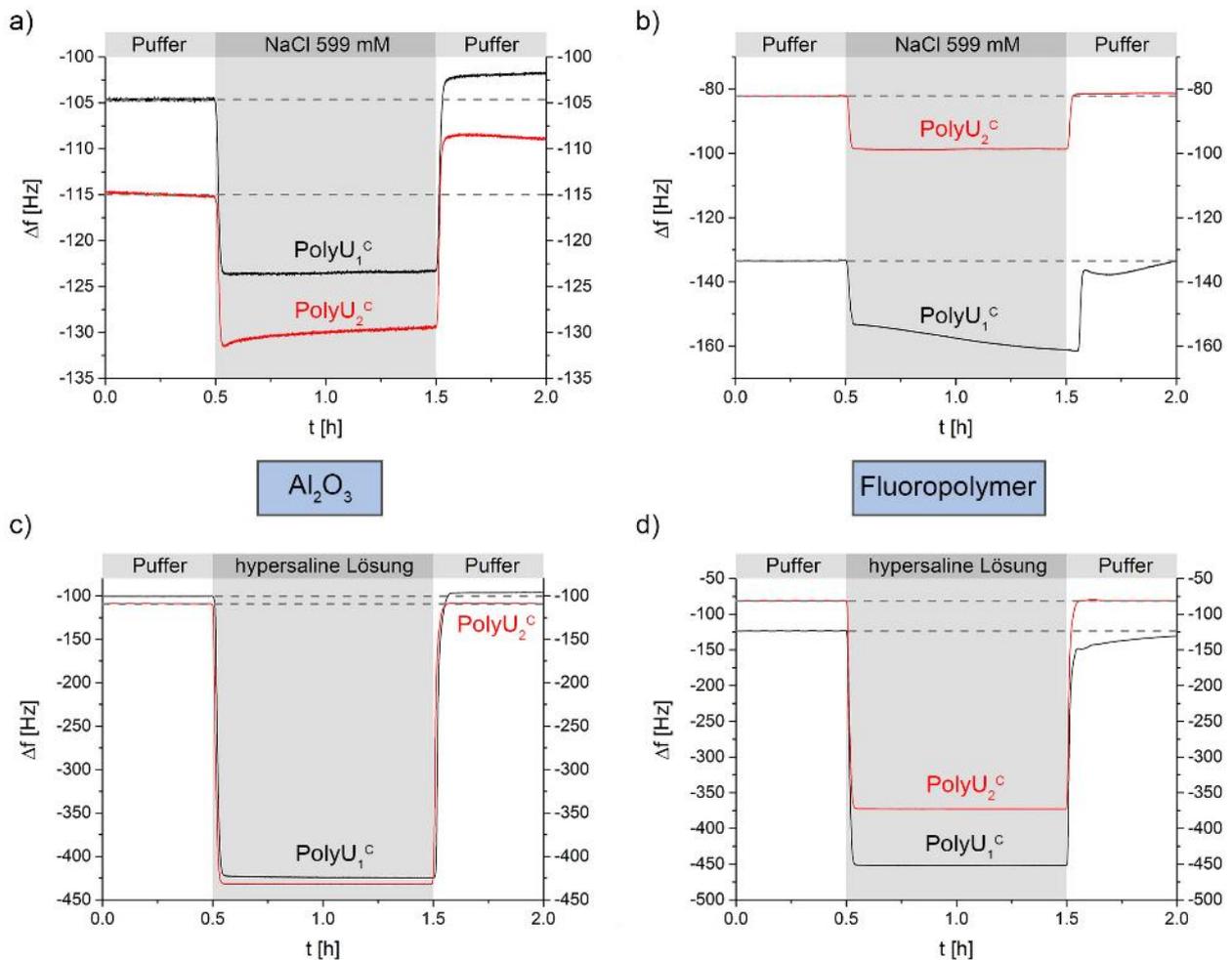
unpolaren Oberfläche zu differenzieren. Da die initiale Adsorption weitestgehend auf den primär ausgebildeten Wechselwirkungen zwischen Peptid und Oberfläche beruht, liegt es nahe, dass Dopa hier als universeller Anker fungiert. Wie bereits erwähnt, wurde gezeigt, dass Dopa in der Lage ist starke Wechselwirkungen mit verschiedensten Oberflächen einzugehen. Darüber hinaus wird Dopa die Eigenschaft attestiert Grenzflächen-Wassermoleküle vom Substrat zu verdrängen, um primäre Wechselwirkungen mit der Oberfläche zu ermöglichen.<sup>35,139</sup> Somit scheint der höhere Anteil an Dopa in der Peptidsequenz für eine gleichmäßig schnelle Adsorption an die unterschiedlichen Oberflächen verantwortlich zu sein. Das hat jedoch wenig Auswirkung auf die darauffolgende Multischichtadsorption, da die final abgeschiedenen Massen für die PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Beschichtungen auf den beiden Oberflächen deutlich variieren. Zudem kann der Dopa-Anteil nicht der einzige Faktor für die initiale Adsorption sein, da die höchste Adsorptionsgeschwindigkeit trotzdem für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> auf Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> beobachtet wird.

#### 4.4.2 Stabilität der Beschichtungen

Es wurde weiterhin untersucht, ob die muschel-inspirierten Polymere ihre hohe Oberflächenaffinität beibehalten, wenn die Haftungsbedingungen durch erhöhte Ionenstärke erschwert werden. Da die natürlichen Vorbilder der Muschelfußproteine im salzhaltigen Meerwasser Anwendung finden, wurde zunächst ein Spülschritt bei den zuvor gebildeten Polymerfilmen mit 599 mM NaCl-Lösung als Meerwasser-Modell durchgeführt. Um die Bedingungen weiter zu verschärfen, folgte anschließend ein Spülschritt mit 4.2 M hypersaliner Lösung, deren Salzgehalt dem des Wassers im toten Meer entspricht<sup>255</sup>.

Durch den Vergleich der Frequenz- und Dissipationsänderungen bzw. der daraus berechneten Flächenmassedichten vor und nach dem Spülschritt, kann die von der Beschichtung abgetragene Masse ermittelt werden. Wie aus Abbildung 4.26 hervorgeht, zeigen die PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>- und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Beschichtungen auf beiden Substratoberflächen geringe Erhöhung in  $\Delta f$  und damit geringe Massenverluste. Während der einstündigen Spülschritte sinkt  $\Delta f$  aufgrund der veränderten Dichte und Viskosität des Lösungsmittels ab und steigt im Anschluss wieder an, wenn das System wieder auf den Puffer umgespült wird. Bleibt die Beschichtung nach dem Spülschritt unverändert, so würde  $\Delta f$  konstant bleiben. Erhöht sich  $\Delta f$ , wurde Masse vom Polymerfilm abgetragen. Tabelle 4.2 zeigt die Gegenüberstellung der absoluten und relativen Änderungen in den berechneten Flächenmassedichten. Die relativen Änderungen belaufen sich unabhängig von der Oberfläche bei den Spülschritten mit NaCl oder hypersaliner Lösung auf nur wenige Prozent Massenverlust. Für beide Spülschritte zusammengefasst wird insgesamt ein Massenverlust von 1-6 % verzeichnet. Damit weisen die

muschel-inspirierten Polymere eine bemerkenswerte Haftung und Robustheit gegenüber sehr hohen Salzkonzentrationen auf.



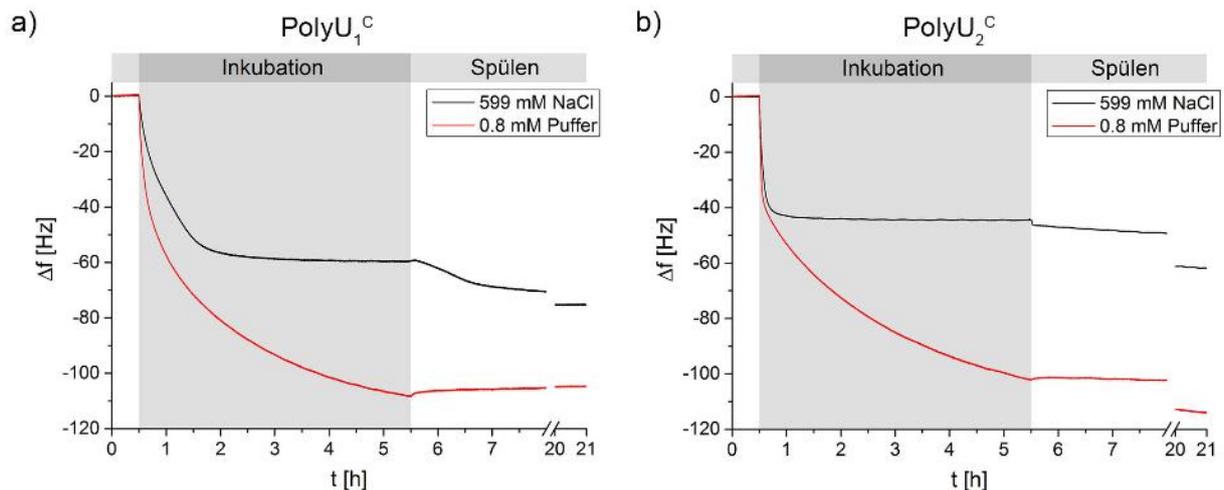
**Abbildung 4.26.** QCM-D-Stabilitätsexperimente durch Spülen von  $\text{PolyU}_1^c$ - und  $\text{PolyU}_2^c$ -beschichteten Sensoren mit salzhaltigen Lösungen. a) Spülschritt mit NaCl-Lösung (599 mM) auf  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . b) Spülschritt mit NaCl-Lösung (599 mM) auf Fluoropolymer. c) Spülschritt mit hypersaliner Lösung (4.2 M) auf  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . d) Spülschritt mit hypersaliner Lösung (4.2 M) auf Fluoropolymer. (Gestrichelte Linien dienen zur Orientierung, Frequenzverschiebung des dritten Obertons ( $n = 3$ )).

Für die  $\text{PolyU}_2^c$ -Beschichtung auf dem  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Substrat wird beim Spülschritt mit hypersaliner Lösung eine Verringerung von  $\Delta f$  beobachtet, und damit theoretisch eine Erhöhung der adsorbierten Masse. Dies ist bei der  $\text{PolyU}_1^c$ -Beschichtung auf dem Fluoropolymer-Substrat sogar noch deutlicher und für beide Spülschritte zu sehen. Eine Zunahme der Masse kann durch eine strukturelle Änderung der Polymerfilme erklärt werden, die dazu führt, dass mehr Wasser bzw. Puffer in die Beschichtung eingelagert wird.

**Tabelle 4.2.** Spülen von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>- und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Beschichtungen auf verschiedenen Oberflächen. Änderungen der Flächenmassedichten ( $\Delta m$ ) nach Spülschritten mit NaCl- und hypersaliner Lösung.

Beschichtung	599 mM NaCl		hypersaline Lösung		Gesamtänderung [%]
	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	Abweichung [%]	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	Abweichung [%]	
PolyU <sub>1</sub> <sup>C</sup> @ Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-50	-2.4	-100	-4.0	-6.3
PolyU <sub>2</sub> <sup>C</sup> @ Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-110	-3.5	70	2.1	-1.4
PolyU <sub>1</sub> <sup>C</sup> @ Fluoropolymer	700	22.8	950	6.8	29.5
PolyU <sub>2</sub> <sup>C</sup> @ Fluoropolymer	-20	-1.0	-90	-3.4	-4.4

Im Fall der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung auf dem Fluoropolymer-Substrat wird ein Anstieg der Dissipation in Verbindung mit höherer Frequenzabhängigkeit der Obertöne von 9-12 ppm vor den Spülschritten auf 9-22 ppm nach dem Spülen mit NaCl-Lösung und 10-27 ppm nach dem Spülen mit hypersaliner Lösung beobachtet (Abbildung E 55). Das spricht für eine starke Erhöhung der Viskoelastizität, die durch eine strukturelle Änderung der Beschichtung, induziert durch die hohe Ionenstärke, verursacht wurde. Eine genaue Massenänderung kann hier also durch den unbekanntem Wasseranteil nicht bestimmt werden. Die Ergebnisse der anderen Stabilitätstests sprechen jedoch dafür, dass die Beschichtungen ein hohes Maß an Robustheit und Resistenz gegen hochkonzentrierte Salzlösungen aufweisen.



**Abbildung 4.27.** Vergleich der QCM-D-Adsorptionskinetiken der Muschel-inspirierten Polymere bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen. Die Beschichtungen erfolgten bei einer Salzkonzentration von 599 mM NaCl und bei 0.8 mM Natriumcitratpuffer. a) Adsorptionskinetiken von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> auf Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Substraten. b) Adsorptionskinetiken von PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> auf Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Substraten. (Bedingungen für Polymerisation: 0.75 mM U<sub>1</sub><sup>C</sup>, 0.75 mM U<sub>2</sub><sup>C</sup>, 50 U/mL AbPPO4, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8); Bedingungen für Messung: Equilibrierung und Spülen mit 599 mM NaCl-Lösung oder 0.8 mM Natriumcitratpuffer (pH 6.8), Inkubation mit 34.1  $\mu$ M Probenlösung in 599 mM NaCl-Lösung oder 0.8 mM Citratpuffer (pH 6.8); Frequenzverschiebung des dritten Obertons ( $n = 3$ )).

Es wurden weitere Adsorptionsexperimente durchgeführt, bei denen die Ionenstärke schon während des Inkubationsschritts mit dem jeweiligen Polymer erhöht war. Dafür wurden PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> sowie PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>

im Verhältnis 1:21 mit 628 mM NaCl-Lösung verdünnt, sodass eine Polymerlösung mit einer Salzkonzentration von 599 mmol/L entstand. Anschließend fand dann die Messung der Polymeradsorption auf  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Substraten unter Meerwassermodellbedingungen statt, dessen Ergebnisse in Abbildung 4.27 dargestellt sind. Die Abbildung zeigt ebenfalls vergleichend die Adsorption in 0.8 mM Natriumcitratpuffer aus Abschnitt 4.4.1. Es ist eindeutig, dass die Adsorption bei erhöhter Ionenstärke beeinträchtigt wird. Die adsorbierte Masse von  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$  bei Adsorption in NaCl-Lösung beträgt 59 % der Masse bei Adsorption in Puffer-Lösung (siehe Tabelle 4.3). Für  $\text{PolyU}_2^{\text{C}}$  wird eine Beschichtung mit 48 % der vorher in Puffer gemessenen adsorbierten Masse verzeichnet. Ebenso verläuft die Adsorptionskinetik, insbesondere für  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ , langsamer und es wird ein Equilibrium nach zwei Stunden bzw. einer Stunde innerhalb der Inkubationszeit beobachtet. Im Gegensatz dazu findet bei den Beschichtungsexperimenten in Pufferlösung eine kontinuierliche Absenkung von  $\Delta f$  während der gesamten fünfstündigen Inkubationszeit statt.

**Tabelle 4.3.** Flächenmassedichten ( $\Delta m$ ) der  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ - und  $\text{PolyU}_2^{\text{C}}$ -Beschichtungen auf  $\text{Al}_2\text{O}_3$  bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen, berechnet mit dem SAUERBREY- und VOIGHT-Modell.

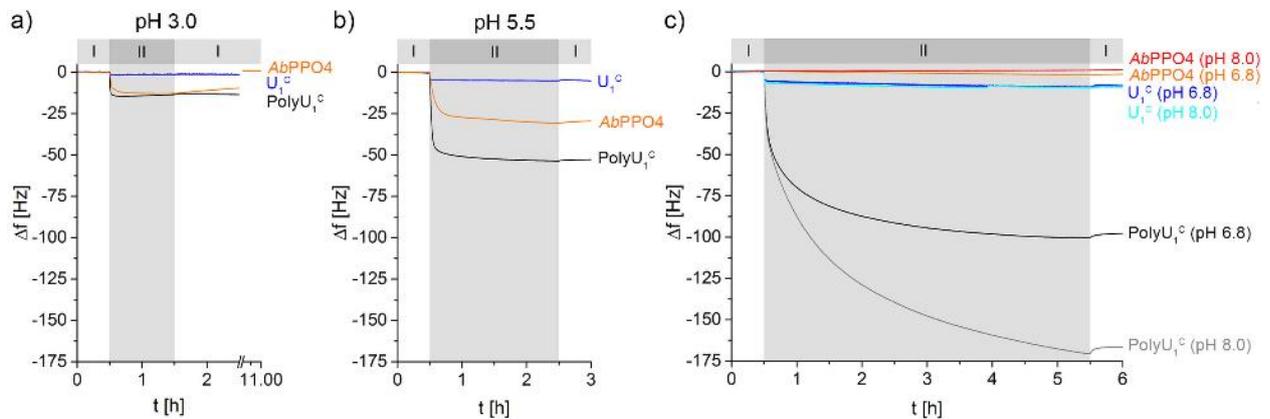
Beschichtung	$\Delta m$ SAUERBREY [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta m$ VOIGHT [ng/cm <sup>2</sup> ]	Abweichung [%]
$\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ (Na-Citratpuffer)	1730 ± 110	4020 ± 480	132
$\text{PolyU}_2^{\text{C}}$ (Na-Citratpuffer)	1580 ± 140	2950 ± 350	87
$\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ (NaCl)	990 ± 30	2360 ± 190	139
$\text{PolyU}_2^{\text{C}}$ (NaCl)	890 ± 70	1420 ± 110	60

Die Differenz der nach SAUERBREY oder VOIGHT berechneten Flächenmassedichten ist vergleichbar mit denen bei Inkubation im Natriumcitratpuffer. Die viskoelastischen Anteile sind also ähnlich hoch, wie bei den zuvor gemessenen Beschichtungen. Interessanterweise findet jedoch im Spülschritt mit 599 mM NaCl eine weitere Verringerung von  $\Delta f$  statt, die von einer Erhöhung von  $\Delta D$  und der Frequenzabhängigkeit begleitet wird (siehe Abbildung E 50). Die viskoelastischen Eigenschaften verstärken sich also im weiteren Verlauf beim Spülen mit NaCl. Bei erhöhter Ionenstärke konkurrieren elektrostatische Wechselwirkungen der Polymere in verstärktem Maße mit denen der gelösten Ionen. Bei gleichbleibender Polymerkonzentration während der Inkubation stellt sich ein Gleichgewicht zwischen intermolekularen Polymer- und Elektrolytwechselwirkungen ein. Durch das Entfallen von Polymeren in der Lösung kommt es im Spülschritt zu einer erhöhten Beeinflussung der intermolekularen kohäsiven Wechselwirkungen der adsorbierten Polymerfilme durch gelöste Ionen, sodass eine kontinuierliche Einlagerung von Wasser in den Film erfolgt. Dieser Effekt bewirkt jedoch nicht, dass die Beschichtungen instabil werden und eine Abtragung der Polymerschicht einsetzt. Das zeigt sich auch in der Stabilität beim Spülen mit hypersaliner Lösung, was zu vernachlässigbaren

Unterschieden in der adsorbierten Masse von -1.7 % für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und 1.4 % für PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> führt, die im Fehlerbereich der Messungen liegen. Somit lässt sich sagen, dass die Muschel-inspirierten Polymere sogar unter Meerwasserbedingungen irreversibel an die Oberfläche von Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> adsorbieren und dabei stabile Beschichtungen aufbauen.

#### 4.4.3 pH-abhängige Adsorption

Die bisherigen Messungen wurden an verschiedenen Oberflächen bei einem gleichbleibenden annähernd neutralen pH-Wert von 6.8 durchgeführt. Um neben der Oberfläche den Einfluss des pH-Wertes auf die Adsorptionskinetik und Stabilität der Beschichtungen zu untersuchen, wurden auf Siliziumdioxid-beschichteten QCM-D-Sensoren Messungen von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> im pH-Bereich von pH 3.0 - 8.0 ausgeführt. Dazu wurde U<sub>1</sub><sup>C</sup> bei den verschiedenen Experimenten unter gleichen Bedingungen mit 0.75 µmol/mL Substratkonzentration und 50 U/mL AbPPO<sub>4</sub> (AAV5) für 1 h polymerisiert. Anschließend wurde der pH-Wert der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Lösung mit zusätzlichem Puffer auf den gewünschten Wert eingestellt und die erhaltene Lösung verdünnt, sodass eine konstante Polymerkonzentration von 34.1 µmol/L erhalten wurde. Es folgte dann unmittelbar die QCM-D-Messung beim entsprechenden pH Wert.



**Abbildung 4.28.** QCM-D-Adsorptionskinetiken von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> sowie der Unimer- und Enzymreferenzen auf SiO<sub>2</sub> bei verschiedenen pH Werten. a) pH 3.0 b) pH 5.5 c) pH 6.8 und 8.0. Vor und nach dem Inkubationsschritt mit der entsprechenden 34.1 µM Polymerlösung (II) wurde mit dem jeweiligen Puffer (I) gespült. (Bedingungen für Polymerisation: 0.75 mM U<sub>1</sub><sup>C</sup>, 0.75 mM U<sub>2</sub><sup>C</sup>, 50 U/mL AbPPO<sub>4</sub>, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8); Frequenzverschiebung des dritten Obertons (n = 3)).

In Abbildung 4.28 sind die Kinetiken der Adsorption von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> auf SiO<sub>2</sub> dargestellt. Es wird deutlich, dass die adsorbierte Menge an PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> mit zunehmendem pH signifikant steigt. Damit einhergehend wird beobachtet, dass sich im sauren Bereich, bei pH 3.0 und 5.5, im Gegensatz zum neutralen und basischen Bereich ein Equilibrium einstellt. Dies ist an dem konstanten  $\Delta f$  Signal während der Polymerinkubation zu erkennen und weist auf eine Limitierung der Multischichtbildung

hin. Die Adsorption findet irreversibel statt, da auch hier eine geringe oder keine Frequenzerhöhung im Pufferspülschritt zu beobachten ist.

Es wurden weiterhin die Unimere und das Enzym *AbPPO4* als Referenz unter den gleichen Bedingungen gemessen. Die Adsorption der Unimer-Referenz ist über den gesamten pH-Bereich gering und steigt von  $\Delta f_3 = -2$  Hz bei pH 3.0 auf  $\Delta f_3 = -11$  Hz bei pH 8.0 an. Auch wenn es sich um eine schwache Adsorption handelt, ist die Tendenz zu erkennen, dass das unmodifizierte Peptid mit steigendem pH-Wert stärkere Wechselwirkungen mit der  $\text{SiO}_2$ -Oberfläche eingeht.

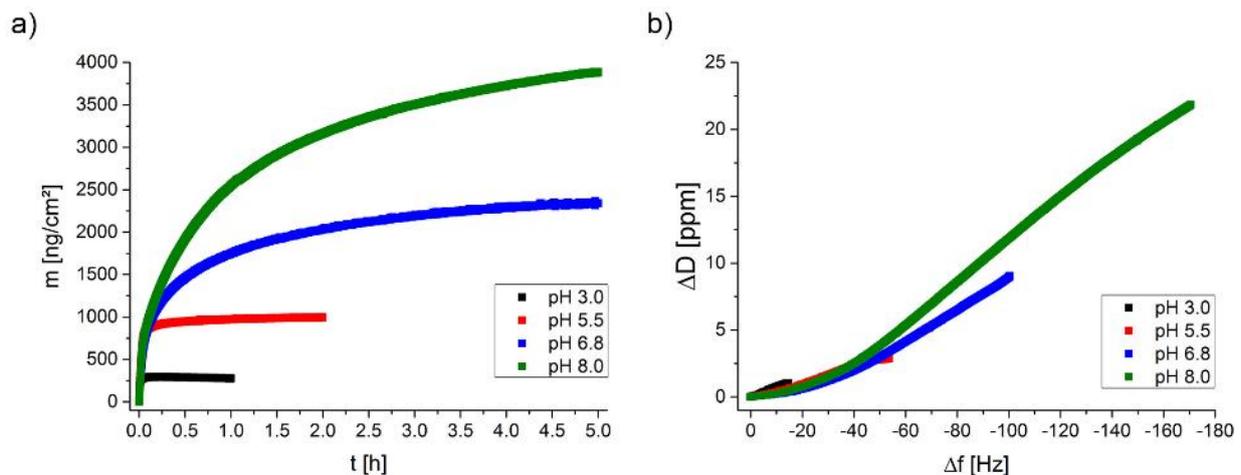
Für die Enzym-Referenz zeigt sich ein Maximum der Adsorption bei pH 5.5. Mit  $\Delta f_3 = -31$  Hz ist diese nicht zu vernachlässigen und erreicht 57 % der  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ -Adsorption. Bei pH 3.0 ist die Enzym-Adsorption mit  $\Delta f_3 = -13$  Hz zwar geringer, aber ist fast so hoch wie die des Polymers (95 %). Die Adsorption des Enzyms steht im sauren pH-Bereich also verstärkt in Konkurrenz zur Polymer-Adsorption und die Inkorporation von *AbPPO4* in die  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ -Beschichtung ist wahrscheinlicher als bei den Beschichtungen bei höherem pH-Wert. Allerdings zeigt  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$  eine schnellere Adsorptionskinetik und wird somit vorrangig die Primäradsorption ausmachen. Zudem bleibt die  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ -Beschichtung im Pufferspülschritt stabil (siehe Abbildung E 57), während das Enzym vollständig von der Oberfläche entfernt wird, wie in Abbildung 4.28a zu sehen ist. Es werden also nur schwache Wechselwirkungen zwischen *AbPPO4* und der  $\text{SiO}_2$ -Oberfläche eingegangen, die in Anwesenheit von  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$  vermutlich nicht mit denen des Polymers konkurrieren können.

**Tabelle 4.4.** PH Wert Einfluss auf Flächenmassedichten ( $\Delta m$ ) für die  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ -Beschichtungen auf  $\text{SiO}_2$ , berechnet mit dem SAUERBREY- und VOIGHT-Modell.

Beschichtung	$\Delta m$ SAUERBREY [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta m$ VOIGHT [ng/cm <sup>2</sup> ]	Abweichung [%]
$\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ @ silica pH 3	250 ± 170	275 ± 25	10
$\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ @ silica pH 5.5	890 ± 30	1030 ± 90	16
$\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ @ silica pH 6.8	1620 ± 100	2340 ± 230	44
$\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ @ silica pH 8.0	2570 ± 280	3870 ± 410	51

Die Gegenüberstellung der Flächenmassedichte berechnet nach dem SAUERBREY- und dem VOIGHT-Modell ist in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Es treten Unterschiede von 10-51 % in den Ergebnissen der beiden verschiedenen Modelle auf, was zeigt, dass die  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ -Filme viskoelastische Anteile aufweisen. Somit ergeben sich aus den Berechnungen nach dem viskoelastischen VOIGHT-Modell adsorbierte Massen von  $2.8 \pm 0.3$ ,  $10.3 \pm 0.9$ ,  $23.4 \pm 2.3$  und  $38.7 \pm 4.1$  mg/m<sup>2</sup> für die pH-Werte von pH 3.0, 5.5, 6.8 und 8.0. Das entspricht  $2.3 \pm 0.2$ ,  $8.6 \pm 0.7$ ,  $19.5 \pm 1.9$  und  $32.2 \pm 2.6$  nm Schichtdicke für die jeweiligen Beschichtungen. Die adsorbierten Massen und Schichtdicken der  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ -Filme nehmen also in beträchtlichem Maße mit steigendem pH-Wert zu.

Diese Beobachtung ist höchstwahrscheinlich durch elektrostatisch dominierte Wechselwirkungen begründet. PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> besitzt einen isoelektrischen Punkt von  $pI_{\text{calc.}} \sim 10.2$  und ist damit, mit einer Nettoladung von  $+3 e$  bis  $+2.8 e$  pro Wiederholungseinheit, über den gesamten untersuchten pH-Bereich positiv geladen. SiO<sub>2</sub> weist, je nach Beschaffenheit und Messbedingungen, einen durchschnittlichen Oberflächen-pI im Bereich von 2.4 bis 3.8 auf.<sup>256,257</sup> Mit steigendem pH verschiebt sich das Oberflächen-Zeta-Potential von SiO<sub>2</sub> kontinuierlich zu negativeren Werten,<sup>258</sup> was zu einer Zunahme der elektrostatischen Interaktion mit dem Polymer, und wie bereits beobachtet mit den Unimeren, führt. Dieser Effekt wurde auch bei pH-abhängigen Adsorptionsstudien von *Meffp-1* auf Siliziumkeramiken, die ein ähnliches Oberflächenladungsprofil aufweisen wie SiO<sub>2</sub>, beobachtet.<sup>259</sup> Dabei wurde ebenfalls eine signifikante Erhöhung der adsorbierten Masse mit steigendem pH-Wert gemessen, was auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführt wurde, die mit einer erhöhten Oberflächenladungsdichte einhergehen. Darüber hinaus kann die Oxidation von Dopa zu  $\Delta$ Dopa, die bei höheren pH-Werten auftritt, zu Konformationsänderungen und erhöhten Filmdicken führen, was zu erhöhten Flächenmassendichten bei höherem pH-Wert beiträgt.<sup>116,238</sup>



**Abbildung 4.29.** Beschichtungseigenschaften von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> bei verschiedenen pH-Werten auf SiO<sub>2</sub>-Oberflächen. a) Zeitliche Änderung der Flächenmassedichte nach dem VOIGHT-Modell. b) Auftragung von Dissipations- gegen Frequenzänderung  $\Delta D/\Delta f$  als Maß für die Viskoelastizität der gebildeten Beschichtungen.

**Tabelle 4.5.** Spülen von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtungen auf SiO<sub>2</sub>. Änderungen der Flächenmassedichten ( $\Delta m$ ) nach Spülschritten mit NaCl- und hypersaliner Lösung.

Beschichtung	599 mM NaCl		hypersaline Lösung		Gesamtänderung [%]
	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	Abweichung [%]	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	Abweichung [%]	
pH 3.0	10	4.1	-60	-26.1	-23.1
pH 5.5	-160	-5.9	-30	-1.1	-6.9
pH 6.8	-40	-1.1	-50	-1.4	-2.5
pH 8.0	-20	-0.5	-70	-1.4	-1.9

Die Abweichung in den Flächenmassedichten zwischen dem SAUERBREY- und VOIGHT-Modell nimmt ebenfalls mit steigendem pH-Wert zu. Die dünneren Beschichtungen sind also rigider und die dickeren Filme besitzen größere viskoelastische Anteile. Das wird auch aus der Auftragung des Verhältnisses von Dissipationsänderung zu Frequenzänderung  $\Delta D/\Delta f$  deutlich (Abbildung 4.29b). Die Steigung ist dort für die Adsorptionsprozesse bei pH 6.8 und pH 8.0 am größten. Für die Beschichtung bei pH 8.0 wird eine deutliche Änderung der Steigung beobachtet, was ein Hinweis auf strukturelle Änderungen des Polymerfilms ist. Dies könnte mit dem Anteil an  $\Delta D_{\text{Dopa}}$  korrelieren, dessen Bildung bei höherem pH schneller voranschreitet und der dazu führen könnte, dass die Polymerketten weniger dicht gepackt sind, was die Viskoelastizität erhöht. Zusätzlich enthalten die dickeren Beschichtungen wahrscheinlich eine größere Menge an gekoppelten Wassermolekülen.

Wie aus Abbildung 4.29a hervor geht, ist der Einfluss des pH-Wertes auf die Adsorptionskinetik sehr gering. Die initiale Adsorptionsgeschwindigkeit ist für die Experimente bei verschiedenen pH-Werten annähernd gleich. Die Änderungen der Oberflächenladungsdichte beeinflussen also die Stärke der Adsorption aber nicht die Kinetik.

Auch die Beschichtungstabilität ist scheinbar pH-unabhängig. Die absoluten und relativen Massenänderungen sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst und zeigen, dass lediglich zwischen 20 und 160 ng/cm<sup>2</sup> der Beschichtungen durch 599 mM NaCl oder 4.2 M hypersaline Lösung abgewaschen werden, was Massenverlusten von 1-6 % entspricht. Nur bei der Beschichtung bei pH 3.0 wird ein größerer relativer Massenverlust von 26 % beobachtet, da die ursprünglich adsorbierte Masse unter diesen Bedingungen mit 275 ng/cm<sup>2</sup> sehr gering ist.

#### 4.4.4 Teilzusammenfassung

Mithilfe von QCM-D-Experimenten wurde gezeigt, dass zwei wesentlich unterschiedliche Arten von Oberflächen effektiv mit PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> beschichtet werden können. Zum einen polare Metalloxid-Oberflächen in Form von Aluminiumoxid und Siliziumdioxid, zum anderen eine unpolare Fluoropolymer-Oberfläche. Die Polymere zeigen in allen Fällen eine schnelle Adsorptionskinetik und

bilden Multischichten aus, die eine hohe Stabilität aufweisen. Die Unimere und das Enzym allein führen hingegen zu einer vernachlässigbaren oder gar keiner Adsorption, was zeigt, dass sowohl die sequenzielle Wiederholung der *Mefp*-1 Konsensussequenz als auch die Cysteinyl-dopa-Gruppen im Polymer zum exzellenten Beschichtungsverhalten beitragen.

Die Trends im Adsorptionsverhalten sind für die verschiedenen Oberflächen ähnlich. Es werden Beschichtungen mit Flächenmassedichten von 17.5 - 40.2 mg/m<sup>2</sup> erhalten, die Schichtdicken von 14.6 - 33.5 nm entsprechen. Diese sind für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> jeweils höher als für PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> und für die jeweiligen Polymere auf Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Substraten generell höher als auf Fluoropolymer-Substraten. Über den Vergleich der Ergebnisse aus den Berechnungen über das SAUERBREY- und VOIGHT-Modell und über das Verhältnis von Dissipationsänderung zu Frequenzänderung  $\Delta D/\Delta f$  wurde ermittelt, dass die Polymerfilme viskoelastische Anteile aufweisen, die für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> höher ausfallen als für PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>. Das liegt in der unterschiedlichen Art der Vernetzung begründet, die in PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> durch kovalente intermolekulare Bindungen zu rigideren Beschichtungen führt. Die initiale Adsorptionsgeschwindigkeit unterscheidet sich bei PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> für die verschiedenen Oberflächen, wohingegen für PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> eine annähernd gleiche Geschwindigkeit beobachtet wird. Der höhere Dopa-Anteil in PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> ist hierbei wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass bei der Adsorption auf verschiedenen Oberflächen weniger differenziert wird, da Dopa in der Lage ist über unterschiedliche Bindungsmodi primäre Wechselwirkungen zu einer Oberfläche zu ermöglichen.

Stabilitätstests haben gezeigt, dass die Beschichtungen resistent gegen Lösungen mit hoher Ionenstärke sind. Sie halten Spülschritten mit 599 mM NaCl-Lösung und 4.2 mM hypersaliner Lösung stand, in denen lediglich ein Massenverlust von 1 - 6 % verzeichnet wird. Zudem sind die Muschel-inspirierten Polymere in der Lage in einer NaCl-Lösung mit erhöhter Salzkonzentration, die der vom Meerwasser entspricht (599 mM), an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Substrate zu adsorbieren. Die adsorbierten Massen der dabei entstandenen Beschichtungen machen immerhin noch 59 % bzw. 48 %, für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>, der Massen aus, die unter weniger drastischen Bedingungen in 0.8 mM Natriumcitratpuffer adsorbiert werden.

Auf SiO<sub>2</sub>-Substraten wurde die pH-Abhängigkeit der Adsorption von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> im Bereich von pH 3 - 8 untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die adsorbierte Masse mit zunehmendem pH-Wert ansteigt und von 2.8 - 38.7 mg/m<sup>2</sup> reichen, was Schichtdicken von 2.3 - 32.2 nm entspricht. Dieser Effekt kann auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführt werden, die den Adsorptionsprozess dominieren und mit der pH-abhängigen Oberflächenladungsdichte von SiO<sub>2</sub> korrelieren. Die nicht aktivierten Unimere zeigen keine oder nur geringfügige Adsorption, die allerdings ebenfalls mit zunehmendem pH-Wert steigt. Das Enzym *AbPPO4* weist hingegen bei niedrigeren pH-Werten

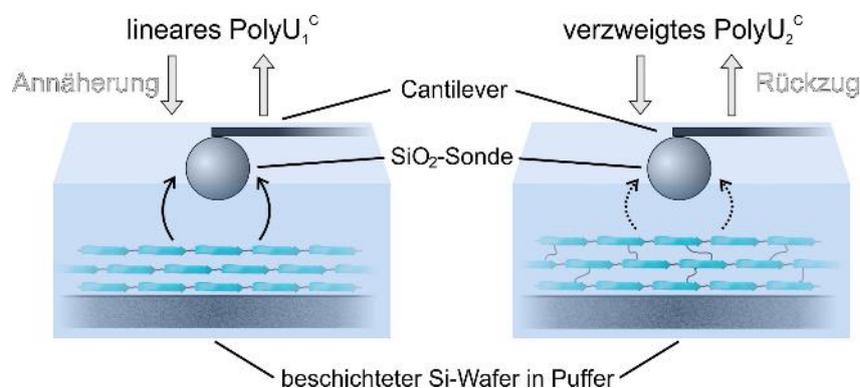
erhöhte Adsorption auf, die in Konkurrenz zur PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Adsorption steht. Es ist jedoch davon auszugehen, dass der Anteil an adsorbiertem Enzym im Polymerfilm gering ist, da die Adsorption im Gegensatz zum Polymer reversibel und die Adsorptionskinetik langsamer ist. Anhand der Gegenüberstellung der Flächenmassedichten nach dem SAUERBREY- oder VOIGHT-Modell sowie dem Verhältnis  $\Delta D/\Delta f$  ist ersichtlich, dass die viskoelastischen Eigenschaften ebenfalls mit steigendem pH-Wert zunehmen. Die vermehrte auftretende Tautomerie zu  $\Delta$ Dopa könnte dazu beitragen, dass strukturelle Änderungen in den Polymerfilmen auftreten, die eine erhöhte Viskoelastizität bewirken. Die Adsorptionskinetik und die Beschichtungsstabilität scheinen unabhängig vom pH-Wert zu sein, da bei Spülschritten mit 599 mM NaCl-Lösung und 4.2 mM hypersaliner Lösung nur geringe Massenverluste auftreten.

Somit kann abschließend festgestellt werden, dass die Muschel-inspirierten Polymere eine hohe Oberflächenvariabilität der Adsorption und eine stabile, widerstandsfähige Haftung aufweisen. In diesen Aspekten sind sie also durchaus in der Lage die natürlichen Muschelfußproteine zu imitieren.

## 4.5 Adhäsionsstudien

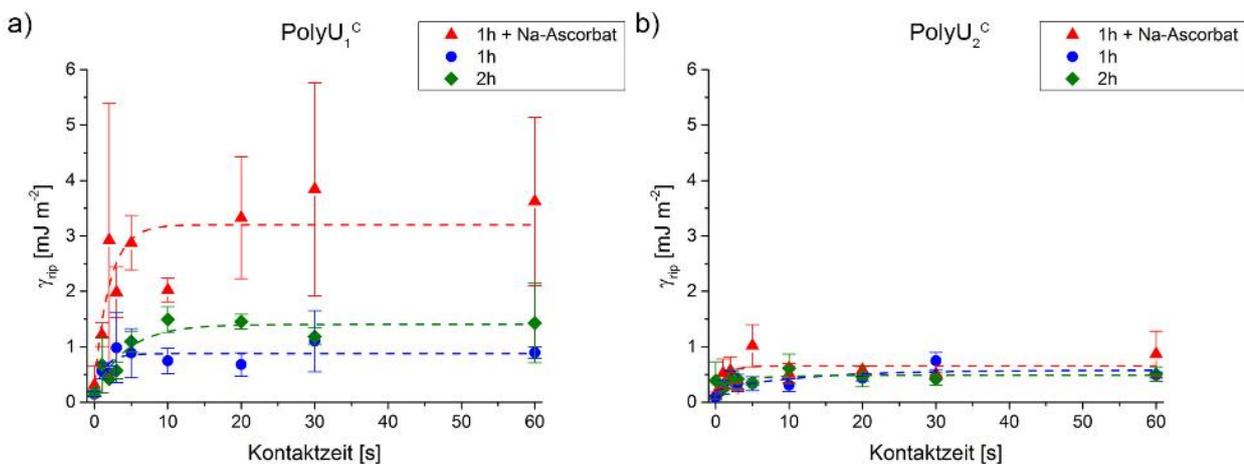
### 4.5.1 Adhäsion von Muschel-inspirierten Polymeren

Nachdem das bemerkenswerte Adsorptionsverhalten der Muschel-inspirierten Polymere untersucht wurde, sollte nun deren Adhäsion in Pufferlösung genauer beleuchtet werden. Dies wurde mithilfe von Kolloidalrastersondenmikroskopie (CP-AFM) in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. ANDREAS FERY im *Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V.* bewerkstelligt. Die Durchführung der Messungen wurde von MAXIMILIAN SEUSS und INGA MELNYK übernommen und die Auswertung der Messdaten erfolgte durch MAXIMILIAN SEUSS. Für die Messungen wurden passivierte Siliziumwafer mit einer Oxidschicht als Substrate genutzt. Die beiden Unimere  $U_1^C$  und  $U_2^C$  wurden nach Standardbedingungen (AAV5) mit einer Konzentration von 0.75 mmol/L und 50 U/mL *AbPPO4* für 10 min polymerisiert und die Substrate anschließend für 1 h und 2 h in der Polymerlösung beschichtet. Eine kugelförmige Siliziumdioxid-Sonde mit einem Radius von 2,4  $\mu\text{m}$  wurde zur Messung der symmetrischen adhäsiven Wechselwirkungen der Polymere mit den  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen genutzt. Wie im schematischen Versuchsaufbau in Abbildung 4.30 dargestellt, wurde die kolloidale Sonde in Pufferlösung an die beschichteten Substrate herangeführt und wieder zurückgezogen, was die Aufzeichnung von Kraft-Abstands-Kurven erlaubt. Die Annäherung erfolgte mit variierender Anpresskraft zwischen 2 und 50 nN. Bei jeder Anpresskraft wurden zudem Messungen mit unterschiedlicher Kontaktzeit von 0 bis 60 s durchgeführt. Dies wurde für drei unterschiedliche Stellen auf jeder Beschichtung ausgeführt und jeweils dreimal wiederholt. Das ergibt in der Summe 405 Einzelmessungen, die für jede Beschichtung aufgezeichnet wurden, um eine repräsentative Statistik zu erhalten, mithilfe derer sich Aussagen über das makroskopische Adhäsionsverhalten der Polymerfilme treffen lassen.



**Abbildung 4.30.** Schematische Darstellung der CP-AFM Kontaktanalyse zur Messung der Adhäsion von Muschel-inspirierten Polymeren. Es wurden Siliziumwafer mit  $\text{PolyU}_1^C$  (links) oder  $\text{PolyU}_2^C$  (rechts) beschichtet und die verbrückende Adhäsion an einer kugelförmigen Siliziumsonde in Pufferlösung gemessen.

Nach einer eigens entwickelten Methodik, die im Detail in Abschnitt 6.4.7 beschrieben ist, wurden flächennormierte Adhäsionsenergien aus den Messungen extrahiert. Dafür wurde aus den Adhäsionskräften, die über die Kraft-Abstands-Kurven direkt zugänglich sind, die Adhäsionsarbeit  $\gamma_{MD}$  nach dem MAUGIS-DUGDALE-Modell<sup>260</sup> in der Annäherung von CARPICK *et al.*<sup>261</sup> berechnet. Diese Theorie basiert auf einfachen Abrissvorgängen, es wurden jedoch in den vorliegenden Messungen mehrere Abrissevents beobachtet. Daher erfolgte eine Erweiterung der Auswertung, die eine Bestimmung der Adhäsionsarbeit oder Adhäsionsenergie pro Flächeneinheit für sequenzielle Abrissereignisse  $\gamma_{rip}$  ermöglicht. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abbildung 4.31 grafisch dargestellt und zeigen die Korrelation von Adhäsionsarbeit und Kontaktzeit der Sonde mit der Polymerbeschichtung bei einer Anpresskraft von 2 nN. Mit zunehmender Kontaktzeit findet eine Erhöhung der Adhäsionsarbeit in einem nicht-linearem Zusammenhang im gesamten Probensatz für alle Messreihen (siehe Abbildung E 69) statt. Diese Beobachtung lässt sich durch ein dynamisches Verhalten der Beschichtungen an der Kontaktfläche mit der Sonde erklären. Die Polymerketten scheinen sich adaptiv an die exponierte Oberfläche anzupassen, um die Wechselwirkungen zu dieser zu optimieren. Der Prozess nimmt einige Zeit in Anspruch, was darin gesehen werden kann, dass innerhalb der ersten 10 s eine große Änderung in der Adhäsionsarbeit zu verzeichnen ist.



**Abbildung 4.31.** Ergebnisse der CP-AFM Adhäsionsmessungen der Beschichtungen mit den Muschel-inspirierten Polymeren. a) PolyU<sub>1</sub><sup>c</sup>-Beschichtung. b) PolyU<sub>2</sub><sup>c</sup>-Beschichtung. Dargestellt ist die flächennormierte sequenzielle Adhäsionsarbeit  $\gamma_{rip}$  in Abhängigkeit der Kontaktzeit der kolloidalen SiO<sub>2</sub>-Sonde mit der Polymerbeschichtung bei einer konstanten Anpresskraft von 2 nN. Die Substrate wurden für 1 h, für 2 h und für 1 h + Behandlung mit Natriumascorbat (1 h) beschichtet. (Bedingungen für Polymerisation: 0.75 mM U<sub>1</sub><sup>c</sup>, 0.75 mM U<sub>2</sub><sup>c</sup>, 50 U/mL AbPPO4, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8); Adsorption bei pH 6.8; gestrichelte Linien dienen zur Orientierung).

**Tabelle 4.6.** Flächennormierte Adhäsionsarbeit ( $\gamma_{rip}$ ) der verschiedenen Polymerbeschichtungen mit unterschiedlichen Beschichtungsbedingungen nach 60 s Kontaktzeit.

Polymer	PolyU <sub>1</sub> <sup>C</sup>			PolyU <sub>2</sub> <sup>C</sup>			
	Beschichtung	1 h	2 h	1 h + Na-Ascorbat	1 h	2 h	1 h + Na-Ascorbat
Adhäsionsarbeit $\gamma_{rip}$ [mJ m <sup>-2</sup> ]		0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.7	3.6 ± 1.5	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.4

Da PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> eine verzweigte und starrere Struktur als PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> besitzt, ist es naheliegend, dass für PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> auch geringe Adhäsionsenergien gemessen werden. Sie reichen für die einfachen Beschichtungsexperimente bis zu 0,5 mJ/m<sup>2</sup>. Die Adhäsionsarbeit unterscheidet sich faktisch nicht für die beiden verschiedenen Polymerfilme, die nach einer oder zwei Stunden Beschichtungszeit gewonnen wurden. Im Gegensatz dazu zeigt die PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung Adhäsionsenergien von bis zu 0,9 mJ/m<sup>2</sup> nach 1 h und 1,4 mJ/m<sup>2</sup> nach zwei Stunden Beschichtungszeit. Die flexiblere Struktur erlaubt somit eine bessere Anpassung an die Sondenoberfläche. Nicht nur die Kontaktzeit, sondern auch die Beschichtungszeit hat bei der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung einen größeren Einfluss auf das Adhäsionsverhalten als bei PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>. Wie in Abschnitt 4.4.1 diskutiert, bildet PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> dickere und viskoelastischere Beschichtungen. Das trägt zur besseren Oberflächenanpassungsfähigkeit bei und würde auch erklären, warum eine längere Beschichtungszeit zu einer stärkeren Adhäsion führt. Mit längerer Beschichtungsdauer erhöht sich auch die Schichtdicke und gleichermaßen die Kontaktfläche zur Sonde, die in die Beschichtung eindringt. Beide Faktoren, Anpassungsfähigkeit (Viskoelastizität) und Schichtdicke, tragen somit zur höheren Adhäsionsstärke von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> bei.

Neben den einfachen Beschichtungsexperimenten wurden die Substrate zusätzlich nach einstündiger Beschichtung eine weitere Stunde unter Zugabe von Natriumascorbat beschichtet. Das führt zu einer beträchtlichen Steigerung der Adhäsionsenergien um einen Faktor von 1,8-2,6 zu Werten von bis zu 0,9 mJ/m<sup>2</sup> für PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> und 3,6 mJ/m<sup>2</sup> für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>. Natriumascorbat ist als Reduktionsmittel in der Lage Dopachinon zu Dopa zu reduzieren. Da Dopa zu metalloxidischen Oberflächen stärkere Bindungen ausbildet als Dopachinon,<sup>106,116,134</sup> ist folglich in der Zeit für die Probenvorbereitung und -messung eine Oxidation von Cysteinyl-dopa zu Chinon-Derivaten aufgetreten. Offensichtlich in einem Maße, das die Adhäsion beeinträchtigt, obwohl in HPLC-Kinetiken in Abschnitt 4.2.1 gezeigt wurde, dass die Oxidation der Cysteinyl-dopa-Einheit zu Cysteinyl-dopachinon für U<sub>1</sub><sup>S</sup>-U<sub>1N</sub><sup>C</sup> Dimere verlangsamt stattfindet. Durch die Anwesenheit eines Antioxidans konnten jedoch die Cysteinyl-dopa-Funktionalitäten im Polymer regeneriert und die Adhäsionsarbeit weiter erhöht werden, ähnlich wie auch die Muschel die Oxidation von Dopa verhindert.<sup>110,117</sup> Der generell höchste Adhäsionswert einer Einzelmessung wurde unter diesen

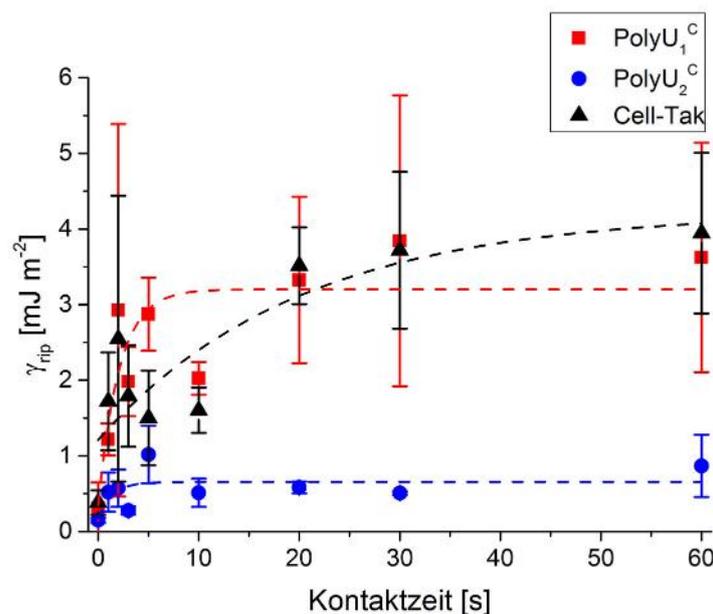
Bedingungen beobachtet und erreicht  $10.9 \text{ mJ/m}^2$  für die PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung bei 30 s Kontaktzeit und 20 nN Anpresskraft.

Die hier gemessenen Adhäsionsenergien übertreffen jene, die für natürliche isolierte mfps mittels surface forces apparatus (SFA) gemessen wurden. Der SFA wird schon seit längerem zur Messung von intermolekularen Wechselwirkungen und Oberflächenkräften in verschiedenen biologischen und nicht-biologischen Systemen eingesetzt.<sup>32,78,114,129,133,153,262-266</sup> Der Versuchsaufbau ähnelt dabei dem der hier durchgeführten CP-AFM-Messungen, trotzdem wurden für einen exakteren Vergleich auch eigene Experimente von nativen mfps mittels CP-AFM durchgeführt (siehe Abschnitt 4.5.2). In den SFA Studien wurde ein SiO<sub>2</sub>-Substrat mit einer entsprechenden Proteinlösung in einem Acetat-Nitrat-Puffer bei pH 5.5 beschichtet und im Anschluss wurden die Adhäsionskräfte zu einer weiteren unbeschichteten Oberfläche nach einer gewissen Kontaktzeit aufgezeichnet. Dabei zeigte die Adhäsion von mfp-1, das durch die Decapeptid Konsensussequenz mit den synthetischen Muschel-inspirierten Polymeren am stärksten verwandt ist, nur eine geringe Adhäsionsarbeit von  $0.07 - 0.1 \text{ mJ/m}^2$  bei Kontaktzeiten von 2 s bis 60 min.<sup>133</sup> Es ist bemerkenswert, dass PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und auch PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> bereits nach 60 s Kontaktzeit wesentlich höhere Adhäsionsenergien liefern. Weiterhin erreichten die spezialisierten Muschelfußproteine mfp-3 und mfp-5, die an der Schnittstelle von Oberfläche und Muschel-Plaque sitzen, maximale Adhäsionsenergien von 2.99 bzw.  $2.44 \text{ mJ/m}^2$ .<sup>133</sup> Diese übertreffen die Adhäsionsstärke von PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> aber die maximale Adhäsionsarbeit von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> wird dabei nicht erreicht. Anhand des Vergleiches bieten die Muschel-inspirierten Polymere eine Adhäsionskraft die den natürlichen Vorbildern entspricht und sogar darüber hinausgeht. Weiterhin ist auch zu beachten, dass für mehrere native mfps, einschließlich mfp-1, ein vollständiger Verlust der Adhäsionskraft bei pH 7 - 7.5 beobachtet wurde.<sup>32,129</sup> Währenddessen sind die Muschel-inspirierten Polymere in der Lage hohe Adhäsionsenergien bei pH 6.8 auszubilden.

#### 4.5.2 Adhäsion von kommerziellen Muschelfußextrakten

Auch wenn der SFA schon vielfältigen Einsatz gefunden hat, so sind Vergleichswerte zu den hier diskutierten CP-AFM Studien, insbesondere auf der gleichen Oberfläche, rar. Zudem ist ein absoluter Vergleich oft schwierig, da die Ergebnisse von Adhäsionsmessungen stark von den experimentellen Parametern wie Abziehggeschwindigkeit, Kontaktzeit, geometrischer Aufbau sowie auch Pufferzusammensetzung und pH Wert abhängig sind. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu Adhäsionswerten natürlicher mfps zu ermöglichen, wurden daher CP-AFM Referenzexperimente mit einem handelsüblichen Proteinextrakt aus *Mytilus edulis* (Cell-Tak™) durchgeführt. Cell-Tak™ ist eine komplexe Mischung aus verschiedenen mfps<sup>177,267</sup>, einschließlich *Mefp-1* als Hauptkomponente<sup>268</sup>,

und wird als Zell- und Gewebekleber eingesetzt, der für einen neutralen pH Wert optimiert ist. Somit konnten die Referenzmessungen bei pH 6.8 unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden wie die Messungen der Muschel-inspirierten Polymere. Für optimale Ergebnisse wurde die Beschichtung ebenfalls für eine Stunde mit einer weiteren Stunde Beschichtungszeit unter Zugabe von Natriumascorbat durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 4.32 dargestellt und mit denen von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> verglichen. Sie führen zu den gleichen Schlussfolgerungen wie der obige Literaturvergleich. Die Adhäsionsarbeit von Cell-Tak™ erreicht Werte von bis zu 3.9 mJ/m<sup>2</sup>, gegenüber 3.6 mJ/m<sup>2</sup> für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und 0.9 mJ/m<sup>2</sup> für PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>. Die Adhäsion des Proteinextraktes befindet sich somit in einem ähnlichen Bereich wie für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und ist deutlich höher als für PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>. Cell-Tak™ ist für eine Anwendung im neutralen pH Bereich optimiert und eine Proteinmischung, die neben mfp-1 weitere mfps enthält, die in isolierter Form weitaus stärkere Adhäsion als mfp-1 aufweisen.<sup>106,129,133</sup> In Anbetracht dieses Umstands, zeigt PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> eine gute adhäsive Leistung, die folglich mindestens so hoch sein muss, wie die des natürlich vorkommenden *Mefp-1*.



**Abbildung 4.32.** Vergleich der CP-AFM Adhäsionsmessungen der Beschichtungen aus Muschel-inspirierten Polymeren und Cell-Tak™. Die flächennormierte sequenzielle Adhäsionsarbeit  $\gamma_{rip}$  ist in Abhängigkeit der Kontaktzeit dargestellt. Die Messungen erfolgten nach der Beschichtung von Si-Wafer Substraten für 1 h im Puffer bei pH 6.8 + 1 h unter Zusatz von 7 mM Natriumascorbat. (Bedingungen für Polymerisation von U<sub>1</sub><sup>C</sup>: 0.75 mM U<sub>1</sub><sup>C</sup>, 50 U/mL AbPPO4, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8); gestrichelte Linien dienen zur Orientierung).

Aus den CP-AFM-Messungen lässt sich also schlussfolgern, dass die Adhäsion der Muschel-inspirierten Polymere eine ähnlich hohe Stärke aufweist wie für die natürlichen hochspezialisierten Haftungsproteine der Muschel. Für Cell-Tak™ wird ebenfalls ein zeitabhängiges Adhäsionsverhalten beobachtet, was eine weitere Ähnlichkeit zu den Muschel-inspirierten Polymeren darstellt und damit aufzeigt, dass diese das natürliche Haftsystm der Muschel gut imitieren können.

### 4.5.3 Teilzusammenfassung

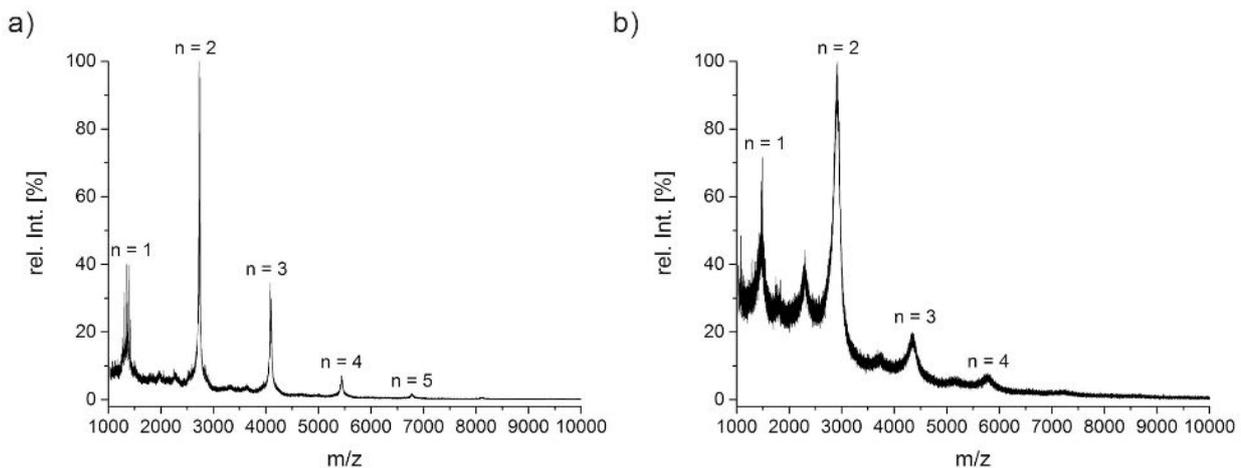
Die Adhäsionsarbeit der Muschel-inspirierten Polymere PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> wurde mittels CP-AFM untersucht und mit der von natürlichen mfps verglichen. Dazu wurden Referenzmessungen mit Cell-Tak™ - einem Proteinextrakt aus der Muschel des Genus *Mytilus edulis* - durchgeführt, das eine Mischung aus verschiedenen mfps beinhaltet. SiO<sub>2</sub>-Substrate wurden mit den Polymeren unter verschiedenen Bedingungen, entweder eine Stunde, zwei Stunden oder eine Stunde mit einer weiteren Stunde unter Zugabe von Natriumascorbat, beschichtet. Bei den Messungen wurden die Anpresskraft zwischen 2 und 50 nN und die Kontaktzeit zwischen 1 und 60 s variiert. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Adhäsionsarbeit von der Kontaktzeit der Polymerbeschichtung mit der SiO<sub>2</sub>-Sonde. Mit längerer Kontaktzeit steigt die Adhäsionsarbeit an, was am dynamischen Verhalten der Polymerfilme liegt, die sich der Sondenoberfläche anpassen, um die Wechselwirkungen mit dieser zu optimieren. Darin liegt auch die deutlich höhere Adhäsionsarbeit von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> mit bis zu 3.6 mJ/m<sup>2</sup> gegenüber PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> mit 0.9 mJ/m<sup>2</sup> begründet. Da das lineare PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> flexibler ist als das verzweigte und rigidere PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>, besitzt es eine höhere Adaptivität und zeigt ein stärker zeitabhängiges Adhäsionsverhalten. Die Referenzmessungen von Cell-Tak™, die unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, zeigten ein sehr ähnliches Verhalten. Die Adhäsionsenergien sind vergleichbar denen von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>, obwohl auch komplexere und hochspezialisierte Adhäsionsproteine wie mfp-3 in der Mischung enthalten sind. Die Muschel-inspirierten Polymere zeigen zudem eine deutlich höhere Adhäsionsarbeit als isoliertes natives mfp-1 auf, das mittels SFA auf SiO<sub>2</sub>-Oberflächen vermessen wurde. Damit übertreffen sie sogar ihr natürliches Vorbild, obwohl ihre Struktur auf der gleichen Konsensussequenz basiert. Die Muschel-inspirierten Polymere stellen somit einfach zugängliche synthetische Materialien dar, die in der Lage sind das Adhäsionsverhalten von komplexen natürlichen Proteine zu imitieren.

## 4.6 Nicht-enzymatische Polymerisationsmethoden

Der aufgezeigte bio-inspirierte Polymerisationsweg ist elegant und einfach zu realisieren. Allerdings ist es ein Prozess, der auf einer enzymatischen Reaktion beruht und demnach wären für eine technische oder industrielle Anwendung große Hürden für die notwendige Hochskalierung zu überwinden. Zwar ist das molekulare Verhältnis von Unimer zu Enzym mit  $\sim 700:1$  recht gut, trotzdem wären für ein Hochskalieren große Mengen an Enzym von Nöten, was den sonst simplen Prozess kostenaufwendig macht. Die Zurückgewinnung des Enzyms als Katalysator würde die Kosten senken können, jedoch wäre in dem Zusammenhang noch viel Forschung und Entwicklung nötig, um das Enzym beispielsweise zu immobilisieren und damit eine heterogene Katalyse zu ermöglichen. Weiterhin müsste die Langlebigkeit in einer nicht-biologischen Umgebung erhöht werden, damit die enzymatische Katalyse effizient wird. Auf der anderen Seite sind die Unimere in ihrem Aufbau und ihrer Struktur begrenzt, wenn sie enzymatisch prozessierbar sein müssen. Durch eine Polymerisation, die auf anderen Mechanismen beruht, wäre somit eine höhere Variabilität der Unimere möglich, was wiederum neue Anwendungsbereiche erschließen könnte. Es ist also durchaus von Interesse alternative Polymerisationsprozesse zu finden, bei denen auf die Nutzung eines Enzyms verzichtet werden kann. In diesem Kapitel wird kurz auf untersuchte alternative Syntheserouten eingegangen und diskutiert, wie erfolgsversprechend sie im Vergleich zum enzymatischen Prozess sind.

### 4.6.1 Chemische Oxidation

Der enzymatische Prozess besitzt den Vorteil, dass die Peptidmodifikation am Tyrosin nicht nur die Oxidation von Dopa zu Dopachinon, sondern auch die vorhergehende Oxygenierung zu Dopa beinhaltet. Die beiden Oxidationsschritte können also durch das gleiche Enzym katalysiert werden und die Polymerisation kann vom unmodifizierten Peptid ausgehend als Eintopfreaktion ohne zusätzliche Aufreinigungsschritte durchgeführt werden. Um einen ähnlich einfachen Prozess für eine enzymfreie Reaktion zu realisieren, besteht die naheliegendste Lösung darin Dopa direkt in das Peptid zu integrieren. Indem also von einem modifizierten Peptid-Unimer ausgegangen wird, kann die *ortho*-Hydroxylierung von Tyrosin als erster Reaktionsschritt umgangen werden. Die Synthese Dopa-haltiger Peptide kann mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS) und einem Acetonid-geschütztem Dopa-Derivat<sup>269-271</sup> bewerkstelligt werden. Die Oxidation von Dopa zu Dopachinon kann dann über ein chemisches Oxidationsmittel oder über Autooxidation bei erhöhtem pH-Wert<sup>144,158</sup> erfolgen.

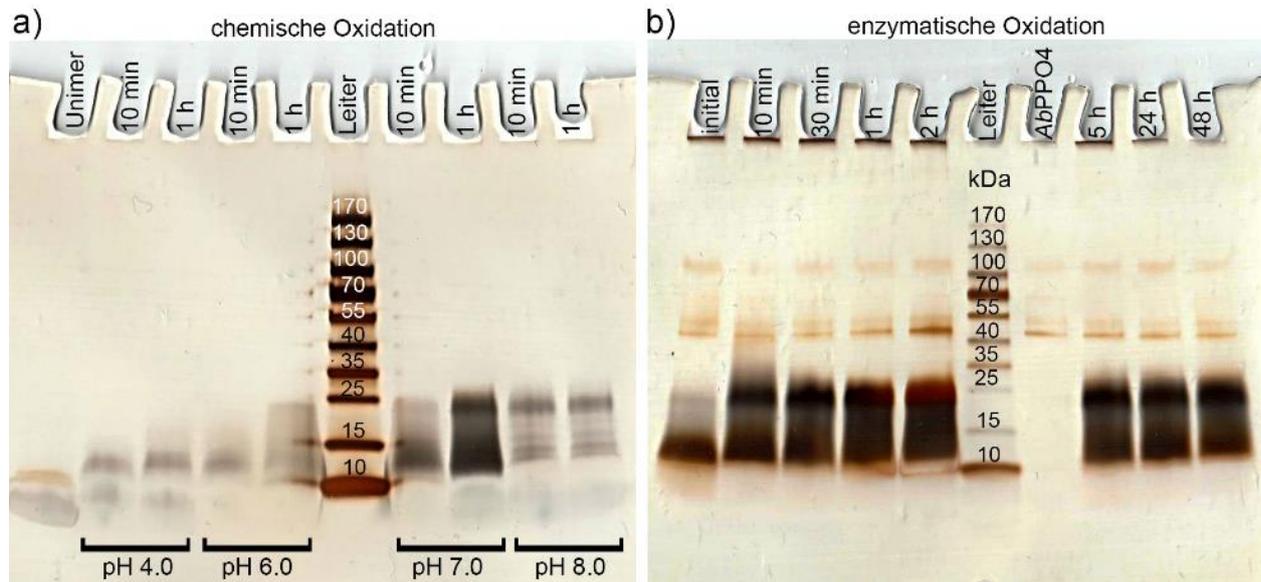


**Abbildung 4.33.** MALDI-TOF-MS-Analyse der Polymerisation von U<sub>1</sub><sup>+C</sup> und U<sub>2</sub><sup>+C</sup>. a) Spektrum von PolyU<sub>1</sub><sup>+C</sup>. b) Spektrum von PolyU<sub>2</sub><sup>+C</sup>. (Bedingungen: 0.25 mM U<sub>1</sub><sup>+C</sup>, 0.25 mM U<sub>2</sub><sup>+C</sup>, 1 Äq. NaIO<sub>4</sub>, in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 8.0); 5 min Reaktionszeit; Messung in  $\alpha$ -CHCA Matrix).

Zur Untersuchung der Polymerisation Dopa-haltiger Unimere wurden zunächst die entsprechenden Unimere synthetisiert, bei denen Tyrosin durch Dopa ersetzt ist. U<sub>1</sub><sup>+C</sup> besitzt die Peptidsequenz AKPSS<sup>5</sup>PPTY<sup>\*9</sup>KGGGC und U<sub>2</sub><sup>+C</sup> die Sequenz AKPSY<sup>\*5</sup>PPTY<sup>\*9</sup>KGGGC (Y<sup>\*</sup> - Dopa). Die Unimere entsprechen U<sub>1</sub><sup>C</sup> und U<sub>2</sub><sup>C</sup> und basieren ebenfalls auf dem Decapeptid der *Mefp-1* Konsensussequenz. Als Oxidationsmittel wurde Natriumperiodat eingesetzt, das in vielen Studien für die Oxidation von Dopa-Funktionalitäten in Peptiden, Proteinen oder mimetischen Polymeren eingesetzt wurde.<sup>16,143,146,194,195,272</sup> Die Oxidation der Unimer-Lösungen führt zur Bildung von Polymeren bzw. Multimeren, wie in MALDI-TOF-MS-Messungen bis zu einem Polymerisationsgrad von fünf gezeigt wurde (Abbildung 4.33). Das belegt, dass das Prinzip der Polymerisation über Cysteinyl-dopa-Bindungen auch ohne die enzymatisch vermittelte Oxidation von Tyrosin bzw. Dopa funktioniert und universell anwendbar ist.

Weiterhin wurde die Verteilung des Molekulargewichts der Polymerisation von U<sub>1</sub><sup>+C</sup> in Abhängigkeit des pH-Wertes mittels SDS PAGE untersucht. Da kein Enzym zum Einsatz kommt, ist keine Begrenzung des pH-Wertes auf einen Bereich von pH 6 - 8 nötig,<sup>273,274</sup> damit die Aktivität des Enzyms gewährleistet wäre. In Abbildung 4.34a ist zu erkennen, dass das durchschnittliche Molekulargewicht mit steigendem pH-Wert zunimmt. Dies korreliert mit der Reaktionsgeschwindigkeit der Periodat-Oxidation von Catechol, die ein Maximum bei einem pH-Wert von ~8 besitzt.<sup>275</sup> Das führt dazu, dass die Oxidation bei niedrigem pH Wert (4 - 6) langsam ist, wodurch sie zum limitierenden Faktor der Polymerisation wird. Daher lässt sich ein Unterschied in der Molekulargewichtsverteilung nach 10 min im Vergleich zu einer Stunde Polymerisationszeit erkennen. Bei höherem pH Wert (7 - 8) ist die Oxidation so schnell, dass nach 10 min Polymerisationszeit bereits die endgültige Molekulargewichtsverteilung erreicht ist und kein

Unterschied zur Probe nach einer Stunde Polymerisationszeit beobachtet wird. Die chemische Polymerisation bei höherem pH Wert läuft somit mit einer ähnlichen Geschwindigkeit ab wie es bei der enzymatischen Polymerisation der Fall ist. Bei dieser wurde ebenfalls kein Unterschied in der Molekulargewichtsverteilung über die Probe nach 10 min Polymerisationszeit hinaus festgestellt (Abbildung 4.34b).

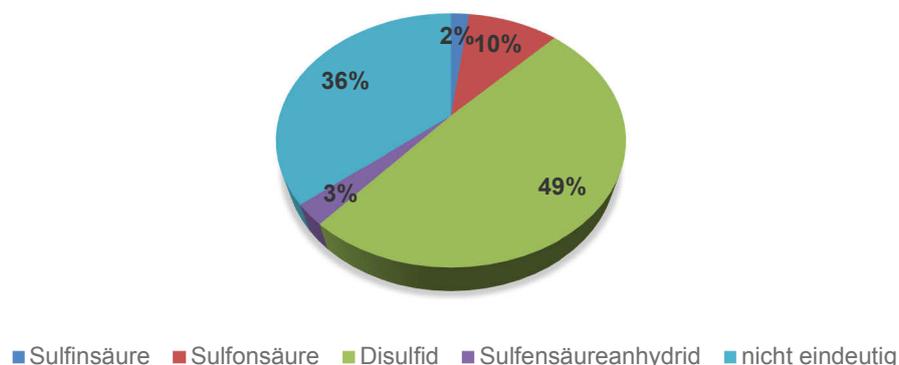


**Abbildung 4.34.** Vergleich der SDS PAGE Messungen der Polymerisation von U<sub>1</sub>\*<sup>c</sup> und U<sub>1</sub><sup>c</sup>. a) PolyU<sub>1</sub>\*<sup>c</sup> nach 10 min und 1 h Reaktionszeit mit 1 Äq. NaIO<sub>4</sub> bei pH-Werten von 4 - 8. (Bedingungen: 0.25 mM U<sub>1</sub>\*<sup>c</sup>, 1 Äq. NaIO<sub>4</sub>, in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 4.0/6.0/7.0/8.0)). b) Kinetische Messung der enzymatischen Synthese von PolyU<sub>1</sub><sup>c</sup> zum Vergleich. (Bedingungen: 0.25 mM U<sub>1</sub><sup>c</sup>, 100 U/mL AbPPO4, in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8)).

Die resultierenden Molekulargewichtsverteilungen der Polymerisation durch chemische Oxidation bei höherem pH weisen ferner, mit Polymergewichten zwischen 10 und 30 kDa und einer Hauptbande bei ~25 kDa, Ähnlichkeiten zu den Proben der enzymatischen Polymerisation auf. Das könnte darauf hindeuten, dass der Polymerisationsmechanismus unabhängig von der Art der Oxidationsreaktion ist. Überdies ist das ein Hinweis darauf, dass die Limitierung des Polymerwachstums bis ca. 25 kDa nicht durch eingeschränkte Zugänglichkeit der reaktiven Gruppen für das Enzym verursacht ist, sondern auf strukturellen Effekten der Polymerketten beruht.

Es fällt weiterhin auf, dass die Bandenintensität der Proben aus der Polymerisation mit chemischer Oxidation deutlich schwächer ist, als bei der enzymatischen Reaktion, obwohl die Probenkonzentration der beiden SDS PAGE Messungen identisch ist. Das weist auf einen geringeren Umsatz der Polymerisation hin. Dieser liegt jedoch nicht in einer unvollständigen Oxidation von Dopa begründet. Der Oxidationsprozess wurde mittels HPLC-MS-Messungen getrennt von der Polymerisation für das nicht polymerisierbare Modell-Unimer U<sub>1</sub><sup>s</sup> (AKPSS<sup>5</sup>PPTY\*<sup>9</sup>KGGGS), das kein Cystein enthält, analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass bei dem Einsatz von einem Äquivalent

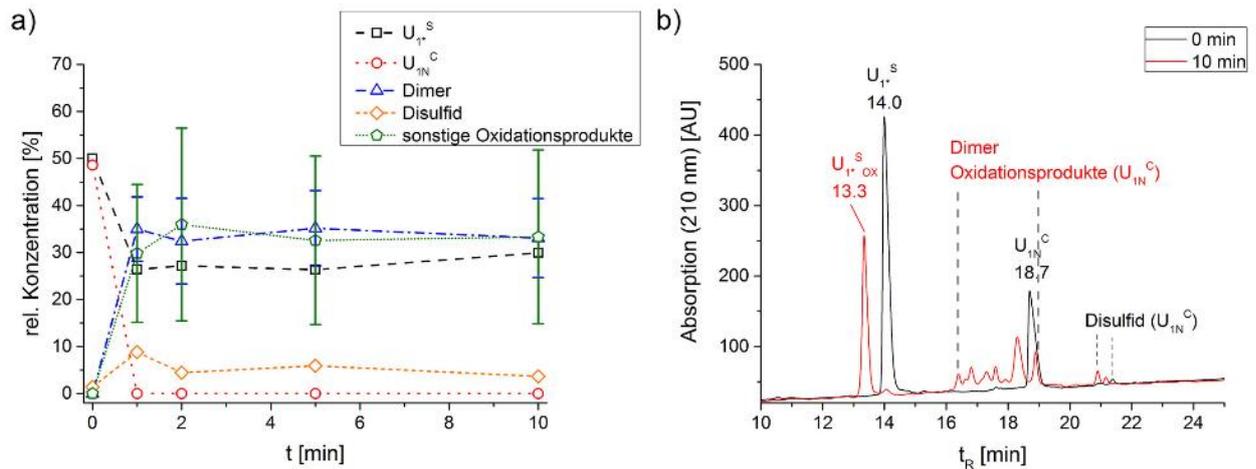
$\text{NaIO}_4$  eine quantitative Oxidation von Dopa zu Dopachinon und  $\Delta$ Dopachinon innerhalb von einer Minute stattfindet (siehe Abschnitt 6.6.14).



**Abbildung 4.35.** Oxidation von  $U_{1N}^C$  mit  $\text{NaIO}_4$ . Die prozentuale Verteilung der verschiedenen Oxidationsprodukte wurde mittels UPLC-ESI-MS bestimmt. (Bedingungen: 0.25 mM  $U_{1N}^C$ , 1 Äq.  $\text{NaIO}_4$ , in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 8.0)).

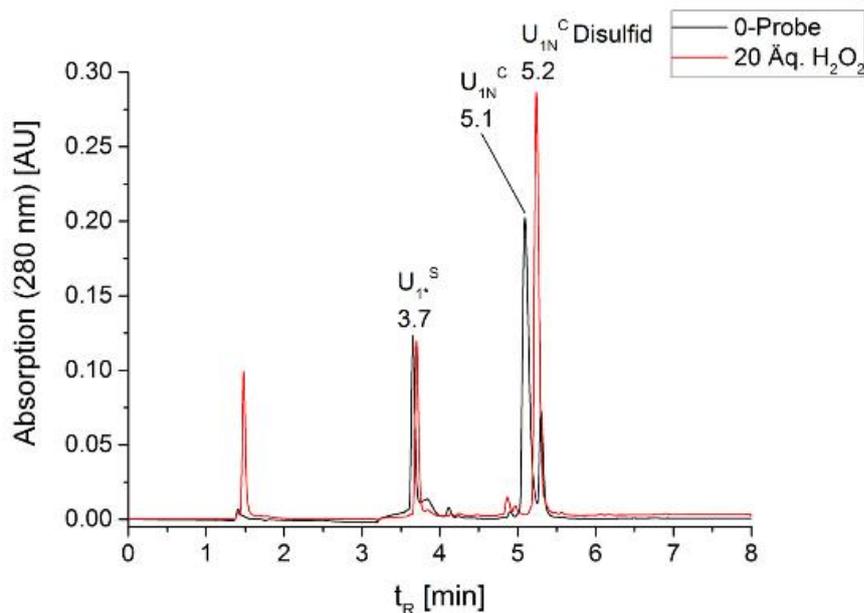
Bei der Untersuchung des anderen Modell-Unimers  $U_{1N}^C$  ( $\text{PTF}^{\text{NO}_2}\text{KGGGC}$ ), das Cystein aber kein Dopa enthält, offenbart sich das Problem des Polymerisationsansatzes: Der chemische Oxidationsprozess ist nicht so selektiv wie die enzymatische Oxidation. Tyrosinase kann auch in Anwesenheit anderer funktioneller Gruppen die Catechole selektiv oxidieren, wohingegen chemische Oxidationsmittel mit anderen oxidationsempfindlichen Gruppen, wie auch der Thiol-Gruppe, reagieren können. UPLC-ESI-MS Studien zeigen, dass die Reaktion von  $U_{1N}^C$  mit  $\text{NaIO}_4$  zu verschiedenen Oxidationsprodukten des Thiols führt. Dazu zählt die Bildung von Sulfinsäure-, Sulfonsäure-, Disulfid- und Sulfensäureanhydrid-Gruppen, deren Verteilung in Abbildung 4.35 dargestellt ist. Dadurch wird bei der Dimerisierungsreaktion des Modellsystems aus  $U_{1^S}$  und  $U_{1N}^C$  nur eine Ausbeute von  $34 \pm 8\%$  für das  $U_{1^S}$ - $U_{1N}^C$ -Dimer Produkt erreicht. Die Untersuchung der Modell-Reaktion zur Dimerisierung wurde mittels kinetischer HPLC-Messungen durchgeführt.

Wie Abbildung 4.36a zeigt, ist die Reaktion mit Periodat bei pH 8 so schnell, dass über die Messung nach einer Minute hinaus praktisch keine Änderung der Konzentrationen zu verzeichnen ist. In Abbildung 4.36b sind die HPLC-Chromatogramme vor und nach der Oxidationsreaktion dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Oxidation zu einer Vielzahl von Nebenprodukten mit Retentionszeiten zwischen 16 und 19 min führt. Das Dopa-tragende Unimer  $U_{1^S}$  wird zwar fast vollständig zum Dopachinon-Derivat oxidiert, aber durch die schnelle Oxidation des Cystein-tragenden Unimers  $U_{1N}^C$  ist deutlich weniger freies Thiol als Reaktionspartner zur Dimerisierung vorhanden. Folglich wird dieser Umstand auch für die schlechten Ausbeuten bei der Polymerisation verantwortlich sein.



**Abbildung 4.36.** Kinetische HPLC-Messungen der Modell-Dimerisierungsreaktion von  $U_{1^+}^S$  und  $U_{1N}^C$ . a) Relative Verteilung der auftretenden Spezies im zeitlichen Verlauf. b) Vergleich der HPLC-Chromatogramme zu den Zeitpunkten vor Beginn und 10 min nach Beginn der Reaktion. (Bedingungen: 0.25 mM  $U_{1^+}^S$ , 0.25 mM  $U_{1N}^C$  (1:1, v/v), 1 Äq.  $NaIO_4$ , in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 8.0); gestrichelte Linien dienen zu Orientierung).

Studien zufolge liegt das Standardredoxpotential der Oxidation von Dopa mit  $E^{0\prime} = -0.23 \text{ V}^{276,277}$  bei negativeren Werten als jenes von Cystein mit  $E^{0\prime} = +0.25 \text{ V}^{277}$  und müsste somit leichter zu oxidieren sein. Dennoch ist das Redoxpotential von Natriumperodat sehr stark, sodass möglicherweise die Selektivität für eine Differenzierung zwischen Dopa und Cystein zu gering ist. Jedoch tritt auch unter milderen Oxidationsbedingungen bei der Reaktion mit Wasserstoffperoxid Disulfidbildung auf (Abbildung 4.37). Es wird sogar nur eine Oxidation von  $U_{1N}^C$  bei der Modellreaktion aus  $U_{1N}^C$  und  $U_{1^+}^S$  beobachtet und gar keine Oxidation von  $U_{1^+}^S$ .



**Abbildung 4.37.** UPLC-Messung der Dimerisierungsreaktion von  $U_{1N}^C$  und  $U_{1^+}^S$ . Vergleich der Spektren vor und nach der Reaktion mit Wasserstoffperoxid. (Bedingungen: 0.25 mM  $U_{1^+}^S$ , 0.25 mM  $U_{1N}^C$  (1/1, v/v), 20 Äq.  $H_2O_2$ , in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 8.0)).

Um eine effektive Polymerisation durch chemische Oxidation zu ermöglichen, müssen also Bedingungen gefunden werden, bei denen eine selektive Oxidation der Dopa-Funktionalität stattfindet. In den folgenden Abschnitten werden zwei verschiedene Ansätze dies zu verwirklichen diskutiert.

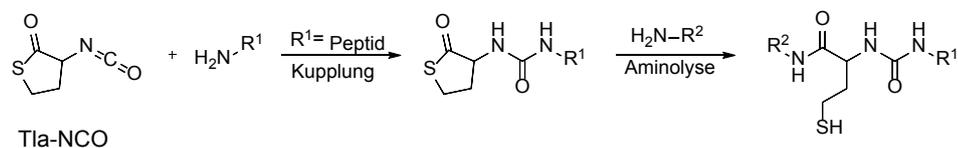
#### 4.6.2 Thiolacton maskierte Unimere

Um das Thiol vor einer Oxidation zu schützen, wurde bei diesem Ansatz statt eines Cysteins ein Thiolacton als maskierte Thiol-Einheit im Unimer verwendet. Im Thiolacton ist die Thiol-Gruppe intramolekular als zyklischer Thioester gebunden und kann durch die nukleophile Addition von primären Aminen an das Carbonyl-Kohlenstoffatom freigesetzt werden (Abbildung 4.38a). Das bei der Aminolyse zielgerichtet freigesetzte Thiol kann dann, zum Beispiel durch Addition an eine Doppelbindung, weiterreagieren. Diese Reaktion ist auch als Thiol-En-Reaktion bekannt und als eine Klick-Reaktion weit verbreitet.<sup>278</sup> Von einem Thiolacton ausgehend, wurde die Thiol-En-Reaktion unter anderem für radikalische Polyaddition<sup>279</sup> und für die Synthese von sequenzdefinierten multifunktionalen Oligomeren<sup>280,281</sup> genutzt. In den Studien wurde die Synthese der Thiolacton-tragenden Monomere und Oligomere mittels  $\alpha$ -Isocyanat- $\gamma$ -Thiolacton (Tla-NCO) realisiert, das über die Isocyanat-Gruppe mit Hydroxylen zu Urethan-Gruppen und mit Aminen zu Harnstoff-Gruppen reagiert. Letztere Reaktion kann auch bei der SPPS eingesetzt werden, indem die Peptide über die freie Amin-Funktionalität des *N*-Terminus mit Tla-NCO funktionalisiert werden (Abbildung 4.38a). Auf diesem Weg wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Unimere für die enzymfreie Muschel-inspirierte Polymerisation hergestellt.  $U_{S1^{*Tla}}$  (Tla-AS<sup>2</sup>PSS<sup>5</sup>PPTY<sup>\*9</sup>S<sup>10</sup>) und  $U_{R1^{*Tla}}$  (Tla-AR<sup>2</sup>PSS<sup>5</sup>PPTY<sup>\*9</sup>R<sup>10</sup>) orientieren sich an der Konsensussequenz von *Mefp*-1, jedoch wurden jeweils das Y<sup>5</sup> und die Lysine K<sup>2</sup> und K<sup>10</sup> ersetzt, damit kein primäres Amin vorhanden ist, das intramolekular das Thiolacton angreifen könnte. Bei  $U_{S1^{*Tla}}$  wurden sie mit Serin und bei  $U_{R1^{*Tla}}$  mit Arginin ersetzt, um neutrale polare oder basische Funktionen zu erhalten. Weiterhin wurde mit  $U_{PEG1^{*Tla}}$  ein vereinfachtes Unimer synthetisiert, das statt eines Peptidrückgrats einen mini-PEG-Spacer (N-succinyl-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin) trägt, der Thiolacton und Dopa flexibel miteinander verknüpft.

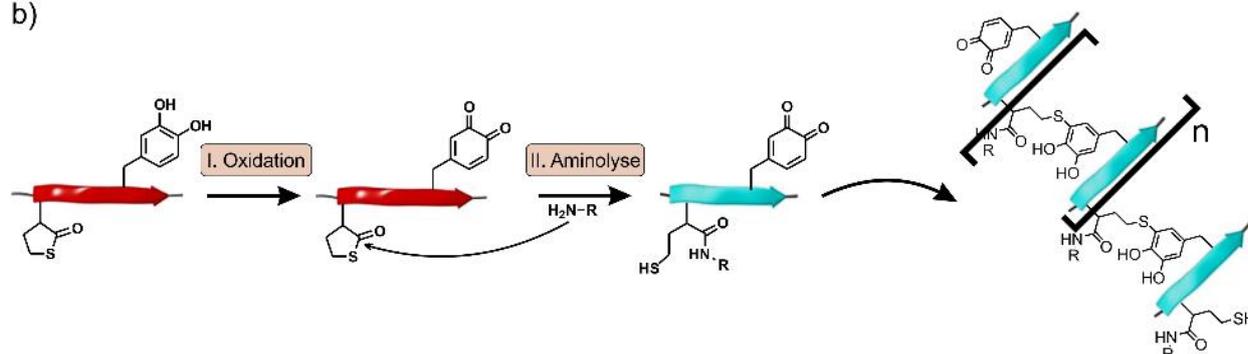
Das freigesetzte Thiol aus dem Thiolacton kann neben der Thiol-en Reaktion ebenso eine Michael-Addition an konjugierte Systeme wie Dopachinon ausführen und somit eine Polymerisation der Unimere ermöglichen. Dazu findet im ersten Schritt eine Oxidation von Dopa zu Dopachinon statt (Abbildung 4.38b), die selektiv erfolgen kann, da die Thiol-Funktionalität als Thiolacton maskiert ist. Darauf folgt die Aminolyse zur Freisetzung des Thiols, das dann analog zum Mechanismus der

enzymatischen Polymerisation die Addition ans Dopachinon ausführt und die Unimere über Cysteinyl-dopa-Bindungen verknüpft.

a)

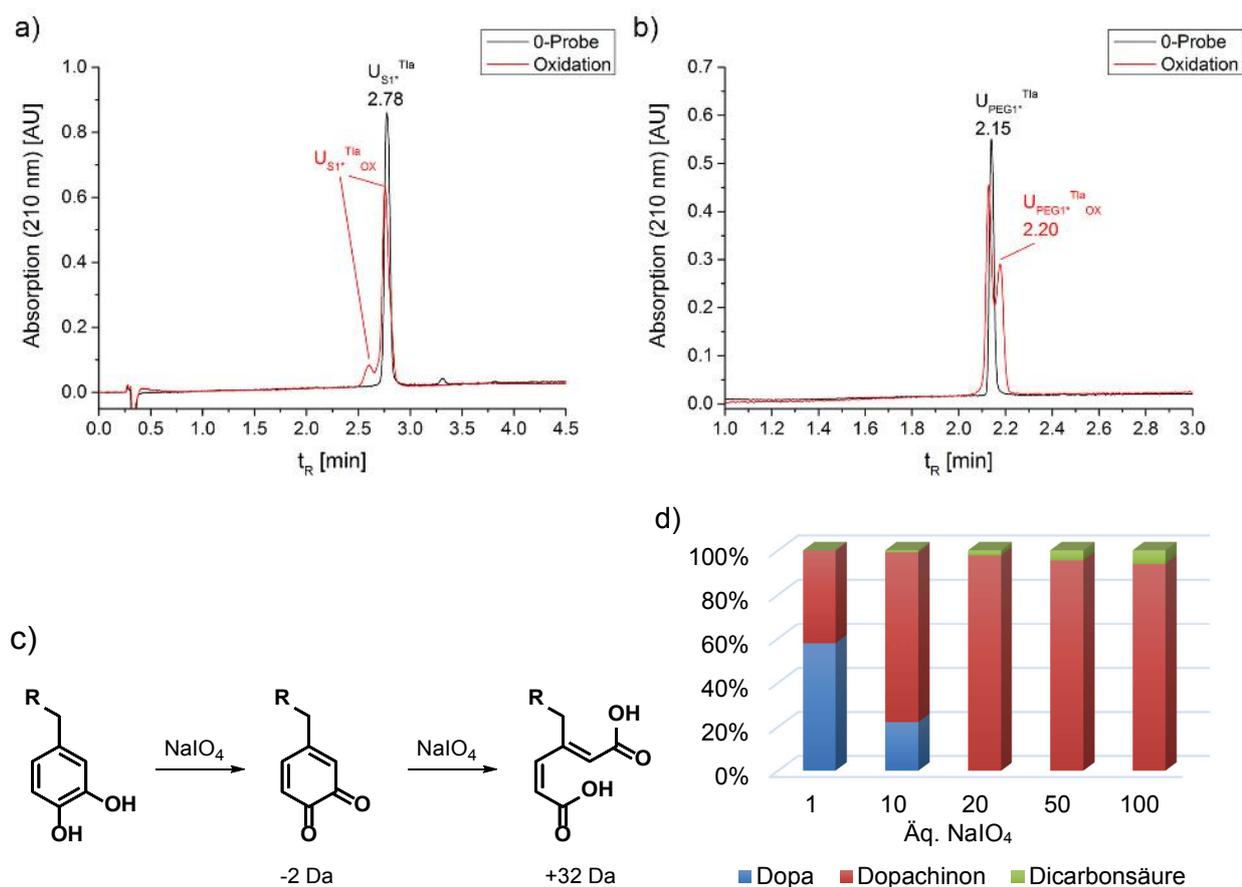


b)



**Abbildung 4.38.** Strategie der Thiolactonchemie. a) Reaktionsschema für die Funktionalisierung von Peptiden mit  $\alpha$ -Isocyanat- $\gamma$ -Thiolacton (Tla-NCO) und für die Aminolyse eines Tla-funktionalisierten Peptids. b) Prinzip der Polymerisation von Thiolacton-haltigen Unimere. Im ersten Schritt wird die Dopa-Funktionalität zu Dopachinon oxidiert. Danach findet die Aminolyse des Thiolactons durch nukleophile Addition eines primären Amins statt. Das Unimer kann daraufhin über die Addition der freigesetzten Thiol-Funktionalität ans Dopachinon eines weiteren Unimers polymerisieren.

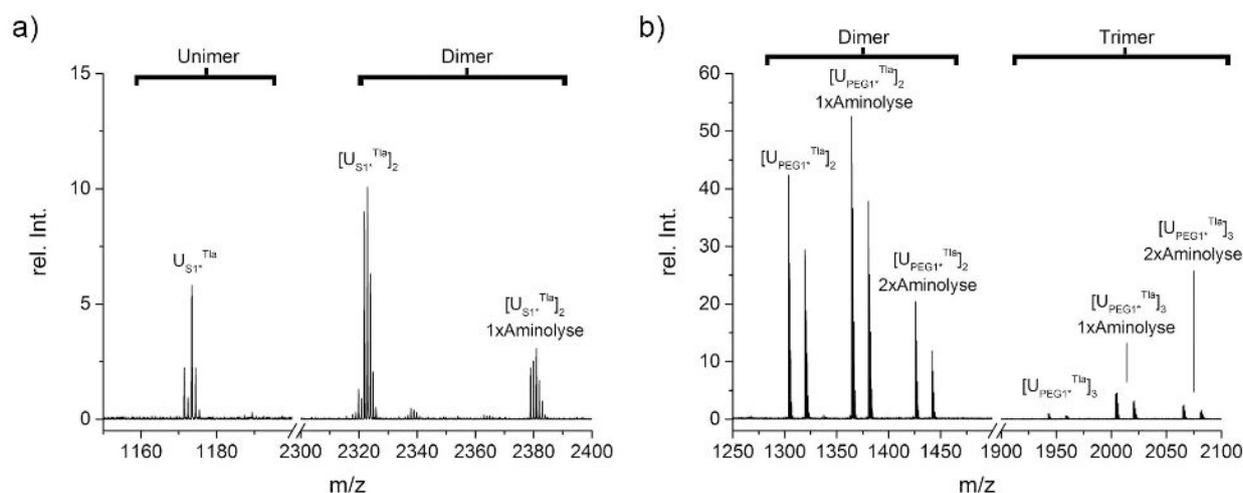
Zunächst fanden Untersuchungen zur Oxidation der verschiedenen Unimere statt. Für die Unimere  $\text{U}_{\text{S1}^{\text{Tla}}}$  und  $\text{U}_{\text{R1}^{\text{Tla}}}$  läuft die Oxidation mit 1 Äq. Natriumperodat quantitativ ab. In Abbildung 4.39a sind die UPLC-Chromatogramme von  $\text{U}_{\text{S1}^{\text{Tla}}}$  vor und nach der Oxidation dargestellt. Nach der Oxidation sind zwei Peaks zu erkennen, die Massen mit  $-2$  Da und  $-4$  Da im Vergleich zu  $\text{U}_{\text{S1}^{\text{Tla}}}$  aufweisen und somit der Oxidation zu Dopachinon und  $\Delta$ Dopachinon entsprechen (siehe Abschnitt 6.6.18). Darüber hinaus sind die Eduktmassen nicht nachweisbar und es wurden keine anderen Massen gefunden, die auf Nebenreaktionen von Periodat mit Thiolacton oder einer anderen Peptidfunktionalität hinweisen. Auch für  $\text{U}_{\text{PEG1}^{\text{Tla}}}$  wird eine Oxidation mit Massenänderung von  $-2$  Da beobachtet, jedoch ist die Umsetzung nicht quantitativ. Mit einem Äquivalent  $\text{NaIO}_4$  werden lediglich 42 % des Eduktes oxidiert (Abbildung 4.39b), was auf eine Nebenreaktion des Periodats hinweist. Es ist bekannt, dass Polyether wie PEG in der Lage sind Alkalimetallionen wie  $\text{Na}^+$  zu koordinieren.<sup>282,283</sup> Somit wäre eine Komplexbildung von  $\text{U}_{\text{PEG1}^{\text{Tla}}}$  mit Natriumionen und Periodat als Gegenion denkbar, das dann in geringerem Maß für die Oxidationsreaktion zur Verfügung stünde.



**Abbildung 4.39.** Oxidationsprozess der Thiolacton-tragenden Unimere. a) Vergleich der UPLC-Chromatogramme vor und nach der Oxidation von  $U_{S1}^{Tla}$  mit 1 Äq.  $NaIO_4$ . b) Vergleich der UPLC-Chromatogramme vor und nach der Oxidation von  $U_{PEG1}^{Tla}$  mit 1 Äq.  $NaIO_4$ . c) Reaktionsschema der Oxidation von Dopa mittels  $NaIO_4$  zu Dopachinon und der korrespondierenden Dicarbonsäure. d) Verteilung der Produkte der  $U_{PEG1}^{Tla}$  Oxidation mit 1 – 100 Äq.  $NaIO_4$ . Die Bestimmung fand mittels UPLC-ESI-MS statt. (Bedingungen: 2 mM  $U_{S1}^{Tla}$  oder  $U_{PEG1}^{Tla}$ , 1 - 100 Äq.  $NaIO_4$ , in Wasser).

Mit überstöchiometrischen Mengen des Oxidationsmittels kann der Umsatz der  $U_{PEG1}^{Tla}$ -Oxidation erhöht werden. Dabei wird eine maximale Ausbeute von 98 % Dopachinon-tragendem  $U_{PEG1}^{Tla} OX$  bei 20 Äquivalenten  $NaIO_4$  erreicht (Abbildung 4.39d). Weiterhin wird bei stark überstöchiometrischem Einsatz von  $NaIO_4$  die Bildung eines weiteren Oxidationsproduktes beobachtet, dessen Anteil mit steigender Menge des Oxidationsmittels zunimmt. Dabei handelt es sich um ein Produkt mit einer Massendifferenz von +32 Da verglichen mit  $U_{PEG1}^{Tla}$ , was einer Oxidation zur Dicarbonsäure, mit C-C-Bindungsspaltung zwischen den  $C^3$  und  $C^4$  Kohlenstoffatomen des aromatischen Rings, entspricht (Abbildung 4.39c). Eine solche Reaktion wurde auch für die Oxidation von o-Benzochinon mit Wasserstoffperoxid über einen azyklischen Bayer-Villiger-artigen Mechanismus beobachtet.<sup>284</sup> Möglicherweise führt eine höhere Periodatkonzentration vermehrt zur Bildung von Semichinon-Derivaten. Diese könnten durch einen Elektronentransfer zu gelöstem Sauerstoff zu einer *in situ* Bildung von Wasserstoffperoxid führen, der die Oxidation zur Dicarbonsäure unter C-C-Bindungsspaltung bewirkt.<sup>285</sup> Es ist weiterhin

anzumerken, dass auch ein Überschuss an  $\text{NaIO}_4$  zu keiner Nebenreaktion mit der Thiolacton-Gruppe führt. Daher wäre die Verwendung überstöchiometrischer Mengen an Oxidationsmittel unproblematisch, da in einem zusätzlichen Arbeitsschritt ein Quenching des überschüssigen Oxidationsmittels erfolgen könnte, damit bei der folgenden Freisetzung des Thiols keine weitere Oxidation stattfindet. Dabei müsste ein mildes Reduktionsmittel eingesetzt werden, das nicht in der Lage ist die Chinon-Gruppen zu reduzieren, aber mit dem restlichen Oxidationsmittel reagiert. Erste Tests mit Natriumthiosulfat als Reduktionsmittel waren nicht erfolgreich, da es sich zu Schwefel und  $\text{SO}_2$  zersetzt hat, das an das Dopachinon des oxidierten Unimers  $\text{U}_{\text{PEG1}^*\text{Tla}}^{\text{OX}}$  addierte.



**Abbildung 4.40.** MALDI-TOF-MS-Analyse der Aminolyse von  $\text{U}_{\text{S1}^*\text{Tla}}$  und  $\text{U}_{\text{PEG1}^*\text{Tla}}$ . Spektren nach 30 min Aminolyse von  $\text{U}_{\text{S1}^*\text{Tla}}$  (a) und von  $\text{U}_{\text{PEG1}^*\text{Tla}}$  (b) mit 10 Äq. Ethanolamin. (Bedingungen: 2 mM  $\text{U}_{\text{S1}^*\text{Tla}}$ , 2 mM  $\text{U}_{\text{PEG1}^*\text{Tla}}$ , 10 Äq. Ethanolamin, in Wasser, Messung in  $\alpha$ -CHCA Matrix).

Neben der Oxidation wurde auch der Reaktionsschritt der Aminolyse zur Freisetzung der Thiol-Funktionalität gesondert untersucht. Bei der Umsetzung von  $\text{U}_{\text{S1}^*\text{Tla}}$  und  $\text{U}_{\text{PEG1}^*\text{Tla}}$  mit 10 Äq. Ethanolamin findet die Bildung von aminolysierten Produkten statt, wie mit MALDI-TOF-MS-Messungen nach 30 min Reaktionszeit gezeigt werden konnte (Abbildung 4.40). Dabei wird die Bildung von Multimeren beobachtet, die mit einer partiellen Oxidation der Unimere ohne Zugabe von Oxidationsmittel einhergeht. Das liegt wahrscheinlich darin begründet, dass der pH-Wert durch den großen Überschuss an Ethanolamin, dessen pKs bei 9.67 liegt,<sup>286</sup> steigt und somit die Autooxidation von Dopa begünstigt wird. Da der Aminolyseschritt im Polymerisationsprozess auf die Oxidation folgt und dazu dient, dass eine Polymerisation stattfindet, ist dieser Umstand jedoch nicht relevant. Für  $\text{U}_{\text{S1}^*\text{Tla}}$  ist nur das einfach aminolysierte Produkt des Dimers als Natriumaddukt  $[(\text{U}_{\text{S1}^*\text{Tla}}-\text{U}_{\text{S1}^*\text{Tla}})+\text{Na}]^+$  im Massenbereich von m/z 2378.92 - 2382.94 zu sehen. Bei  $\text{U}_{\text{PEG1}^*\text{Tla}}$  können Multimere bis zum Trimer beobachtet werden, die jeweils einfach und zweifach aminolysierte Produkte aufweisen und somit bei den MALDI-TOF-MS-Messungen ein besseres Verhalten

bezüglich der Aminolyse zeigen. Jedoch sind in beiden Spektren auch die unmodifizierten Unimere ohne Reaktion der Thiolacton-Gruppe mit Amin zu sehen und belegen die unvollständige Aminolyse.

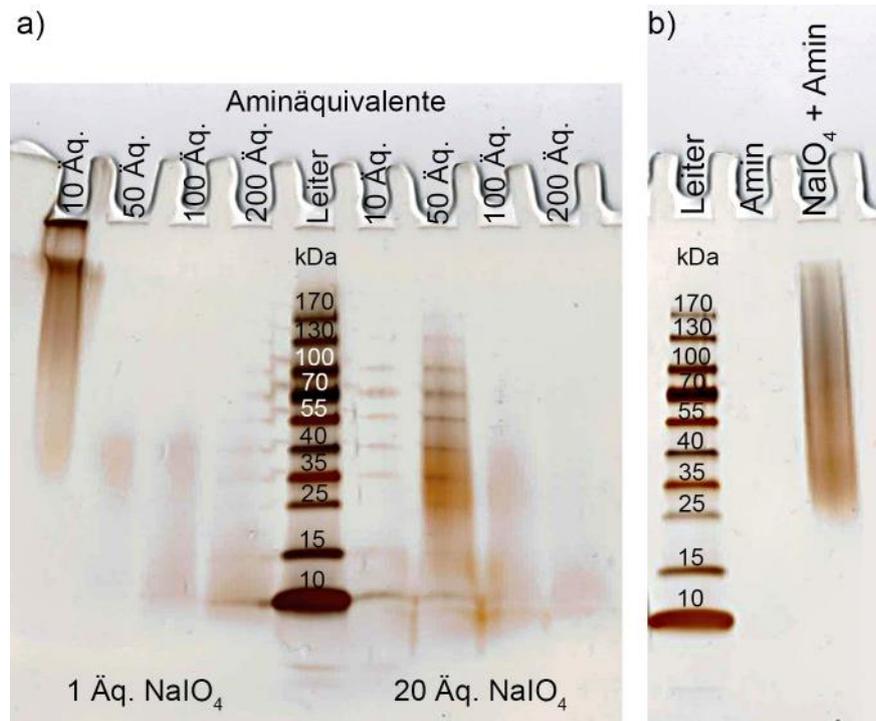
Zur Quantifizierung der Umsätze, wurden UPLC-ESI-MS-Messungen der Aminolyse-Reaktion mit verschiedenen Äquivalenten des Amins durchgeführt. Wie bei den MALDI-TOF-MS-Messungen bereits gezeigt wurde, entsteht dabei, vor allem durch die einhergehende Oxidation, eine Vielzahl an Produkten (siehe 6.6.20 und 6.6.21). Neben der Bildung des Aminolyse-Produkts wird auch die Bildung des hydrolysierten Thiolactons beobachtet, wobei unklar ist, ob dieses tatsächlich durch Hydrolyse des zyklischen Thioesters oder durch Hydrolyse des zuvor durch Aminolyse gebildeten Amids entstanden ist. Mit einem Blick auf Tabelle 4.7 wird klar, dass mit einer größeren Menge Amin ebenfalls ein höherer Umsatz der Aminolyse beobachtet wird. Der maximale Umsatz der Aminolyse bei 100 Äq. des Amins zeigt annähernd gleiche Werte von ca. 80 % für die untersuchten Unimere. Mit größerem Überschuss des Amins oder längerer Reaktionszeit ließe dieser sich wahrscheinlich noch steigern. Die Aminolyse läuft für  $U_{\text{PEG1}^{\text{Tla}}}$  mit geringfügig höheren Ausbeuten ab. Möglicherweise liegt das an der vereinfachten Struktur des Unimers im Vergleich zum vollständig peptidischen  $U_{\text{S1}^{\text{Tla}}}$ , bei dem die Seitenkettenfunktionalitäten Wechselwirkungen mit dem für die Aminolyse eingesetzten Amin eingehen können.

**Tabelle 4.7.** Umsätze der Aminolyse von  $U_{\text{S1}^{\text{Tla}}}$  und  $U_{\text{PEG1}^{\text{Tla}}}$  nach 30 min Reaktionszeit mit verschiedenen Mengen an Amin.

Äquivalente Amin	Umsatz $U_{\text{S1}^{\text{Tla}}}$ Aminolyse [%]	Umsatz $U_{\text{PEG1}^{\text{Tla}}}$ Aminolyse [%]
1	-	1.8
10	16.7	24.6
100	78.6	80.9

Nachdem der Oxidations- und der Aminolyseschnitt getrennt voneinander untersucht wurden, zeigte die Kombination beider Reaktionsschritte die erwartete Polymerbildung. Zur Untersuchung der Polymerisation wurde eine 2 mM  $U_{\text{PEG1}^{\text{Tla}}}$ -Lösung in Wasser mit verschiedenen Äquivalenten von Periodat und Ethanolamin polymerisiert und anschließend SDS PAGE durchgeführt (Abbildung 4.41a). Obwohl bei den Untersuchungen zuvor die höchsten Umsätze für 20 Äq.  $\text{NaIO}_4$  und 100 Äq. Amin beobachtet wurden, zeigt die Polymerprobe, die mit 1 Äq.  $\text{NaIO}_4$  und 10 Äq. Amin umgesetzt wurde, das höchste apparente Molekulargewicht. Die Verteilung des Molekulargewichtes reicht von 30 - 200 kDa und besitzt somit eine hohe Dispersität. Die anderen Proben weisen schwächere Banden auf, die sich im Bereich von apparenten Molekulargewichten von 10 bis ca. 50 kDa aufhalten. Lediglich die Probe der Polymerisation bei 20 Äq.  $\text{NaIO}_4$  und 50 Äq. Amin weist eine etwas intensivere Bande auf, die bis zu einem apparenten Molekulargewicht von ca. 100 kDa reicht. Auch

wenn die Aminolyse, wie zuvor gezeigt, mit größeren Mengen Amin mit höheren Ausbeuten verläuft, scheint sich das nicht positiv auf die Polymerisation auszuwirken. Eine definitive Erklärung für dieses Phänomen kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gegeben werden. Es kann aber angenommen werden, dass ein großer Überschuss an Amin dazu führt, dass dieses über Michael-Addition oder Imin-Bildung mit Dopachinon reagiert und somit durch Reaktion mit den Endgruppen zu geringeren Molekulargewichten führt.



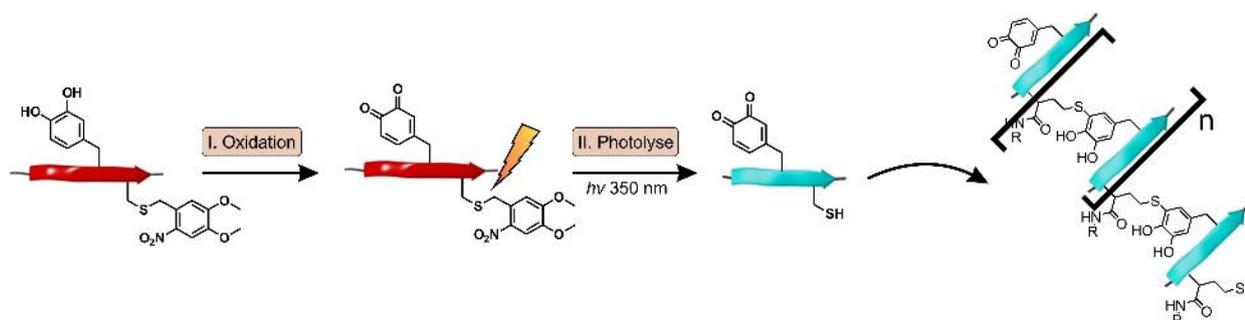
**Abbildung 4.41.** SDS PAGE Messungen von PolyUPEG1\*Tha. a) Verteilung des Molekulargewichts nach der Reaktion von UPEG1\*Tha mit einem (links der Proteinleiter) oder 20 Äquivalenten NaIO4 (rechts der Proteinleiter) sowie 10 - 200 Äquivalenten Ethanolamin. b) Referenzmessung der Reaktionen von UPEG1\*Tha mit 10 Äq. Ethanolamin sowie mit 1 Äq. NaIO4 und 10 Äq. Ethanolamin.

Weiterhin wurde als Kontrollversuch UPEG1\*Tha nur mit 10 Äq. Amin umgesetzt (Abbildung 4.41b). Dabei konnte im Gegensatz zur Polymerisationsprobe, bei der ein Oxidationsschritt vorhergegangen ist, keine Bildung von Polymer beobachtet werden. Dies belegt, dass ohne die Bildung von Dopachinon keine Polymerisation stattfindet und der Mechanismus über Cysteinyl-dopa eine effektive Verknüpfung der Unimere ermöglicht. Auch wenn es bei der Polymerisation noch weiterer Untersuchungen und Optimierung bedarf, so ist jedoch gezeigt, dass die Strategie das Cystein in Form eines Thiolactons zu maskieren und vor Oxidation zu schützen funktioniert und verfolgenswert ist.

#### 4.6.3 Unimere mit photolabiler Schutzgruppe

Eine weitere Möglichkeit die Oxidation von Cystein zu verhindern beinhaltet die Verwendung einer Schutzgruppe, die unter bestimmten Bedingungen abgespalten werden kann und die Thiol-

Funktionalität freigibt. Schutzgruppen, wie beispielsweise 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) oder *tert*-Butoxycarbonyl (Boc) des Acyltyps sowie Triphenylmethyl (Trt) oder *tert*-Butyl (tBu) des Alkyltyps, finden bei der SPPS standardmäßig Anwendung und können zumeist unter sauren oder basischen Bedingungen abgespalten werden.<sup>287</sup> Da nach der Peptidsynthese alle Schutzgruppen der Peptid-Seitenketten, bis auf die von Cystein, abgespalten werden sollen, muss eine orthogonale Schutzgruppe verwendet werden, die unter den herkömmlichen Abspaltbedingungen stabil bleibt. Verschiedene Schutzgruppen wurden zu diesem Zweck entwickelt, darunter sind Acetamidomethyl (Acm),<sup>288-290</sup> Phenylacetamidomethyl (PhAcm),<sup>291</sup> *tert*-Butylmercapto (S<sup>t</sup>Bu)<sup>292</sup> und 4-Picolyl,<sup>293</sup> die in der Fmoc-Synthesestrategie eingesetzt werden können. Alle jene Schutzgruppen erfordern jedoch den Einsatz zusätzlicher Reagenzien und organischer Lösungsmittel, daher wurde in der hier vorgestellten Studie die photolytisch spaltbare *o*-Nitroveratrylgruppe (*o*Nv)<sup>294,295</sup> eingesetzt (siehe Abbildung 4.42). Diese ist stabil gegenüber den Bedingungen der Fmoc- oder Boc-Strategie, kann in wässriger Lösung durch Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 350 nm entfernt und somit direkt folgend auf den Oxidationsschritt auf die Reaktionsmischung angewendet werden. Analog zu den vorhergegangenen Methoden ermöglicht die Freisetzung des Thiols die Polymerisation der Unimere über die Bildung von Cysteinyldopa-Bindungen.

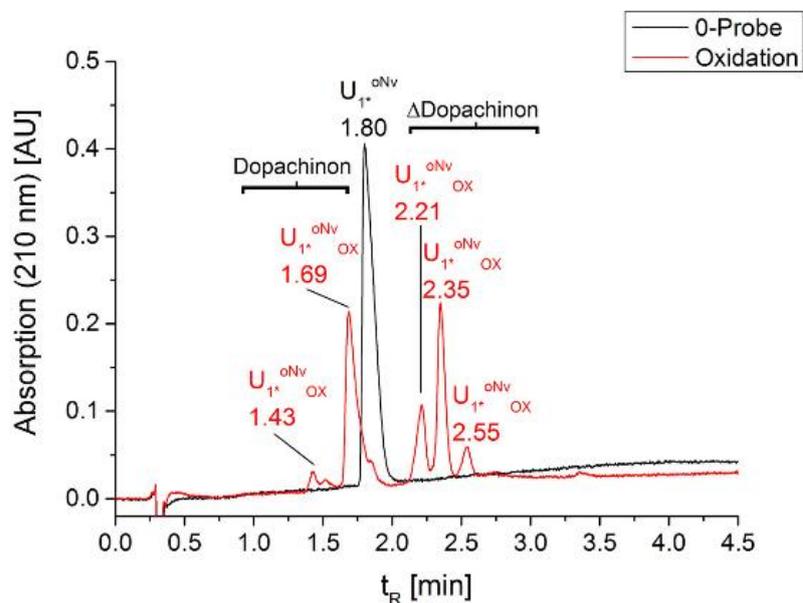


**Abbildung 4.42.** Schematische Darstellung der Polymerisation von *o*Nv-geschützten Unimere. Im ersten Schritt wird selektiv Dopa zu Dopachinon oxidiert. Es folgt die Photolyse der *o*Nv-Gruppe durch Bestrahlung bei 350 nm. Durch die Freisetzung der Thiol-Funktionalität kann eine Polymerisation über die Addition vom Thiol ans Dopachinon erfolgen.

Um diesen Ansatz zu untersuchen, wurde das Unimer  $U_1^{*oNv}$  mit der Peptidsequenz AKPSS<sup>5</sup>PPTY\*<sup>9</sup>KGGGC(*o*Nv), basierend auf dem Decapeptid der *Meff-1* Konsensussequenz, synthetisiert. Es enthält ein Dopa in Position 9 und C-terminal ein *o*Nv-geschütztes Cystein, das über einen Triglycin-Spacer mit dem Decapeptid verbunden ist.

Bei der Reaktion mit NaIO<sub>4</sub> tritt eine sofortige, quantitative Oxidation auf. Abbildung 4.43 zeigt, dass verschiedene Oxidationsprodukte erhalten werden, zum einen wird Dopa zu Dopachinon (-2 Da,  $t_R = 1.4-1.7$  min) und zum anderen weiter zu  $\Delta$ Dopachinon (-4 Da,  $t_R = 2.2-2.6$  min) oxidiert. Das Signal bei einer Retentionszeit von 2.55 min weist eine Masse von 1537.82 Da auf (Abbildung E 88f),

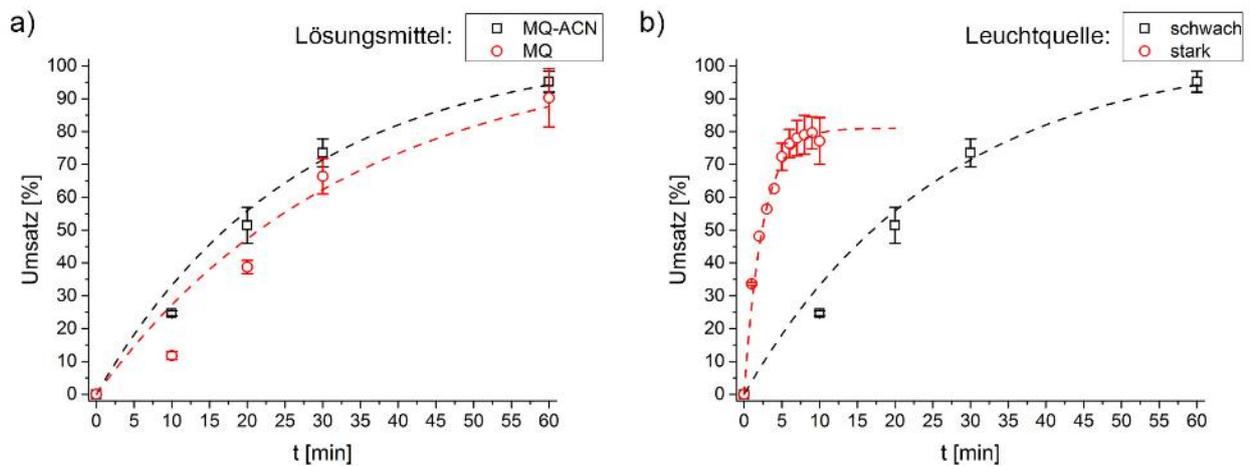
was der Oxidation zu  $\Delta$ Dopachinon und Eliminierung eines Wassermoleküls entspricht (-22 Da). Es treten somit keine Nebenreaktionen der oNv-Gruppe mit Periodat auf und die Thiol-Funktionalität bleibt vollständig geschützt.



**Abbildung 4.43.** Oxidation von  $U_{1*}^{oNv}$  mit  $NaIO_4$ . Vergleich der UPLC-Chromatogramme vor und nach der Oxidation. (Bedingungen: 0.32 mM  $U_{1*}^{oNv}$ , 1 Äq.  $NaIO_4$ , in Wasser).

Neben der Oxidation wurde der Schritt der photolytischen Entschützung des Cysteins unabhängig von der Polymerisation mittels kinetischer UPLC-ESI-MS-Messungen untersucht. Die Reaktionsbedingungen wurden wie in der Referenzliteratur gewählt und die Photolyse fand bei einer  $U_{1*}^{oNv}$ -Konzentration von 0.5 mg/mL in einem Gemisch aus Wasser/Acetonitril, 1:1 (v/v) + 0.1 % Essigsäure statt. Die Auswertung der Messung zeigt, dass die Kinetik einem exponentiellen Verlauf folgt und nach 60 min ca. 95 % des Peptids entschützt sind. Die Photolyse wurde ebenfalls mit reinem Wasser als Lösungsmittel durchgeführt. Der Vergleich der Kinetiken ist in Abbildung 4.44a dargestellt. Dabei kann festgestellt werden, dass die Kinetiken sich nicht in großem Maße unterscheiden. Die Photolyse in reinem Wasser ist geringfügig langsamer und erreicht nur einen Umsatz von ca. 90 %. Für beide Lösungsmittel wurde keine quantitative Entschützung erreicht und der exponentielle Verlauf der Kinetik lässt darauf schließen, dass diese auch mit längerer Reaktionszeit nicht erreicht wird. Die Photolyse wurde daher mit einer Lichtquelle mit höherer Leistung (60 W) wiederholt und zeigt eine deutlich schnellere Kinetik (Abbildung 4.44b). Der maximale Umsatz von 80 % wird dabei schon nach ca. 9 min erreicht. Die höhere Intensität der Lichtquelle trägt also nicht zu höheren Ausbeuten der Entschützung bei. Es werden, im Vergleich zur Photolyse mit schwächerer Leuchtquelle, mehr Addukte mit Abspaltprodukten der oNv-Gruppe gebildet, was auf eine erhöhte

Radikalkonzentration bei stärkerer Bestrahlung zurückzuführen ist. Die Radikale können unter anderem mit der freigesetzten Thiol-Gruppe reagieren und die Ausbeute der Polymerisation mindern.

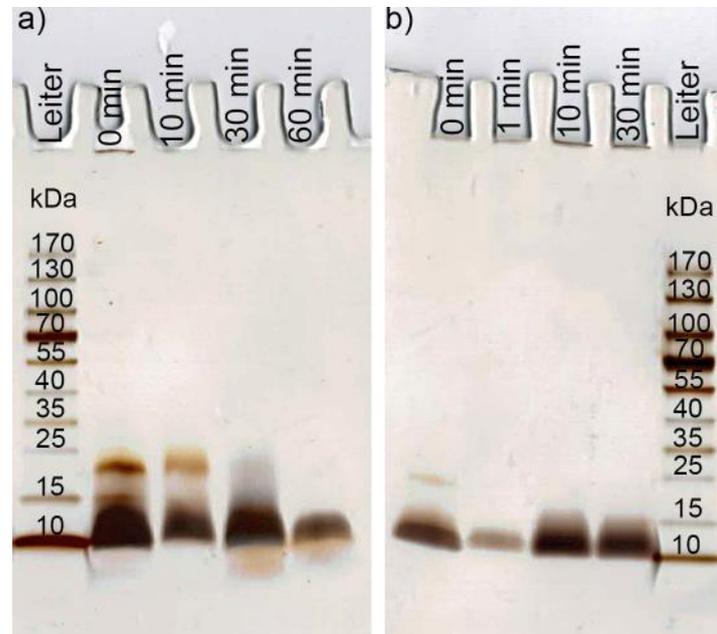


**Abbildung 4.44.** Verlauf der Photolyse von  $U_{1*}^{oNv}$  in Abhängigkeit von Lösungsmittel und Stärke der Leuchtquelle. a) Vergleich der kinetischen UPLC-Messungen der Photolyse in einem Wasser/ACN-Gemisch, 1:1 (v/v) + 0.1 % AcOH und reinem Wasser. b) Vergleich der Photolyse-Kinetiken in Wasser/ACN, 1:1 (v/v) + 0.1 % AcOH bei Verwendung von Leuchtquellen mit einer Leistung von 60 W und 12 W. (Bedingungen: 0.32 mM  $U_{1*}^{oNv}$ ,  $h\nu \sim 350$  nm; gestrichelte Linien dienen zur Orientierung).

Es wurden daher Polymerisationen von  $U_{1*}^{oNv}$  mit Bestrahlung durch die schwächere Leuchtquelle (12 W) in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (Abbildung 4.45a) und in Reinstwasser (Abbildung 4.45b) durchgeführt. Dabei fand eine Oxidation von  $U_{1*}^{oNv}$  mit 1 Äq.  $NaIO_4$ , anschließend die Bestrahlung bei 350 nm und die Entnahme von Proben nach bestimmten Zeitpunkten statt, die mit SDS PAGE gemessen wurden. Die Bildung von Polymeren mit apparenten Molekulargewichten zwischen 10 und 25 kDa bzw. zwischen 10 und 15 kDa konnte nachgewiesen werden. Somit zeigen die Polymerproben eine gewisse Ähnlichkeit zu den Messungen der enzymatischen Polymerisation von  $U_1^C$ , wenngleich ein geringeres Molekulargewicht erreicht wird und die Hauptbande bei 10 kDa und nicht bei 25 kDa, wie für  $PolyU_1^C$  beobachtet, liegt. Dennoch zeigt das Experiment, dass auch der Ansatz der Polymerisation von Unimeren mit photolabilen Cystein-Schutzgruppen erfolgreich ist und die Polymerisation über Cysteinyldopa-Bindungen wie gewünscht stattfinden kann.

Wider Erwarten scheint jedoch das Molekulargewicht der Proben der Polymerisation im Acetonitril/Wasser-Gemisch mit fortschreitender Polymerisationszeit abzunehmen. Diese Beobachtung muss mit der Lyophilisierung der Proben zusammenhängen, da in der Kinetik der Photolyse in Abbildung 4.44 klar gezeigt ist, dass zu Beginn der Reaktion keine entschützten Unimere vorliegen und somit auch keine Polymerisation stattfinden kann. Zudem wird für die Proben der Polymerisation in Wasser, die aufgrund der Abwesenheit von organischen Lösungsmitteln nicht lyophilisiert werden mussten, eine geringfügige Zunahme des Molekulargewichts im Laufe der Polymerisation beobachtet. Daher liegt nahe, dass eine Abspaltung der oNv-Gruppe während der

Lyophilisierung der Proben aus der kinetischen Messung im Acetonitril/Wasser-Gemisch stattgefunden hat, was bei Resolubilisierung zur Messung mit SDS PAGE zu einer sofortigen Polymerisation mit höherem Molekulargewicht geführt hat.



**Abbildung 4.45.** Kinetische SDS PAGE Experimente der Polymerisation von  $U_1^{*oNv}$ . a) Lyophilisierte Proben von  $PolyU_1^{*oNv}$  aus Polymerisation in Wasser/ACN, 1:1 (v/v) + 0.1 % AcOH. b) Direkt entnommene Proben von  $PolyU_1^{*oNv}$  aus Polymerisation in Wasser. (Bedingungen der Polymerisation: 0.32 mM  $U_1^{*oNv}$ , 1 Äq.  $NaIO_4$ ,  $h\nu \sim 350$  nm).

Für beide Polymerisationsexperimente reichen die Banden nach längerer Reaktionszeit von 60 min bzw. 30 min bis zu 15 kDa. Die Polymerisation bringt somit unter den gegebenen Bedingungen keine hohen Molekulargewichte hervor und erreicht nur ein DP von  $\sim 10$ . Es ist wahrscheinlich, dass die radikalischen Nebenprodukte der  $oNv$ -Abspaltung eine effektive Polymerisation durch Reaktion mit Dopachinon verhindern. Mithilfe von Radikalfängern, die mit den freigesetzten Abspaltprodukten der  $oNv$ -Schutzgruppe reagieren, könnte die Effektivität der Cysteinyl-dopa-Verknüpfung und somit der Polymerisation vermutlich noch gesteigert werden. Denkbar als Radikalfänger sind Verbindungen wie 1,4-Dihydroxybenzol, Nitrobenzol oder 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazin, die stabilisierte Radikale bilden und wasserlöslich sind. Weiterhin müssten Untersuchungen zum Einfluss der Unimer-Konzentration auf die Photolyse und Polymerausbeute durchgeführt werden, die Erkenntnisse zur Steigerung der Polymerausbeute liefern können.

Anhand der gezeigten Studien konnte das Polymerisationsprinzip über Unimere mit photolabiler Schutzgruppe bestätigt werden, es sind jedoch noch weitere Verbesserungen nötig um ähnlich gute Ergebnisse wie für die enzymatische Muschel-inspirierte Polymerisation zu erzielen.

#### 4.6.4 Teilzusammenfassung

Es wurden verschiedene alternative Syntheserouten für die Bildung von Muschel-inspirierten Polymeren untersucht, bei denen auf die Nutzung des Enzyms Tyrosinase verzichtet werden kann. Dafür wurden die Unimere  $U_{1^c}$  und  $U_{2^c}$  synthetisiert, die statt Tyrosin Dopa tragen und somit durch chemische Oxidationsmittel zu Dopachinon-Derivaten reagieren können. Bei der Untersuchung der Polymerisation von  $U_{1^c}$  und  $U_{2^c}$  stellte sich heraus, dass der Prozess nicht selektiv genug geführt werden kann. Zwar führt die Reaktion der Unimere mit  $\text{NaIO}_4$  zur Bildung von Polymeren, wie in MALDI-TOF-MS und SDS PAGE Messungen gezeigt werden konnte, jedoch sind die Ausbeuten deutlich geringer als beim enzymatischen Prozess, da neben der Dopa-Funktionalität auch die Thiol-Gruppe des Cysteins oxidiert wird. Dies wurde in kinetischen HPLC-Studien nachgewiesen, bei denen das Dimerisierungsprodukt aus der Reaktion der Modell-Unimere  $U_{1^s}$  und  $U_{1N^c}$  nur mit einer Ausbeute von ca. 34 % gebildet wurde. Um die unkontrollierte Oxidation des Thiols zu vermeiden, wurden verschiedene Ansätze untersucht, um das Cystein zu schützen.

Der erste Ansatz beinhaltet die Nutzung von Thiolacton als maskierte Thiol-Einheit. Während der Oxidationsreaktion ist das Thiol als intramolekularer Thioester geschützt und kann danach durch die Reaktion mit primären Aminen selektiv freigesetzt werden, wodurch die Polymerisation ermöglicht wird. Die Oxidation der peptidischen Unimere  $U_{S1^{Tla}}$  und  $U_{R1^{Tla}}$  mit einem Äquivalent  $\text{NaIO}_4$  findet quantitativ statt, wie durch UPLC-ESI-MS-Messungen belegt wurde. Für die Oxidation von  $U_{PEG1^{Tla}}$  sind überstöchiometrische Mengen an Oxidationsmittel nötig und die maximale Ausbeute des Dopachinon-Derivats beläuft sich auf 98 % bei der Reaktion mit 20 Äq.  $\text{NaIO}_4$ . Umso wichtiger ist jedoch, dass keine Nebenreaktion mit der Thiolacton-Gruppe stattfindet. Diese reagiert jedoch mit Ethanolamin zur Freisetzung des Thiols mit Ausbeuten von bis zu 80 %. UPLC-ESI-MS Studien haben gezeigt, dass die Aminolyse mit steigender Menge an Amin auch zu höheren Umsätzen führt. Bei der Polymerisation wurde allerdings ersichtlich, dass größere Mengen an Amin in geringeren Molekulargewichten resultieren. Vermutlich führen große Überschüsse an Amin zu dessen Reaktion mit Dopachinon und folglich zu verschlechterten Polymerausbeuten. Für die Probe, die mit einem Äquivalent  $\text{NaIO}_4$  und zehn Äquivalenten Amin umgesetzt wurde, wird das höchste Molekulargewicht mit einer breiten Verteilung zwischen 50 und 200 kDa beobachtet. Damit wurde gezeigt, dass die Maskierung über Thiolacton trotz weiterem Optimierungsbedarf einen vielversprechenden Ansatz darstellt, der mit der enzymatischen Methode konkurrieren kann.

Beim zweiten Ansatz wurde die Strategie verfolgt das Cystein mit einer photolabilen oNv-Schutzgruppe zu versehen, die nach der Oxidation durch Bestrahlung photolytisch entfernt werden kann. Auch für  $U_{1^{oNv}}$  wurde in UPLC-ESI-MS-Messungen bei der Reaktion mit einem

Äquivalent  $\text{NaIO}_4$  eine quantitative Oxidation beobachtet. Die Photolyse kann in reinem Wasser oder in einem Gemisch aus Wasser/Acetonitril, 1:1 (v/v) + 0.1 % Essigsäure stattfinden und führt innerhalb von 60 min zu bis zu 90 % entschütztem Unimer. Wird eine Leuchtquelle mit höherer Leistung genutzt, so wird die Ausbeute der Photolyse nicht gesteigert, da eine erhöhte Radikalkonzentration auftritt, die zur vermehrten Bildung von Nebenprodukten führt. Mittels SDS PAGE wurde gezeigt, dass nach Oxidation von  $\text{U}_1^{\text{oNv}}$  und dessen Photolyse eine Polymerisation eintritt, die zu Polymeren mit einem Molekulargewicht von bis zu 15 kDa führt. Somit zeigt auch dieser Ansatz, dass die Polymerisation möglich und eine Schützung von Cystein über die oNv-Gruppe wirksam ist. Der radikalische Charakter der Reaktion führt jedoch zu Nebenreaktionen, die das Molekulargewicht der Polymere beeinträchtigen. Der Einsatz von Radikalfängern bei der Photolyse könnte es jedoch ermöglichen, ein ähnlich gutes Ergebnis wie bei der enzymatischen Muschel-inspirierten Polymerisation zu erreichen.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Viele biologische Materialien sind den künstlichen vom Mensch entwickelten Stoffen überlegen, wurden sie doch über Jahrtausende evolutionär entwickelt um spezifische Aufgaben zu erfüllen. Im Streben nach immer komplexeren und leistungsfähigeren Materialien wird sich daher gerne an den von der Natur gegeben Strukturen und Mechanismen bedient, um dieses Ziel zu erreichen. Die Miesmuschel der Gattung *Mytilus* ist ein viel untersuchtes Vorbild, da sie unter widrigsten Bedingungen im Salzwasser an verschiedensten Oberflächen haftet, besser als jedes synthetisches Adhäsiv es kann. Basierend auf Strukturmerkmalen der Muschelfußproteine wurde in der vorliegenden Arbeit ein bio-inspiriertes Polymerisationsverfahren entwickelt, das über eine enzymatische Oxidation von Tyrosin zu Dopachinon und anschließender Addition von Cystein zur Bildung von Muschelfußproteinanaloga führt, die für Adhäsion und Beschichtung unter Wasser eingesetzt werden können.

Auf Grundlage des Decapeptids AKPSYPPTYK der Konsensussequenz von *Mefp-1* wurden die Oligopeptide U<sub>1</sub><sup>C</sup> (AKPSS<sup>5</sup>PPTY<sup>9</sup>KGGGC) und U<sub>2</sub><sup>C</sup> (AKPSY<sup>5</sup>PPTY<sup>9</sup>KGGGC) entwickelt, die als Unimere für die Polymerisation Anwendung fanden. Durch die Erweiterung des Decapeptids mit Cystein über einen Triglycin-Spacer wird nach enzymatischer Oxidation eine Polymerisation über Cysteinyldopa-Bindungen ermöglicht. Diese läuft innerhalb weniger Minuten quantitativ ab und führt zu Polymeren mit einer bimodalen Molekulargewichtsverteilung von bis zu 530 kg/mol. Die Polymere der Fraktion mit geringerem Molekulargewicht können durch sekundäre Vernetzung zur Bildung der hochmolekularen Polymere führen. In Modell-Studien mit monofunktionalen Unimeren konnte nachgewiesen werden, dass die Vernetzung über die Bildung von diDopa-Bindungen stattfindet, solange keine Thiol-Einheiten zur Verfügung stehen. Weiterhin verifizierten Studien mittels Tandem-Massenspektrometrie beim Modell-System sowie bei der Polymerisation den Polymerisationsmechanismus über die Bildung von Cysteinyldopa. Tiefergehende Untersuchungen zur Cystein-Dopachinon-Addition deckten ein Redoxsystem auf, in dem Disulfid durch Oxidation der Thiol-Gruppen, gekoppelt an die Reduktion von Dopachinon, als Zwischenprodukt gebildet und durch die Rückreaktion verbraucht wird. Letztendlich treibt die Bildung des thermodynamisch stabileren Cysteinyldopa-Produkts jedoch die Polymerisation an.

Die gebildeten Muschel-inspirierten Polymere zeigten exzellentes Beschichtungsverhalten auf polaren und unpolaren Oberflächen. Es werden bis zu 34 nm dicke Multischichten gebildet, die resistent gegen hochkonzentrierte Salzlösungen wie auch eine Modell-Lösung für hypersalines Totes

Meer Wasser sind und sich mit maximalen Masseverlusten von 6 % kaum von der Oberfläche abwaschen lassen. Selbst unter Meerwasser-Salzkonzentration adsorbieren die Polymere an die Oberfläche und zeigen somit eine starke Oberflächenaffinität unter widrigen Bedingungen. Bedingt durch die verzweigte Topologie von PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> entstehen rigidere Polymerschichten als es für das lineare PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> beobachtet wird. Dies führt auch dazu, dass für PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> generell dickere Polymerfilme gebildet werden, die angesichts nicht-kovalenter Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten und damit verbundener erhöhter Wassereinlagerung zu viskoelastischeren Schichten führen. Weiterhin deckten pH-abhängige Adsorptionsstudien auf, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen, zumindest auf den metalloxidischen Oberflächen, den Adsorptionsprozess dominieren. Die Polymere adsorbieren daher bei steigendem pH-Wert, aufgrund von erhöhter Oberflächenladung, in stärkerem Maße. In Anbetracht des leicht basischen marinen pH-Wertes von  $\sim 8.2^{106}$  sind damit gute Voraussetzungen für eine hohe Funktionalität in Meerwasser gegeben.

Bei den Untersuchungen zur Adhäsion der Polymere zeigte sich ein dynamisches und vernetzungsbedingt differenziertes Verhalten. Die Wechselwirkungen der Polymerbeschichtungen werden beim Kontakt mit einer zweiten Oberfläche optimiert und es wird somit eine zeitabhängige Steigerung der Adhäsion beobachtet. Die flexiblere PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung erreicht dabei deutlich höhere Adhäsionsenergien als die Beschichtung aus verzweigtem und rigidem PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>. Die Stärke der Adhäsionsarbeit ist dabei ähnlich gut wie die eines kommerziellen Muschelfußprotein-Extraktes, wie über Referenzmessungen gezeigt wurde. In der Literatur beschriebene Adhäsionsenergien des natürlichen Vorbilds *Mefp*-1 werden von den künstlichen mfp-Analoga sogar übertroffen. Damit stellen die Muschel-inspirierten Polymere außerordentlich leistungsfähige Nass-Haftstoffe dar, die in ihrem universellen Adsorptions- und adaptiven Adhäsionsverhalten Eigenschaften der nativen Muschelfußproteine imitieren können, indem sie auf deren strukturellen Motiven basieren.

Zudem wurden weitere Konzepte zur Synthese Muschel-inspirierter Polymere verfolgt, die von einer enzymatischen Reaktion absehen und somit für technische Anwendungen attraktiver sind. Ausgehend von einer chemischen Oxidation von Dopa-haltigen Unimeren, mussten Strategien entwickelt werden die Thiole vor Oxidation zu schützen, um verringerte Polymerausbeuten zu vermeiden. Die Konzepte der Maskierung des Thiols als Thiolacton und der Schützung von Cystein mittels photolabiler Schutzgruppe zeigten dabei erste Polymerisationserfolge und zeigen vielversprechende Ansätze für die Realisierung enzymfreier Polymerisation auf.

Gerade im Hinblick auf eine Erhöhung der Substanzmenge wären enzymfreie Methoden, welche die Ergebnisse des bio-inspirierten Verfahrens reproduzieren können von Bedeutung, damit sich Bulk-Adhäsionsexperimente und technische Tests wie Zug- und Kompressionsversuche, Zugscherversuche,

dynamisch-mechanische Analysen, Schältests oder Bruchanalysen realisieren lassen. Dafür müssten die enzymfreien Methoden in Folgestudien tiefergehend charakterisiert und optimiert werden. Weiterhin ist für zukünftige Studien ein modifizierter Unimeraufbau von Interesse. Zum einen könnte die enzymatische Polymerisation noch vereinfacht und kosteneffizienter werden, indem die Unimere statt reinen Peptiden auch synthetische Bausteine tragen. Zum anderen kann durch zusätzliche Domänen eine zweite funktionelle Ebene eingebaut werden. Dabei könnte der Versuch erfolgen eine übergeordnete Hierarchie, ähnlich zum biologischen System, zu erzeugen, um die Kohäsion zu erhöhen. Denkbar wäre die Implementierung von zusätzlichen strukturellen Motiven, die beispielsweise zur Ausbildung von  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen führen oder die Nutzung von vernetzenden Einheiten sowie Metallionen für Komplexierung. Darüber hinaus könnten nicht-toxische PEG-Segmente die Biokompatibilität erhöhen. Für derartige Studien wäre zunächst zu untersuchen, inwieweit eine Änderung des Unimeraufbaus vom Enzym tolerierbar ist ohne die Oxidation zu beeinträchtigen. Ultimativ stünde im Fokus neuartige Hochleistungsklebstoffe zu entwickeln, die die Prinzipien natürlicher Materialien erweitern und deren Fähigkeiten übersteigen.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Materialien

Die aufgeführten Chemikalien wurden wie erhalten verwendet, sofern es nicht anders beschrieben ist. Puffer und wässrige Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einem Labostar SG Water Reinstwassersystem der Firma *Evoqua Water Technologies GmbH* (Günzburg, Deutschland) hergestellt.

**Reagenzien für Synthese:** Die *N*- $\alpha$ -Fmoc geschützten Aminosäuren Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Cys-OH $\cdot$ H<sub>2</sub>O, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Tyr(Boc)-OH wurden von *IRIS Biotech GmbH* (Marktredwitz, Deutschland) bezogen. Die weiteren Aminosäuren Fmoc-Dopa(Acetonid)-OH und Fmoc-Phe(4-NO<sub>2</sub>)-OH wurden bei *Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland) erworben. Die Kupplungsreagenzien 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) und Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) stammten von *IRIS Biotech GmbH* (Marktredwitz, Deutschland). Als Synthescharze wurden TentaGel S RAM Harz (Beladung: 0.23 mmol/g) von *Rapp Polymere GmbH* (Tübingen, Germany) und Fmoc-Rink Amid AM Polystyrol-Harz (Beladung: 0.59 mmol/g) von *IRIS Biotech GmbH* (Marktredwitz, Deutschland) eingesetzt. *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP, 99.9 %, peptide grade, *IRIS Biotech GmbH*) wurde vor dem Einsatz filtriert und Dichlormethan (DCM, peptide grade, *IRIS Biotech GmbH*) über CaH<sub>2</sub> destilliert. *N,N*-Dimethylformamid (DMF, peptide grade) stammte ebenfalls von *IRIS Biotech GmbH* (Marktredwitz, Deutschland). Als weitere Lösungsmittel kamen Tetrahydrofuran (THF,  $\geq 99.7$  %, LC-MS grade) von *VWR International* (Darmstadt, Deutschland) und Methanol (LC-MS grade) von *Acros Organics* (Geel, Belgien) zum Einsatz. Trifluoressigsäure (TFA, peptide grade) wurde vor dem Einsatz destilliert und stammte ebenso wie *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA, peptide grade) von *Acros Organics* (Geel, Belgien). Piperidin (peptide grade) wurde ebenfalls von *Acros Organics* (Geel, Belgien) bezogen und vor dem Einsatz über Kaliumhydroxid getrocknet und destilliert. Triethylsilan (TES,  $\geq 98$  %) wurde von *Alfa Aesar* (Karlsruhe, Deutschland) erhalten. *N*-Fmoc-*N*-succinyl-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin und 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylbromid wurden bei *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) erworben. Essigsäureanhydrid stammte von *Carl Roth GmbH* (Karlsruhe,

Deutschland).  $\alpha$ -Isocyanato- $\gamma$ -thiolacton (Tla-NCO) wurde freundlicherweise von SENSU CELASUN (Arbeitsgruppe Prof. HANS BÖRNER, *Humboldt-Universität zu Berlin*) synthetisiert und bereitgestellt.

**Reagenzien für enzymatische Reaktionen und Peptidaktivierung:** Das Enzym *AbPPO<sub>4</sub>* wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. ANNETTE ROMPEL (*Universität Wien*) als Lyophilisat aus Natriumcitratpuffer (50 mM, pH 6.8) zur Verfügung gestellt. Kommerzielle Tyrosinase aus Pilzen (*Agaricus bisporus*) wurde von *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) bezogen. Enzymlyophilisate und-lösungen wurde bei -20 °C gelagert. L-Tyrosin ( $\geq 98\%$ ), L(+)-Natriumascorbat ( $\geq 99\%$ ), Natriumperiodat ( $\geq 99.5\%$ ) und Natriumcitrat (Dihydrat,  $> 98\%$ ) wurden von *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) erhalten. L(+)-Ascorbinsäure ( $\geq 99.5\%$ ), Citronensäure ( $\geq 99.5\%$ ), Natriumdihydrogenphosphat (Dihydrat,  $\geq 99\%$ ) und Dinatriumhydrogenphosphat ( $\geq 99\%$ ) stammten von *Carl Roth GmbH* (Karlsruhe, Germany). Salzsäure (37 %) wurde von *VWR International* (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

**Reagenzien für QCM-D- und CP-AFM-Experimente:** Calciumchlorid (Dihydrat,  $\geq 99.5\%$ ) und Kaliumchlorid ( $\geq 99.5\%$ ) wurden von *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) erhalten. Natriumsulfat ( $\geq 99\%$ ), Natriumhydrogencarbonat ( $\geq 99.5\%$ ), Natriumbromid ( $\geq 99\%$ ) und Strontiumchlorid (Hexahydrat,  $\geq 99\%$ ) stammten von *Carl Roth GmbH* (Karlsruhe, Deutschland). Magnesiumchlorid (Hexahydrat, 98 %) wurde von *abcr GmbH* (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Natriumchlorid ( $\geq 99\%$ ) wurde bei *Acros Organics* (Geel, Belgien) erworben. Hellmanex III stammte von *Hellma GmbH* (Müllheim, Deutschland). Ethanol (absolut,  $>99.7\%$ ) wurde von *VWR International* (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Cell-Tak™ wurde von *Corning Incorporated – Life Sciences* (Tewksbury, USA) erhalten.

**Reagenzien für SDS PAGE Messungen:** Natriumdodecylsulfat (SDS, 85 %) wurde von *Acros Organics* (Geel, Belgien) erhalten. Glycin ( $\geq 99\%$ ) stammte von *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland). Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris,  $\geq 99.9\%$ ) wurde von *Carl Roth GmbH* (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die vorgefärbte Proteinleiter *PageRuler* (10 – 180 kDa), der nicht-reduzierende Probenpuffer *Pierce lane marker* und das *Pierce silver stain kit* wurden bei *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, USA) erworben. Die Lagerung der Proteinleiter *PageRuler* und des *Pierce lane markers* erfolgte bei -20 °C.

**Weitere Reagenzien:** 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB, 99%) stammte von *Acros Organics* (Geel, Belgien).  $\alpha$ -Cyanozimtsäure (CHCA, 99 %) und Ameisensäure (MS grade, ~98 %) wurden von *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) bezogen. Acetonitril (ACN, LC-MS grade) wurde bei *VWR International* (Darmstadt, Deutschland) erworben und deuteriertes Dimethylsulfoxid (DMSO-d<sub>6</sub>) stammte von Deutero (Kastellaun, Deutschland).

## 6.2 Lösungen und Puffer

**Hypersaline Lösung (Totes Meer Wasser)<sup>255</sup> :** 368.0 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 97.0 g NaCl, 63.2 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 14.9 g KCl, 6.82 g NaBr, 664.7 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und 275.6 mg  $\text{NaHCO}_3$  in 1 L Reinstwasser lösen und durch Spritzenfilter (0.45  $\mu\text{m}$  Porengröße) filtrieren.

**Natriumcitratpuffer (0.3 M, pH 1.5):** 57.64 g Citronensäure (0.3 mol) in etwas weniger als 1 L Reinstwasser lösen, pH Wert auf 1.5 einstellen, mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen und durch Spritzenfilter (0.45  $\mu\text{m}$  Porengröße) filtrieren.

**Natriumcitratpuffer (0.3 M, pH 5.0):** 20.17 g Citronensäure (0.1 mol) und 57.35 g Natriumcitrat- $2\text{H}_2\text{O}$  (0.2 mol) in etwas weniger als 1 L Reinstwasser lösen, pH Wert auf 5.0 einstellen, mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen und durch Spritzenfilter (0.45  $\mu\text{m}$  Porengröße) filtrieren.

**Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8):** 136.6 mg Citronensäure (0.7 mmol) und 4.79 g Natriumcitrat- $2\text{H}_2\text{O}$  (16.3 mmol) in etwas weniger als 1 L Reinstwasser lösen, pH Wert auf 6.8 einstellen, mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen und durch Spritzenfilter (0.45  $\mu\text{m}$  Porengröße) filtrieren.

**Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 8.0):** 1.09 g Natriumdihydrogenphosphat- $2\text{H}_2\text{O}$  (7.0 mmol) und 6.10 g Dinatriumhydrogenphosphat (43.0 mmol) in etwas weniger als 1 L Reinstwasser lösen, pH Wert auf 8.0 einstellen, mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen und durch Spritzenfilter (0.45  $\mu\text{m}$  Porengröße) filtrieren.

**Natriumphosphatpuffer (0.3 M, pH 8.2):** 4.34 g Natriumdihydrogenphosphat- $2\text{H}_2\text{O}$  (27.8 mmol) und 38.56 g Dinatriumhydrogenphosphat (272.2 mmol) in etwas weniger als 1 L Reinstwasser lösen, pH Wert auf 8.2 einstellen, mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen und durch Spritzenfilter (0.45  $\mu\text{m}$  Porengröße) filtrieren.

**SDS Laufpuffer:** 3 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (24.8 mmol), 14.4 g Glycin (40.0 mmol) und 1 g Natriumdodecylsulfat (3.5 mmol) in 1 L Reinstwasser lösen.

**Tris-Puffer (1 M, pH 8.0):** 121.14 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (1.0 mol) in etwas weniger als 1 L Reinstwasser lösen, pH Wert auf 8.0 einstellen, mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen und durch Spritzenfilter (0.45 µm Porengröße) filtrieren.

### 6.3 Messgeräte

**AFM:** Messungen mittels Rasterkraftmikroskop (AFM) wurden auf einem MFP-3D Bio (*Asylum Research, An Oxford Instruments Company, Santa Barbara, USA*) Instrument mit Draufsichtoptik ausgeführt. Polymerbeschichtete Silizium-Wafer wurden in einer geschlossenen Flüssigkeitszelle mit einem selbstgebauten Einsatz fixiert und mit entsprechendem Puffer bedeckt. Zwei Cantilever (CSC 38, *MikroMasch Europe, Wetzlar, Deutschland*) mit Federkonstanten von 116 pN/nm und 245 pN/nm wurden für die Adhäsionsmessungen mit Silicakolloidpartikeln (4.8 µm Durchmesser, *micro particles GmbH, Berlin, Deutschland*) modifiziert. Kraft-Abstands-Messungen wurden mit einer festen Geschwindigkeit von 2 µm/s durchgeführt, wobei die Verweilzeiten auf der Oberfläche systematisch zwischen 0 s und 60 s und die Anpresskraft zwischen 2 nN und 50 nN variiert wurden. AFM Abbildungen wurden in Natriumcitratpuffer sowohl mit der iDrive-Technik (*Asylum Research, An Oxford Instruments Company, Santa Barbara, USA*) als auch im Standard-Tapping-Modus aufgenommen.

**LC-ESI-MS/MS:** Für Tandem-massenspektrometrische Messungen mittels Flüssigkeitschromatografie (LC) und Elektrosprayionisation (ESI) wurde ein Dionex UltiMate 3000 RSLCnano LC System (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*) genutzt, das mit NCS-3500RS binären Schnelltrennungs-Nano-/Kapillarpumpen ausgestattet ist. Die chromatografische Trennung erfolgte auf einer selbstgebauten InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 pikoTip Säule (75 µm x 50 cm, *Agilent, Santa Clara, USA*) mit einer Acclaim PepMap 100 C18 Vorsäule (75 µm x 20 mm, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*). Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus A Reinstwasser und B Acetonitril mit jeweils 0.1 % Ameisensäure eingesetzt. Zur Detektion diente ein Orbitrap Fusion Tribrid Massenspektrometer (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*). Die Messungen wurden mit *electron-transfer and higher-energy collisional dissociation* (EThcD) Fragmentierung unter Nutzung von ladungsabhängig kalibrierten ETD-Parametern, 30 % Kollisionsenergie und bei einer Isolationsbreite von 1.2 Da durchgeführt und mit Xcalibur 3.0.63 Software ausgewertet. Alle Messungen wurden von Dr. MICHAEL SCHÜMANN durchgeführt (Arbeitsgruppe Dr. EBERHARD KRAUSE, *Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin*).

**GPC:** Wässrige Gelpermeationschromatografie (GPC) erfolgte mit einer NOVEMA Max analytical linear XL Säule (*PSS Polymer Standards Service GmbH*, Mainz, Deutschland). Es wurde ein AS-100 Autosampler und ein P-100 Pumpe von *TSP Thermo Separation Products* (Waltham, USA) sowie ein Shodex RI-101 RI-Detektor (*VDS-optilab*, Berlin, Germany) verwendet. Als mobile Phase wurde Acetatpuffer (100 mM, pH 4.5)/Methanol (4:1, v/v) mit einer Flussrate von 1.0 mL/min genutzt. Die Kalibrierung des Messsystems erfolgte über Pullulan-Standards. Die Daten wurden mit der PSS-WinGPC Unichrom Software aufgenommen und ausgewertet. Alle Messungen wurden von MARLIES GRÄWERT durchgeführt (Arbeitsgruppe Dr. BERNHARD SCHMIDT, *Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung* (MPI), Potsdam).

**Präparative Flash-Säulenchromatografie:** Die präparative Aufreinigung mittels Flash-Säulenchromatografie wurde mit einer CombiFlash Rf+ UV-Vis des Herstellers *Teledyne ISCO* (Lincoln, USA) bewerkstelligt. Als Trennsäule wurde eine 40 g RediSep Rf Silicagel Flash-Säule (*Teledyne ISCO*, Lincoln, USA) eingesetzt, die mit einem Gemisch aus A Dichlormethan und B Methanol als mobile Phase bei einer Flussrate von 40 mL/min betrieben wurde.

**Analytische HPLC:** Für analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) wurde ein System der Firma *Shimadzu* (Kyoto, Japan) genutzt, das mit einer SCL-10A vp Steuereinheit, einer LC-10AD vp Flüssigkeitschromatografie-Pumpeneinheit und einem CTO-10AC vp Säulenofen ausgestattet war. Eine YMC-Pack ODS-AQ Säule (250 x 4.6 mm, *YMC*, Kyoto, Japan) wurde bei 40 °C betrieben und als Trennsäule verwendet. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus A Reinstwasser und B Acetonitril mit jeweils 0.1 % Ameisensäure, das mit einer Flussrate von 1.0 mL/min eingesetzt wurde. Die Detektion erfolgte über einen SPD-M10A vp UV/VIS-Diodenarray Detektor.

**Präparative HPLC:** Die präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) wurde an einem Prominence System der Firma *Shimadzu* (Kyoto, Japan) durchgeführt, das mit einer CBM-20A Steuereinheit, einer präparativen Flüssigchromatografie LC-20AP Pumpeneinheit, einem CTO-10AC vp Säulenofen und einem FRC-10A Fraktionssammler betrieben wurde. Die chromatografische Trennung erfolgte mittels einer Synergi Fusion-RP Säule (250 x 21.2 mm, *Phenomenex*, Aschaffenburg, Deutschland) oder einer XBridge BEH C18 OBD Säule (150 x 19 mm, *Waters*, Milford, USA) bei 40 °C. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus A Reinstwasser und B Acetonitril mit jeweils 0.1 % Ameisensäure mit einer Flussrate von 22 mL/min genutzt. Die Detektion des UV-Signals erfolgte mittels eines SPD-10A UV/VIS-Detektors.

**MALDI-TOF-MS:** Massenspektrometrie mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) und Flugzeitanalyse (TOF) wurde an einem autoflex III smartbeam System (*Bruker*, Billerica, USA) oder einem AXIMA Confidence (*Shimadzu*, Kyoto, Japan) gemessen. Dafür wurden 1  $\mu\text{L}$  der gelösten Probe mit 2  $\mu\text{L}$  Matrix-Lösung (10 mg/mL 2,5-Dihydroxybenzoesäure oder 7 mg/mL  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure in Reinstwasser/Acetonitril (1:1, v/v) mit 0.1 % TFA) auf dem Probenträger gemischt und bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Die Messungen wurden im linear positiven Messmodus aufgenommen und im Massenbereich  $m/z > 10\,000$  wurden Gating sowie Deflection Modi genutzt.

**MALDI-TOF-MS/MS:** Tandem-Massenspektrometrie wurde an einem 5800 MALDI-TOF/TOF-System (*AB Sciex*, Framingham, USA) durchgeführt. Die gelösten Proben wurden in einem 1:1 Verhältnis mit Matrix-Lösung, bestehend aus 7 mg/mL  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure in Reinstwasser/Acetonitril (1:1, v/v) mit 0.1 % TFA, gemischt und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Messungen wurden im positiven Reflektron-Modus mit 4000 Laserschüssen und einer Laserintensität von 3200 bei einfachen MS-Spektren und 12500 Laserschüssen und einer Laserintensität von 4300 bei Tandem-MS/MS-Spektren aufgenommen. Alle Messungen wurden von HEIKE STEPHANOWITZ durchgeführt (Arbeitsgruppe Dr. EBERHARD KRAUSE, *Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie* (FMP), Berlin).

**NMR:** Kernspinresonanz (NMR) wurde an einem AVANCE II 500 Spektrometer der Firma *Bruker* (Billerica, USA) mit 500.13 MHz für  $^1\text{H}$ - und 125.76 MHz für  $^{13}\text{C}$ -Spektren bei Raumtemperatur durchgeführt.

**QCM-D:** Messungen mittels analytischer Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipation (QCM-D) wurden an einem Q-sense Explorer E1 Einzelsensormodul mit Dissipation in Kombination mit einer QE 401 Elektronikeinheit (*Biolin Scientific*, Göteborg, Schweden) durchgeführt. Das System wurde mit einer IPC-N 4 Multikanalpumpe der Firma *Ismatec* (Wertheim, Deutschland) ausgestattet. Piezoelektrische Sensorkristalle mit 100 nm Aluminiumoxid-Beschichtung (QSX 309, *Biolin Scientific*, Göteborg, Schweden), mit 50 nm Siliziumdioxid-Beschichtung (QSX 303, *Biolin Scientific*, Göteborg, Schweden) und mit Fluoropolymer-Beschichtung (QSX 331 AF 1600, *Biolin Scientific*, Göteborg, Schweden) wurden für die kinetischen Messungen genutzt.

**SDS-PAGE:** Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in einer Mini-PROTEAN Tetra Cell Vierkammerzelle mit vorgegossenen Mini-PROTEAN TGX Gelen (4-20 % Polyacrylamid-Gelanteil) der Firma *Bio-Rad* (Hercules, USA) durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 140 V. Die Proben wurden mit jeweils 5 µL nicht-reduzierendem Pierce Lane Marker Protein-Ladepuffer (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA) gemischt und als Größenmarker wurde PageRuler als vorgefärbter Proteinstandard (*Fermentas*, 10-170 kDa) der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, USA) genutzt. Eine anschließende Silberfärbung erfolgte mittels eines Pierce Silver Stain Kit's (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA).

**UPLC-QMS:** Messungen mittels analytischer Ultrahochleistungsflüssigchromatografie (UPLC) mit Quadropol-Massenspektrometer (QMS) wurden auf einem Acquity UPLC H-class System (*Waters*, Milford, USA) mit PDA Photodiodearray UV/VIS-Detektor und QDa-Massendetektor durchgeführt. Acquity UPLC BEH C18 Säulen (2.1 x 100 mm, 2.1 x 50 mm, *Waters*, Milford, USA) wurden für die chromatografische Trennung bei einer eingestellten Temperatur von 40 °C genutzt. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus A Reinstwasser und B Acetonitril mit jeweils 0.1 % Ameisensäure mit einer Flussrate von 0.5 mL/min eingesetzt.

**UV/VIS-Spektroskopie:** UV/VIS-spektroskopische Messungen wurden auf einem EonC Microplate Spektrophotometer mit Küvettenöffnung (*BioTek*, Bad Friedrichshall, Deutschland) mit Quarz-Küvetten oder UV-Star µClear F-Bottom Microplates (*Greiner Bio-One GmbH*, Kremsmünster, Österreich) durchgeführt.

## 6.4 Methoden

### 6.4.1 Peptidsynthese

#### Automatisierte Peptidsynthese (allgemeine Arbeitsvorschrift - AAV1)

Die automatisierte festphasengebundene Peptidsynthese erfolgte an einem ABI 433a Peptidsynthesizer (*Applied Biosystems*, Foster City, USA). Die Kupplungsschritte erfolgten unter Verwendung der Fmoc-Strategie nach dem Standard ABI-Fastmoc-Protokoll (Einfachkupplung bis zur 10. Aminosäure, Doppelkupplung ab der 11. Aminosäure, Acetylierung verbliebener unreaktierter Aminofunktionen) mit NMP als Lösungsmittel. Es wurden 10 Äquivalente des jeweiligen Standard-*N*- $\alpha$ -Fmoc-Aminosäurederivates eingesetzt. Die *N*- $\alpha$ -Fmoc-Aminosäure-Kupplung wurde durch die Verwendung des Aktivierungsreagenz HBTU in Kombination mit DIPEA unterstützt. Nach der abschließenden Fmoc-Entfernung wurde das Harz in einen 20 mL Spritzenreaktor überführt, anschließend 10-mal mit DCM gewaschen und vor längerer Lagerung im Vakuumtrockenschrank getrocknet und zur Lagerung bei -20 °C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

Synthese-Lösungen:

DIPEA:	70 mL (412 mmol) DIPEA gelöst in 130 mL NMP
HBTU:	34.14 g (90 mmol) HBTU gelöst in 200 mL NMP
Piperidin:	100 % Piperidin
Acetylierungslösung:	9.5 mL Essigsäurehydrid (100 mmol), 4.5 mL DIPEA (26 mmol) und 0.4 g HOBt (3 mmol) gelöst in 186 mL NMP

#### Manuelle Peptidsynthese (allgemeine Arbeitsvorschrift - AAV2)

Die Peptidsynthesen erfolgten manuell durch standardisierte festphasengebundene Peptidsynthese nach Fmoc-Strategie. Die Kupplungsschritte wurden mit 5 Äq. der Aminosäure, 5 Äq. PyBOP als Kupplungsreagenz und 10 Äq. DIPEA für 1 h durchgeführt. Lediglich der erste Kupplungsschritt erfolgte mit je 3 Äq. für 4 h. Nach der Kupplung folgte die Acetylierung der unreaktierten Aminofunktionen und danach die Fmoc-Abspaltung mit Piperidin für jeweils 2-mal 5 min. Zwischen jedem Schritt wurde ein Waschschrift durchgeführt (5-mal NMP, 5-mal DCM, 5-mal NMP). Die Fmoc-Abspaltungslösung wurde für manuelles UV-Monitoring zur Überprüfung der Kupplungsrate genutzt. Nach der abschließenden Fmoc-Abspaltung wurde 10-mal mit DCM gewaschen.

Synthese-Lösungen:

Acetylierungslösung: 9.5 mL Essigsäurehydrid (100 mmol), 4.5 mL DIPEA (26 mmol) und 0.4 g HOBT (3 mmol) gelöst in 186 mL NMP

Piperidin: 20 % vol Piperidin gelöst in NMP

### Freisetzung der Peptide (allgemeine Arbeitsvorschrift - AAV3)

Die Peptide wurden mit einer Mischung aus 95:4:1 TFA/H<sub>2</sub>O/TES (v/v) für 3 h vom festen Träger abgespalten, was zu einem vollständig entschützten Peptid führte. Das Harz wurde gefiltert und mit TFA gewaschen. Das in TFA gelöste Produkt wurde durch Fällung in kaltem Diethylether (-20 °C) und anschließende Zentrifugation isoliert. Es erfolgte ein Abdekantieren der Etherphase und wiederholtes Lösen in 0.5-1 mL TFA sowie Ausfällen in kaltem Diethylether. Durch dreimaliges Ausfällen wurde das Produkt gereinigt. Nach Trocknung des gereinigten Produktes wurde dieses in Reinstwasser gelöst und lyophilisiert. Bei unzureichender Reinheit (<95 %) wurde das Produkt mittels präparativer HPLC aufgearbeitet.

#### 6.4.2 Herstellung von *AbPPO4* Tyrosinase

Die Herstellung durch genetische Expression und Aufreinigung des Enzyms Tyrosinase vom Typ *AbPPO4* wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. ANNETTE ROMPEL (*Universität Wien*), im Besonderen durch MATTHIAS PRETZLER, ausgeführt.

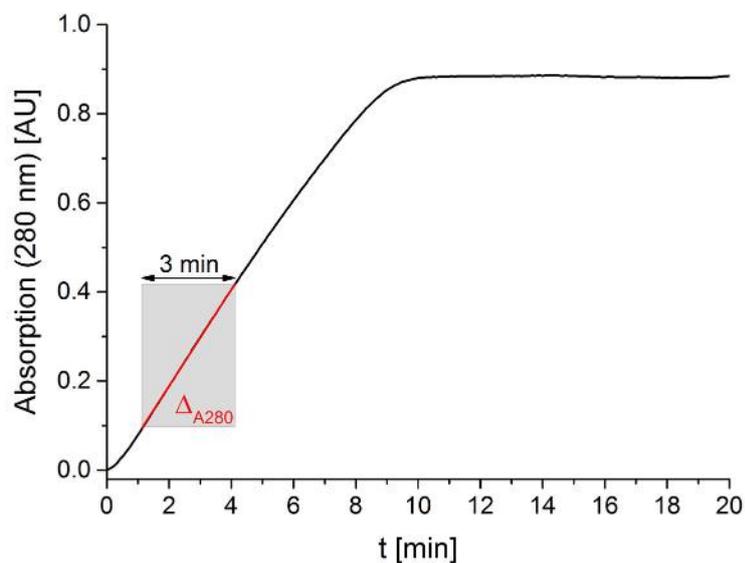
Das *AbPPO4* kodierende Gen wurde mittels PCR aus cDNA vervielfältigt, die von einem *Agaricus bisporus*-Fruchtkörper im Wachstumsstadium 5<sup>296</sup> stammt und in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 (*GE Healthcare Europe*, Freiburg, Deutschland) geklont. Das resultierende Konstrukt kodiert N-terminal mit *AbPPO4* fusionierte Glutathion-S-Transferase (GST) und wurde in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die *E. coli* wurden bei 20 °C für ca. 40 h in LB-Medium, dem 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, Mineral-Stammlösung M<sup>297</sup>, Zucker-Stammlösung 5052<sup>297</sup>, 100 mg/L Na-Ampicillin und 5 mM CuSO<sub>4</sub> zugesetzt wurde, kultiviert. Durch Hochdruckextrusion<sup>298</sup> wurde ein Zelllysate erzeugt und das Zielprotein im Anschluss durch Affinitätschromatographie auf Glutathion-Sepharose (*GE Healthcare*) aufgereinigt. Der Fusionspartner GST wurde durch Proteolyse mit GST-markiertem Picornain 3C entfernt, das anschließend zusammen mit dem abgespaltenen GST durch eine zweite Runde Affinitätschromatographie auf dem gleichen Säulenmaterial entfernt wurde. Die resultierende latente *AbPPO4* wurde durch limitierte Proteolyse mit Proteinase K aktiviert und die aktive *AbPPO4*

durch Größenausschlusschromatographie auf einer Superdex 200 Increase Säule (*GE Healthcare*) gereinigt.

### 6.4.3 Tyrosinase Aktivitätsassay

Vor jedem Einsatz des Enzyms wurde ein Aktivitätstest mittels UV-Spektroskopie nach der Methode von DUCKWORTH und COLEMAN<sup>299</sup> durchgeführt. Die Absorption, die aus der Oxidation von Tyrosin zu Dopachinon resultiert, wird bei 280 nm über einen Zeitraum von 20 min bei 25 °C in einer 3 mL Quarzküvette bestimmt. Die Assay-Lösung besteht aus 1 mL Natriumcitratpuffer (50 mM, pH 6.8), 1 mL Tyrosin-Lösung (1 mM in Reinstwasser), 0.9 mL Reinstwasser und 0.1 mL *Ab*PPO4 Enzym-Lösung (in 50 mM Natriumcitratpuffer, pH 6.8). Unmittelbar vor Beginn der Messung wurde die Enzym-Lösung zugegeben. Die Aktivität wurde anhand der durchschnittlichen Steigung  $\Delta_{A280}$  des 3-Minuten-Intervalls mit der maximalen Steigung der Absorptionszeitkurve (Abbildung E 1) nach Gleichung 6.4.1 berechnet.

$$\text{volumetrische Enzymaktivität} \left[ \frac{\text{Units}}{\text{mL}} \right] = \frac{\Delta_{A280}[\text{min}^{-1}]}{0.0001} \quad (\text{Gl. 6.4.1})$$



**Abbildung E 1.** Typischer Absorptionsverlauf des Tyrosinase Aktivitätsassays.

#### 6.4.4 Enzymatische Unimer-Aktivierung und Polymerisation (allgemeine Arbeitsvorschrift - AAV4/AAV5)

Enzymatische Aktivierungsreaktionen wurden mit einer Substratkonzentration von 0.25  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  (aus 1.0 mM Stammlösungen) und 100 U/mL Tyrosinase in einer Natriumcitratpuffer-Lösung (17 mM, pH 6.8) bei 25 °C durchgeführt (AAV4). Die in 50 mM Natriumcitratpuffer (pH 6.8) gelöste Tyrosinase wurde vor der Zugabe zur Substratlösung mit 0.7 nmol/U Ascorbinsäure aus einer 2.1 mM Ascorbinsäurelösung in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8), als Aktivator für das Enzym, gemischt. In Polymerisationsreaktionen für GPC-, CP-AFM- und QCM-Experimente wurden 0.75  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  Substratkonzentration und 50 U/mL *AbPPO*<sub>4</sub> verwendet (AAV5).

#### 6.4.5 SDS PAGE Messungen

Proben für die Gelelektrophorese sowie die Proteinleiter wurden mit Reinstwasser auf ein Volumen von 20  $\mu\text{L}$  verdünnt und anschließend mit 5  $\mu\text{L}$  eines fünffach konzentrierten nicht-reduzierenden Protein-Ladepuffers (Pierce Lane Marker, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA) versetzt und vermischt. Die Gelkassetten wurden in die Elektrodeneinheit eingespannt und die Einheit und der Tank mit ca. 800 mL Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 35 mM SDS in Reinstwasser) gefüllt. Proben von 20  $\mu\text{L}$  wurden mit einer 10 - 100  $\mu\text{L}$  Eppendorf Research plus- Pipette in die Probentaschen des Gels geladen und der elektrophoretische Lauf wurde mit einer konstanten Spannung von 140 V durchgeführt bis der rote Farbstoff des Ladepuffers das untere Ende des Gels erreichte. Die Einfärbung der Proteine erfolgte mittels Pierce Silver Stain Kit (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA) nach dem Standardprotokoll des Herstellers.

#### 6.4.6 QCM-D-Messungen

##### Reinigung von Aluminiumoxid-beschichteten Sensoren (allgemeine Arbeitsvorschrift - AAV6)

Die mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$  beschichteten (100 nm) piezoelektrischen Sensorkristalle (QSX 309, *Biolin Scientific*, Göteborg, Schweden) wurden mit 2 % Hellmanex III-Lösung (in Reinstwasser) für 15 - 30 min und anschließend in Ethanol (absolut, >99,7 %) im Ultraschallbad für 10 min gereinigt. Im Anschluss wurden die Sensoren gründlich mit Reinstwasser gespült und unter Druckluftstrom getrocknet. Schließlich wurden die  $\text{Al}_2\text{O}_3$  beschichteten Kristalle in einem ZEPTO-Plasmareiniger (*diener electronic GmbH*, Ebhausen, Deutschland) für 3 min bei 75 W gereinigt.

##### Reinigung von Siliziumdioxid-beschichteten Sensoren (allgemeine Arbeitsvorschrift - AAV7)

Die mit SiO<sub>2</sub> beschichteten (50 nm) piezoelektrischen Sensorkristalle (QSX 303, *Biolin Scientific*, Göteborg, Schweden) wurden zunächst mit Luftplasma (3 min, 75 W, ZEPTO-Plasmareiniger, *diener electronic GmbH*) gereinigt. Anschließend wurden die Sensoren für 30 min in 2 % Hellmanex III-Lösung (in Reinstwasser) gewaschen, mit Reinstwasser gespült und unter Druckluftstrom getrocknet. Abschließend folgte eine zweite Luftplasma-Reinigung (3 min, 75 W).

### **Reinigung von Fluorpolymer-beschichteten Sensoren (allgemeine Arbeitsvorschrift - AAV8)**

Die mit Fluorpolymer beschichteten Sensorkristalle (QSX 331 AF 1600, *Biolin Scientific*, Göteborg, Schweden) wurden für 30 min in 1 % Hellmanex III-Lösung (in Reinstwasser) und im Anschluss für 2 h in Reinstwasser gereinigt. Es folgte gründliches Spülen mit Ethanol (absolut, >99,7 %) und Reinstwasser bevor die Sensoren unter Druckluftstrom getrocknet wurden.

### **Messvorgang**

Unmittelbar nach der Reinigung wurden die Sensoren in die QCM-Flusskammer eingebaut. Die für die Messungen genutzten Puffer wurden filtriert (Nylon-Spritzenfilter, 0.45 µm Porengröße, *Carl Roth GmbH*, Karlsruhe, Deutschland) und mit Unterdruck für ca. 10 min entgast. Die Experimente wurden bei 22 °C im Stop-Flow-Modus durchgeführt und die Frequenz- ( $\Delta f$ ) und Dissipationsänderung ( $\Delta D$ ) der Obertöne  $n = 3, 5, 7, 9, 11$  und  $13$  aufgenommen. Die dritten Obertöne wurden jeweils zur Auswertung der Frequenzverschiebung verwendet, aufgrund der erhöhten Signalstabilität gegenüber dem ersten Oberton. Die Einzelmessungen wurden in folgenden Schritten durchgeführt.

#### *1. Konditionierung (Flussrate 0.1 – 0.5 mL/min)*

Die Sensoroberflächen wurden mit dem jeweiligen Puffer equilibriert, bis die Frequenz- und Dissipationssignale konstant waren.

#### *2. Beschichtung (Flussrate 0.1 mL/min)*

Nachdem die Frequenz- und Dissipationssignale für mindestens 30 min konstant waren, wurde der Sensor mit Probenlösung (34.1 µM in jeweiligem Puffer) für maximal 5 h oder bis sich ein erneutes Equilibrium eingestellt hat inkubiert.

#### *3. Waschen (Flussrate 0.1 mL/min)*

Die in Schritt 2 gebildete Beschichtung wurde durch Spülen mit verschiedenen Lösungen auf Stabilität getestet. Dazu wurde zunächst wieder auf den jeweiligen Puffer umgespült. Im Anschluss wurde mit 599 mM NaCl-Lösung oder hypersaliner Lösung für 1 h gewaschen und danach wieder

auf den jeweiligen Puffer gespült. Durch den Vergleich der Frequenz- und Dissipationssignale vor und nach dem Waschen, konnte ein Rückschluss auf die Stabilität der Beschichtungen getroffen werden.

## Berechnung der Massen und Schichtdicken

### *Berechnung nach SAUERBREY-Modell*

Für die einzelnen Frequenz- und Dissipationsobertöne 3, 5, 7 und 9 im Bereich der equilibrierten Sensorbeschichtung wurden mittels QTools Software (*Biolin Scientific*, Göteborg, Schweden; Version 3.0.10.286) die Flächenmassedichten  $\Delta m$  nach SAUERBREY<sup>250</sup> bestimmt. Durch Bildung des Mittelwertes wurde die adsorbierte Masse der jeweiligen Beschichtung berechnet und die Standardabweichung wurde zur Fehlerabschätzung genutzt. Die durchschnittliche Schichtdicke wurde nach Gl. 6.4.2 über eine angenommene Dichte  $\rho$  von  $1.2 \text{ g/cm}^3$  für Proteinfilme bestimmt.

$$d = \frac{\Delta m}{\rho} = \frac{\Delta m \left[ \frac{\text{ng}}{\text{cm}^2} \right]}{120} = d \text{ [nm]} \quad (\text{Gl. 6.4.2})$$

### *Berechnung nach VOIGHT-Modell*

Bei der auf dem VOIGHT-Modell<sup>251</sup> basierten Berechnung der Filmeigenschaften wurden mittels QTools Software (*Biolin Scientific*, Göteborg, Schweden; Version 3.0.10.286) Näherungsfunktionen an die Kurven der Frequenz- und Dissipationsobertöne 3, 5, 7, 9, 11 und 13 angelegt. Bis zu 2 Obertöne wurden für die Berechnung ausgelassen, wenn die Abweichung der Näherungsfunktion zum Datensatz signifikant war. Zur Bestimmung der Näherungsfunktion wurden wie folgend einige Parameter konstant gehalten und andere initial logarithmisch angenähert (10 – 20 Stufen).

Konstante Parameter:

Lösungsmitteldichte  $\rho_{(\text{LM})} = 1.0 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Lösungsmittelviskosität  $\eta_{(\text{LM})} = 0.001 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$

Dichte der Beschichtung  $\rho_{(\text{Film})} = 1.2 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Variable Parameter:

Schermodul der Beschichtung  $\mu_{(\text{Film})} = 10 - 100\,000 \text{ MPa}$

Viskosität der Beschichtung  $\eta_{(\text{Film})} = 0.0005 - 0.01 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$

Dicke der Beschichtung  $d_{(\text{Film})} = 0.1 - 100 \text{ nm}$

Als Maß zur Bewertung der Näherungsfunktion diente das Bestimmtheitsmaß  $\chi^2$ , das für jede Berechnung ermittelt wurde. Die Parameter wurden angepasst um  $\chi^2$  zu minimieren. Im Anschluss wurde die Schichtdicke des equilibrierten Filmes bestimmt. Die Flächenmassedichte der

Beschichtungen konnte über die festgelegte Dichte des Filmes  $\rho_{(\text{Film})}$  nach Gl. 6.4.3 ermittelt werden. Zur Bestimmung des Fehlerintervalls wurde die ermittelte Schichtdicke als konstant festgelegt und ein kurzes Zeitintervall (0.5 – 2 min) im Bereich der equilibrierten Beschichtung ausgewählt. Nach erneuter Näherung der Viskosität und des Schermoduls der Beschichtung wurde die Schichtdicke variiert bis eine Verdopplung des Bestimmtheitsmaßes  $\chi^2$  erreicht wurde, das somit das Fehlerintervall definierte.

$$\Delta_{m(\text{Film})} = d_{(\text{Film})} \cdot \rho_{(\text{Film})} = d_{(\text{Film})} [\text{nm}] \cdot 120 = \Delta_{m(\text{Film})} \left[ \frac{\text{ng}}{\text{cm}^2} \right] \quad (\text{Gl. 6.4.3})$$

### 6.4.7 CP-AFM-Messungen

Die Experimente zur Bestimmung der Adhäsion von Muschel-inspirierten Polymerbeschichtungen mittels Kolloidalrastersondenmikroskopie wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. ANDREAS FERY (*Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V.*) durchgeführt. MAXIMILIAN SEUSS und INGA MELNYK übernahmen dabei die Aufgabe der CP-AFM-Messungen und MAXIMILIAN SEUSS war für die Auswertung der erhaltenen Daten verantwortlich.

#### Präparation der Silizium-Wafer Substrate (allgemeine Arbeitsvorschrift - AAV9)

Die Si-Wafer wurden vor dem Einsatz durch RCA-Reinigung ( $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ , 5:1:1 v/v) bei 80 °C für 10 min gereinigt, mit Reinstwasser gespült und im Luftstrom getrocknet. Anschließend wurden die Substrate mit  $\text{O}_2$ -Plasma bei 0.2 mbar und 100 W für 1 min gereinigt (440-G, *TePla*, Wettenberg, Deutschland).

#### Beschichtung der Substrate mit Muschel-inspiriertem Polymer

Für alle Beschichtungen wurde zunächst eine Polymerlösung von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> oder PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> nach AAV5 (Unimer-Konzentration 0.75 mM, AbPPO4-Konzentration 50 U/mL, 17 mM Na-Citratpuffer, pH 6.8) durch zehnmünütige Polymerisation hergestellt. Anschließend wurden die Substrate in die Beschichtungslösung getaucht und für jeweils 1 und 2 h beschichtet. Eine weitere Beschichtungsmethode bestand darin nach 1 h Beschichtungszeit die Ascorbat-Konzentration durch Zugabe von 1.13 M Natriumascorbatlösung auf 7.5 mmol/L zu erhöhen und für eine weitere Stunde zu beschichten. Nach Ablauf der Beschichtungszeit wurden die Substrate aus der Beschichtungslösung entnommen, mit Na-Citratpuffer (17 mM, pH 6.8) gespült und anschließend darin gelagert. Die Lagerung der beschichteten Substrate betrug maximal 4 Tage bis zur Messung.

### Beschichtung der Substrate mit Cell-Tak™

Zur Beschichtung von Si-Wafer Substraten mit Cell-Tak™ wurde eine Beschichtungslösung mit einer Proteinkonzentration von 0.5 mg/mL hergestellt. Dazu wurden zu 688.1  $\mu\text{L}$  einer Cell-Tak™-Lösung (1.09 mg/mL in 5 % Essigsäure) 100  $\mu\text{L}$  Reinstwasser, 505.5  $\mu\text{L}$  1 M NaOH und 206.4  $\mu\text{L}$  Na-Citratpuffer (17 mM, pH 6.8) hinzugegeben. Im Anschluss erfolgte die Beschichtung analog zur Prozedur mit den Muschel-inspirierten Polymeren. Nach 1 h Substratinkubation wurde 1.13 M Natriumascorbat-Lösung zugegeben, sodass eine Konzentration von 7.5 mmol/L erreicht wurde, und die Beschichtung für 1 h fortgesetzt. Es folgte das Spülen und Lagern des Substrats in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8).

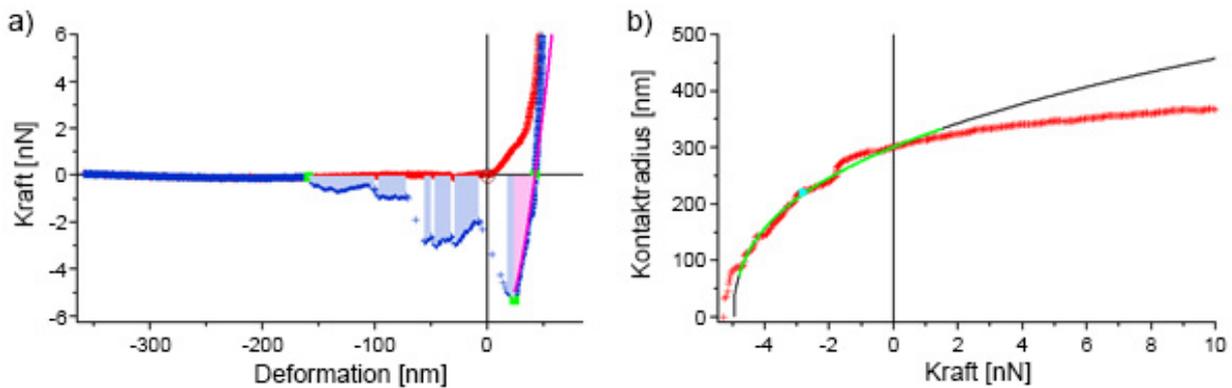
### Messvorgang

Für die Adhäsionsmessungen mittels CP-AFM wurden die Proben in eine geschlossene Flüssigkeitszelle überführt, an den Rändern mit zwei Schrauben fixiert und die Zelle vollständig mit dem jeweiligen Lagerpuffer gefüllt. Die Adhäsionsexperimente wurden mit zwei Cantilevern ohne Spitze (CSC 38, *Mikromasch Europe*, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt, die mit einer kolloidalen Siliziumdioxid-Sonde (Radius 2.4  $\mu\text{m}$ ) modifiziert waren. Vor dem Einsatz wurden die Cantilever für 1 min mit  $\text{O}_2$ -Plasma (440-G, *TePla*, Wetzlar, Deutschland) bei 0.2 mbar und 100 W behandelt, um die  $\text{SiO}_2$  Oberfläche zu aktivieren und reproduzierbare Bedingungen herzustellen. Die Kraftkalibrierung der Cantilever erfolgte mittels thermischen Rauschens (Federkonstante)<sup>300</sup> und durch Anpressen an eine nicht verformbare Oberfläche (Hebelempfindlichkeit)<sup>301</sup>. Durch manuelles Absenken des Cantilevers wurde dieser in Kontakt zur Oberfläche gebracht und die Adhäsionswechselwirkungen wurden als Kraft-Abstands-Kurven aufgezeichnet. Beginnend bei einer Anpresskraft von 2 nN wurde die Kontaktzeit zwischen 0 s und 60 s variiert und dieser Vorgang wurde bei höheren Anpresskräften (5, 10, 20, 50 nN) wiederholt. Für jede Kombination aus Anpresskraft und Kontaktzeit wurden drei Kurven aufgenommen. Diese Messungen wurden an mindestens 3 verschiedenen Stellen für jede Probe wiederholt.

### Auswertung

Zur Extraktion der adhäsiven Wechselwirkungen wurden die aufgezeichneten Kraft-Abstands-Kurven unter Berücksichtigung der Federkonstante, der Hebelempfindlichkeit und nach Abzug der Hebelauslenkung im Kontakt in quantitative Kraft-Deformations-Kurven umgewandelt.<sup>301,302</sup> Aus diesen Kurven wurde die Adhäsionskraft  $F_A$  (maximale Rückstellkraft beim Zurückziehen) ermittelt und in die flächennormierte Adhäsionsarbeit  $\gamma_{rip}$  umgewandelt, welche die Adhäsionsarbeit mehrerer

Abrissereignisse beinhaltet. Dies geschah mit einem im Arbeitskreis von Prof. Dr. ANDREAS FERY entwickelten Verfahren, das im folgenden Abschnitt beschrieben wird.



**Abbildung E 2.** Exemplarische Darstellung einer CP-AFM-Messung einer mit Muschel-inspiriertem Polymer beschichteten Probe. a) Typische Kraft-Deformations-Messung mit Annäherung (rote Datenpunkte) und Zurückziehen (blaue Datenpunkte) des Cantilevers. Die grünen Punkte markieren adhäsionsrelevante Punkte; Rechts: Nullkraft im Prozess des Zurückziehens, ab welcher Stelle die Adhäsionskräfte dominieren; Mitte: maximale Rückstellkraft, die auch als Adhäsionskraft  $F_A$  bezeichnet wird; Links: Kontaktverlust von der kolloidalen Sonde mit der Oberfläche. Die blauen Flächen stellen den Bereich dar, bei dem die kolloidale Sonde im stabilen adhäsiven Kontakt mit der Oberfläche steht. b) Transformierte Darstellung der Daten des Rückzugsprozesses der Kraft-Deformations-Kurve als berechneter Kontaktradius in Abhängigkeit der gemessenen Anpresskraft (rot). Die grüne Kurve stellt den Fit-Bereich der Gl. 6.4.5, und die schwarze Kurve Gl. 6.4.5 über den gesamten Kraftbereich dar.

Die Quantifizierung der adhäsiven Wechselwirkungen zweier Oberflächen wird bei der Kolloidalrastersondenmikroskopie durch den Ablösungsprozess der Sonde von der Oberfläche bewerkstelligt. Dies ist in Abbildung E 2 exemplarisch aufgezeigt. Aus dieser Messung können die Größen der Adhäsionskraft  $F_A$  und die Adhäsionsarbeit  $W$  direkt entnommen werden. Diese sind jedoch nicht direkt mit anderen Experimenten vergleichbar, da sie stark von Messparametern wie der Geometrie der Sonde und Probe sowie der Anpresskraft und Eindringtiefe der Sonde abhängen. Daher wird zur Vergleichbarkeit eine Kontaktfläche definiert, die zur Normierung der Adhäsionsarbeit  $W$  dient. Da eine experimentelle Bestimmung der Kontaktfläche in der Kolloidalrastersondenmikroskopie Schwierigkeiten aufweist, können etablierte Kontaktmechanik-Theorien wie das JOHNSON-KENDALL-ROBERTS-Modell (JKR)<sup>303</sup>, das DERJAGUIN-MULLER-TOPOROV-Modell (DMT)<sup>304</sup> oder das MAUGIS-DUGDALE-Modell (MD)<sup>260</sup> zur Berechnung der normalisierten Adhäsionsarbeit  $\gamma$  genutzt werden. Im JKR- und DMT-Modell ist die Adhäsionsarbeit pro Flächeneinheit  $\gamma$  gegeben durch:

$$\gamma_{JKR} = \frac{2F_A}{3\pi R_{eff}}; \quad \gamma_{DMT} = \frac{F_A}{2\pi R_{eff}}; \quad \frac{1}{R_{eff}} = \frac{1}{R_{Sonde}} + \frac{1}{R_{Probe}} \quad (\text{Gl. 6.4.4})$$

Die beiden Modelle unterscheiden sich in der Wirkungsweise der Adhäsion, denn bei JKR wirkt die Adhäsion ausschließlich innerhalb der Kontaktfläche, während bei DMT die Adhäsionskräfte

außerhalb, aber nahe der Kontaktfläche eine Rolle spielen. Im MD Modell werden diese beiden Extremfälle zu einem universellen Modell vereint, in dem auch Kontaktszenarien berücksichtigt werden, die zwischen JKR und DMT liegen. Die Anwendung des MD Modells ist praktisch jedoch eingeschränkt, da die Lösung des rein analytischen Modells für die experimentellen Daten eine sehr komplexe Aufgabe darstellt. Daher wurde hier für die Auswertung eine Näherungsmethode des MD Modells genutzt, die von CARPICK, OGLETREE und SALMERON entwickelt wurde.<sup>261</sup> Bei dieser ist der Zusammenhang des Kontaktradius  $a$ , des Kontaktradius bei Nullkraft  $a_0$ , der Anpresskraft  $F$  und der Adhäsionskraft  $F_A$  durch die allgemeine Übergangsgleichung gegeben:

$$a = \left( \frac{\alpha + \sqrt{1 - F/F_A}}{1 + \alpha} \right)^{2/3} \cdot a_0 - \left( \frac{\alpha}{1 + \alpha} \right)^{2/3} \cdot a_0 \quad (\text{Gl. 6.4.5})$$

Der Übergangsparameter  $\alpha$  gibt dabei den Übergang vom DMT Modell ( $\alpha = 0$ ) zum JKR Modell ( $\alpha = 1$ ) an. Zum Fit der Gl. 6.4.5 wird der Kontaktradius  $a$  in Abhängigkeit der Anpresskraft  $F$  benötigt, der durch Transformation der Kraft-Deformations-Kurve mittels Gl. 6.4.6 angenähert werden kann (siehe Abbildung E 2b)

$$a = \left( R_{probe}^2 - (R_{probe} - \delta)^2 \right)^{0.5} \quad (\text{Gl. 6.4.6})$$

Dabei liegt die geometrische Betrachtung einer Kugel, die auf einen flachen Polymerfilm drückt und diesen um  $\delta$  deformiert, zu Grunde. Der Fit von Gl. 6.4.5 ermöglicht die Extraktion der Parameter  $a_0$ ,  $F_A$  und  $\alpha$  einzeln für jede durchgeführte Messung. Mit der Näherung von CARPICK *et al.* kann der Übergangsparameter  $\alpha$  in den Maugis Parameter  $\lambda$  überführt werden:

$$\lambda = -0.924 \cdot \ln(1 - 1.02 \alpha) \quad (\text{Gl. 6.4.7})$$

Auf Basis des berechneten Maugis Parameters  $\lambda$ , der extrahierten Parameter  $a_0$  und  $F_A$  sowie des Radius der Sonde  $R_{Sonde}$  kann durch Umstellung der Gl. 6.4.8 die Adhäsionsarbeit pro Flächeneinheit  $\gamma_{MD}$  bestimmt werden.

$$-\frac{7}{4} + \frac{1}{4} \cdot \left( \frac{4.04 \cdot \lambda^{1.4} - 1}{4.04 \cdot \lambda^{1.4} + 1} \right) = \frac{F_A}{\pi \cdot \gamma_{MD} \cdot R_{Sonde}} \quad (\text{Gl. 6.4.8})$$

Die hiermit berechnete flächennormierte Adhäsionsarbeit basiert auf der Annahme eines einzigen Abrissereignisses beim Zurückziehen der Sonde. Wie Abbildung E 2a entnommen werden kann, wurden bei den erhaltenen Adhäsionsmessungen jedoch mehrfache Abrissereignisse beobachtet bis es zu einem vollständigen Kontaktverlust von Sonde und Polymerbeschichtung kam. Das Verfahren

wurde daher erweitert, um eine Repräsentation der Adhäsionsenergie zu erhalten, die den experimentellen Beobachtungen entspricht.

Generell lässt sich die Adhäsionsarbeit pro Flächeneinheit  $\gamma$  durch das Verhältnis von geleisteter Arbeit  $W$  und der Kontaktfläche  $A$  beschreiben.  $W$  ist aus den AFM-Messungen über die von der Kraft-Deformations-Kurve und der x-Achse begrenzten Fläche bei negativen Kräften direkt zugänglich. Die Kontaktfläche ist jedoch nicht direkt bestimmbar. Daher wurde diese aus dem Fit der allgemeinen Übergangsgleichung (Gl. 6.4.5) aus dem MD Modell extrahiert, indem die Kontaktradius-Kraft-Kurve des Fits durch Lösen der Gl. 6.4.6 nach  $\delta$  in eine Kraft-Deformierungs-Kurve transformiert wurde (pinke Kurve in Abbildung E 2a). Aus dieser Darstellung ist die Arbeit des Fits aus dem MD Modell  $W_{fit}$  (pinke Fläche in Abbildung E 2a) direkt zugänglich. Da  $\gamma_{MD}$  aus der Näherung von CARPICK *et al.* bekannt ist, kann die Kontaktfläche  $A_{fit}$  wie folgt berechnet werden:

$$A_{fit} = \frac{W_{fit}}{\gamma_{MD}} \quad (\text{Gl. 6.4.9})$$

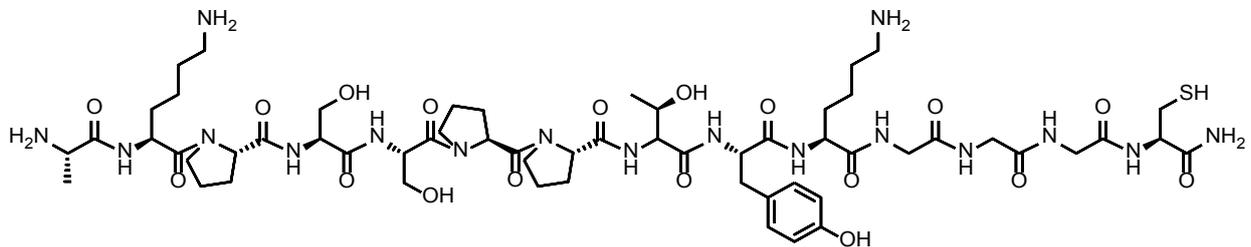
Bei sequenziellen Abrissereignissen entspricht die Gesamtarbeit  $W_{rip}$  der Summe aller geleisteter Arbeit in stabilem adhäsiven Kontakt zwischen Sonde und Probe (blau schattierte Flächen in Abbildung E 2a). Diese wirkt theoretisch auf die gleiche Kontaktfläche ( $A_{fit}$ ), womit sich letztendlich die gesamte Adhäsionsarbeit pro Einheitsfläche für sequenzielle Abrissereignisse  $\gamma_{rip}$  durch folgenden Zusammenhang berechnen lässt:

$$\gamma_{rip} = \frac{W_{rip}}{A_{fit}} \quad (\text{Gl. 6.4.10})$$

Alle experimentell aufgezeichneten Daten wurden mit diesem Verfahren ausgewertet und sind in Abschnitt 6.6.13 dargestellt. Nur bestimmte Einzelmessungen wurden ausgeschlossen, wenn experimentelle Fehler auftraten oder das Auswertungsmodell nicht angewendet werden konnte.

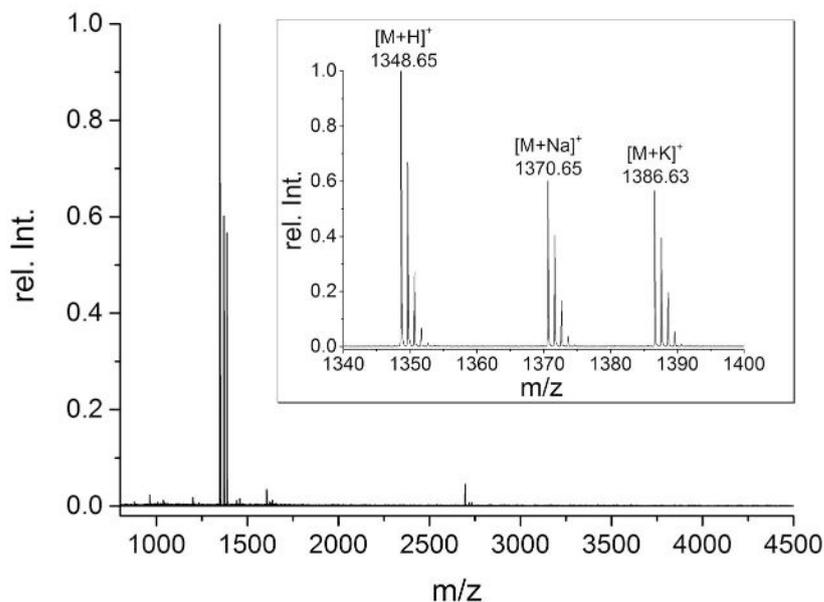
## 6.5 Synthesen und Charakterisierung

### 6.5.1 U<sub>1</sub><sup>C</sup> – AKPSSPPTYKGGGC



Die Peptidsynthese erfolgte nach **AAV1** in einem Synthesemaßstab von 0.1 mmol unter Nutzung von TentaGel S RAM Syntheseharz (Beladung 0.23 mmol/g). Das geschützte Peptid wurde der **AAV3** entsprechend freigesetzt und mittels präparativer HPLC (Laufmittelgradient 5-30 % B in 30 min, Synergi Fusion-RP Trennsäule) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 42 % erhalten.

#### MALDI-TOF-MS

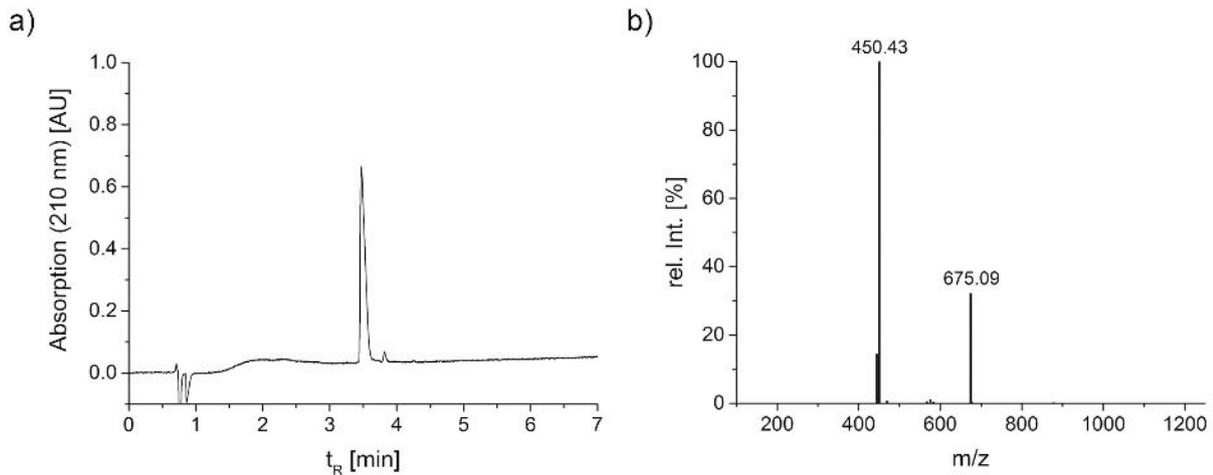


**Abbildung E 3.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von AKPSSPPTYKGGGC (U<sub>1</sub><sup>C</sup>).

Berechnet: m/z 1348.67 [M+H]<sup>+</sup>, 1370.65 [M+Na]<sup>+</sup>, 1386.62 [M+K]<sup>+</sup>.

Gemessen: m/z 1348.65 [M+H]<sup>+</sup>, 1370.65 [M+Na]<sup>+</sup>, 1386.63 [M+K]<sup>+</sup>.

## UPLC-UV/VIS-QMS



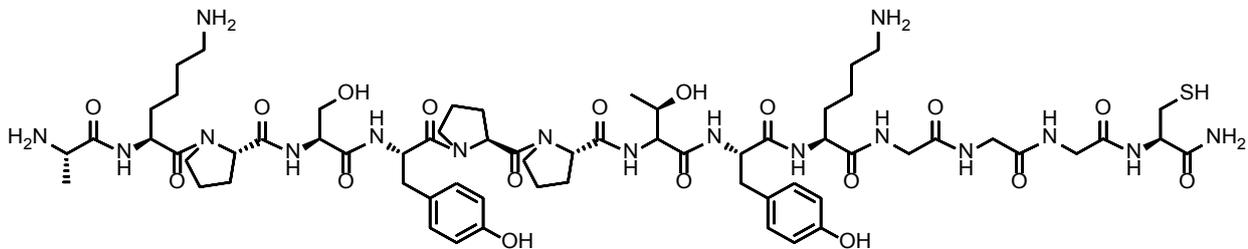
**Abbildung E 4.** UPLC-ESI-MS-Analyse von AKPSSPPTYKGGGC (U<sub>1</sub><sup>C</sup>). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 5-23 % B (7 min).

UV/VIS (210 nm): t<sub>R</sub> = 3.47 min, 97.5 % Reinheit.

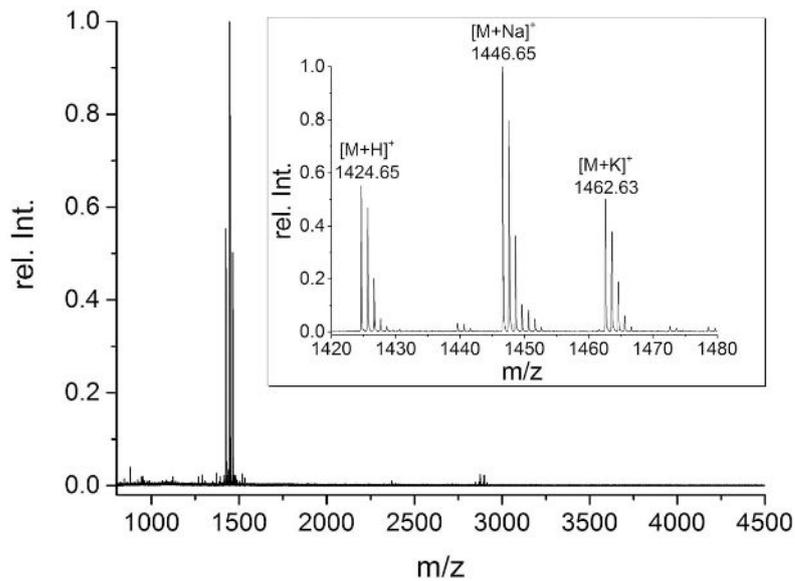
ESI-QMS: berechnet: m/z 675.28 [M+2H]<sup>2+</sup>, 450.52 [M+3H]<sup>3+</sup>; gemessen m/z 675.09 [M+2H]<sup>2+</sup>, 450.43 [M+3H]<sup>3+</sup>.

### 6.5.2 U<sub>2</sub><sup>C</sup> – AKPSYPPTYKGGGC



Die Peptidsynthese erfolgte nach **AAV1** in einem Synthesemaßstab von 0.1 mmol unter Nutzung von TentaGel S RAM Syntheseharz (Beladung 0.23 mmol/g). Das geschützte Peptid wurde der **AAV3** entsprechend freigesetzt und mittels präparativer HPLC (Laufmittelgradient 5-40 % B in 30 min, Synergi Fusion-RP Trennsäule) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 25 % erhalten.

## MALDI-TOF-MS



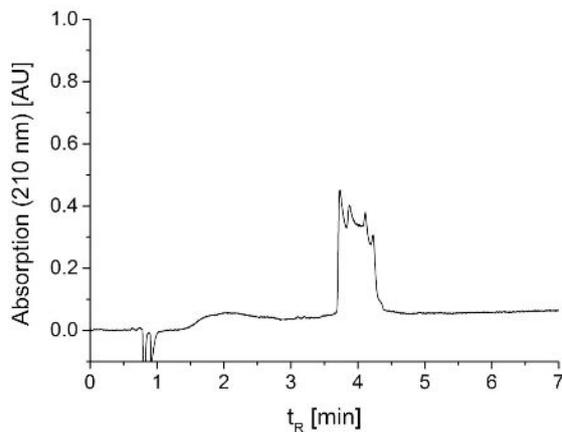
**Abbildung E 5.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von AKPSYPPTYKGGGC ( $U_2^C$ ).

Berechnet:  $m/z$  1424.70  $[M+H]^+$ , 1446.68  $[M+Na]^+$ , 1462.65  $[M+K]^+$ .

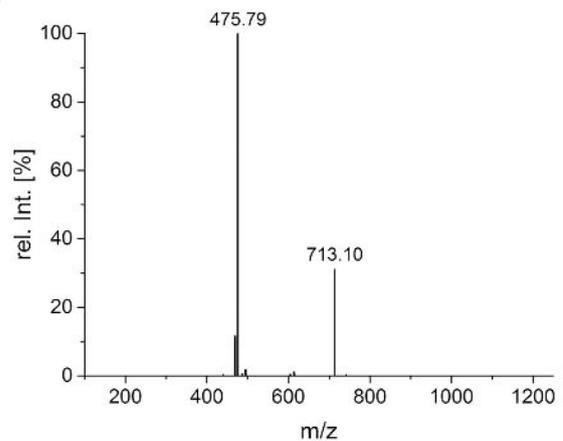
Gemessen:  $m/z$  1424.65  $[M+H]^+$ , 1446.65  $[M+Na]^+$ , 1462.63  $[M+K]^+$ .

## UPLC-UV/VIS-QMS

a)



b)

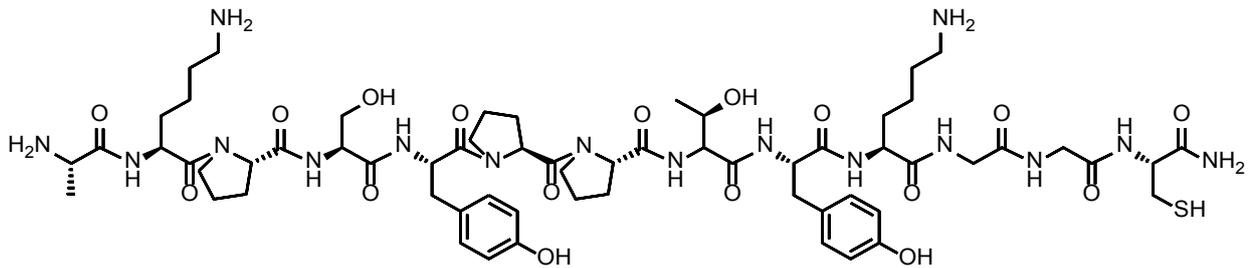


**Abbildung E 6.** UPLC-ESI-MS-Analyse von AKPSYPPTYKGGGC ( $U_2^C$ ). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 5-30 % B (7 min).

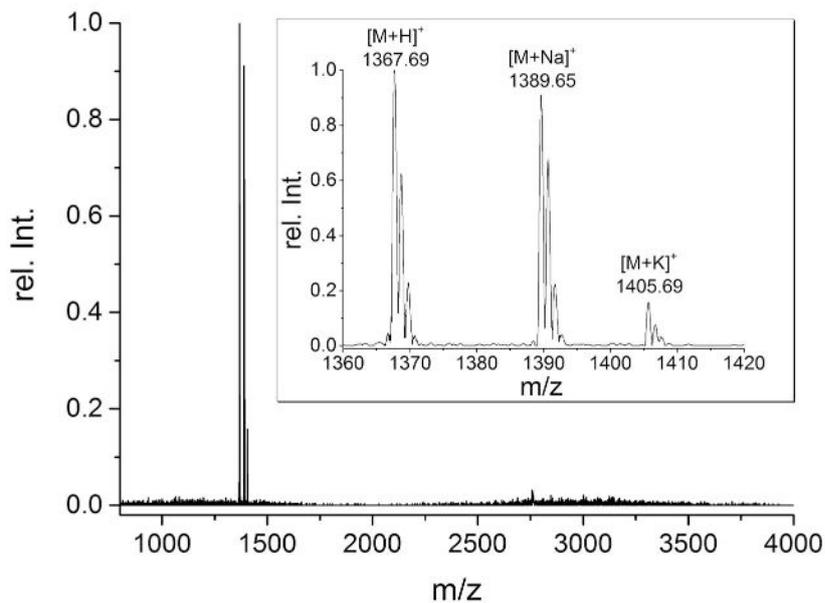
UV/VIS (210 nm):  $t_R = 3.69 - 4.38$  min, 99.9 % Reinheit.

ESI-QMS: berechnet:  $m/z$  713.33  $[M+2H]^{2+}$ , 475.89  $[M+3H]^{3+}$ ; gemessen:  $m/z$  713.10  $[M+2H]^{2+}$ , 475.79  $[M+3H]^{3+}$ .

6.5.3 U<sub>G2</sub><sup>C</sup> – AKPSYPPTYKGGC

Die Peptidsynthese erfolgte nach **AAV1** in einem Synthesemaßstab von 0.1 mmol unter Nutzung von TentaGel S RAM Syntheseharz (Beladung 0.23 mmol/g). Das geschützte Peptid wurde der **AAV3** entsprechend freigesetzt und mittels präparativer HPLC (Laufmittelgradient 5-40 % B in 30 min, Synergi Fusion-RP Trennsäule) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 36 % erhalten.

## MALDI-TOF-MS

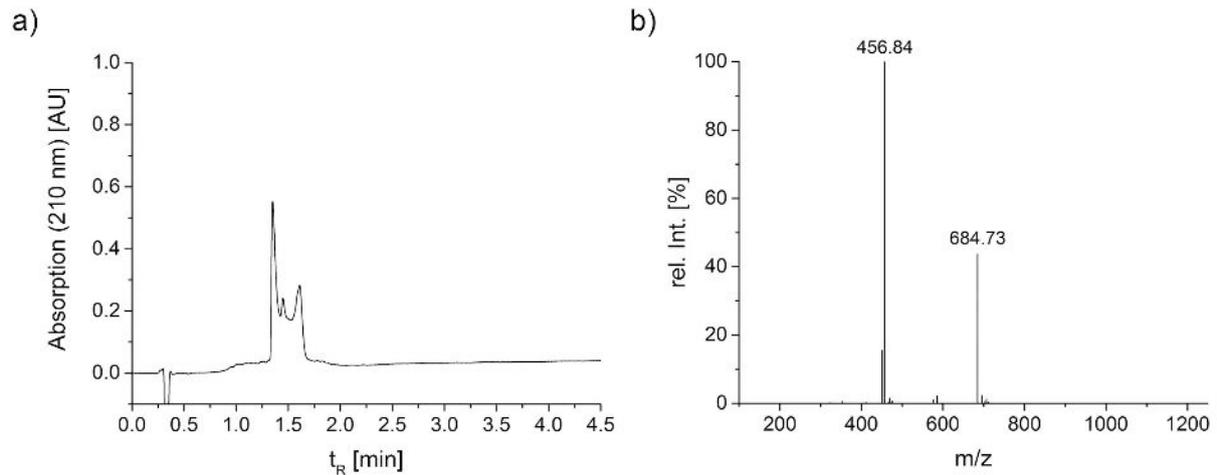


**Abbildung E 7.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von AKPSYPPTYKGGC (U<sub>G2</sub><sup>C</sup>).

Berechnet: m/z 1367.68 [M+H]<sup>+</sup>, 1389.66 [M+Na]<sup>+</sup>, 1405.63 [M+K]<sup>+</sup>.

Gemessen: m/z 1367.69 [M+H]<sup>+</sup>, 1389.65 [M+Na]<sup>+</sup>, 1405.69 [M+K]<sup>+</sup>.

## UPLC-UV/VIS-QMS



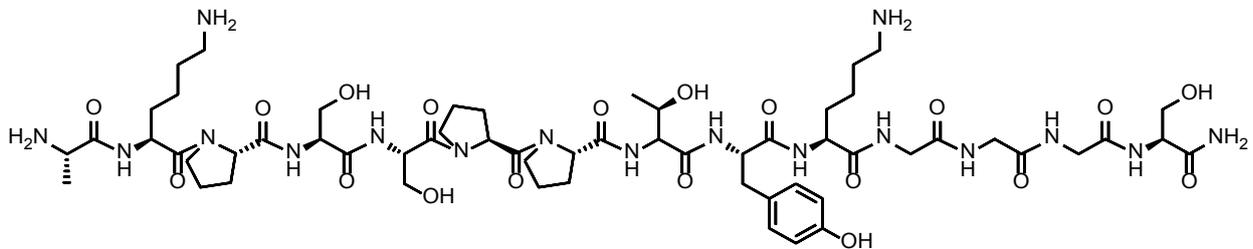
**Abbildung E 8.** UPLC-ESI-MS-Analyse von AKPSYPPTYKGGC ( $U_{62}^C$ ). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 5-35 % B (4.5 min).

UV/VIS (210 nm):  $t_R = 1.35 - 1.78$  min, 98.5 % Reinheit.

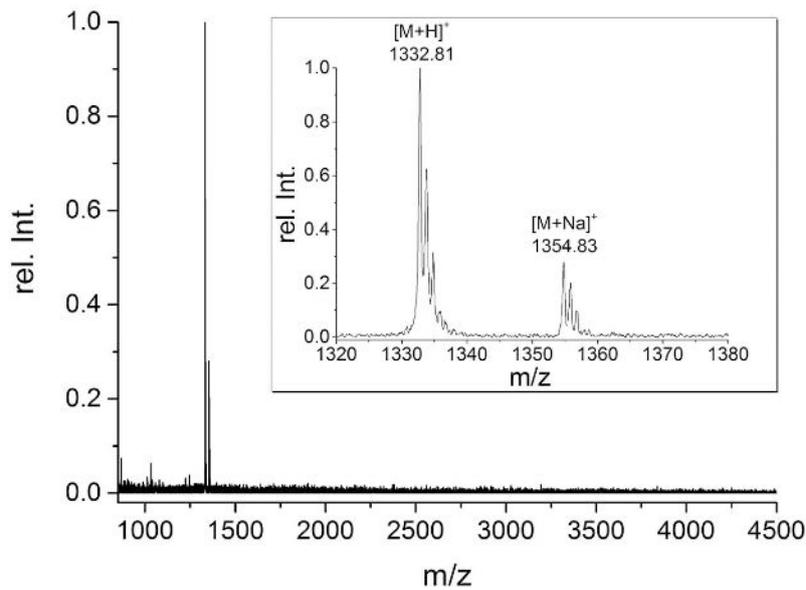
ESI-QMS: berechnet:  $m/z$  684.80  $[M+2H]^{2+}$ , 456,87  $[M+3H]^{3+}$ ; gemessen:  $m/z$  684.73  $[M+2H]^{2+}$ , 456.84  $[M+3H]^{3+}$ .

#### 6.5.4 $U_1^S$ – AKPSSPPTYKGGGS



Die Peptidsynthese erfolgte nach **AAV1** in einem Synthesemaßstab von 0.1 mmol unter Nutzung von TentaGel S RAM Syntheseharz (Beladung 0.23 mmol/g). Das geschützte Peptid wurde der **AAV3** entsprechend freigesetzt und mittels präparativer HPLC (Laufmittelgradient 5-30 % B in 30 min, Synergi Fusion-RP Trennsäule) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 43 % erhalten.

## MALDI-TOF-MS



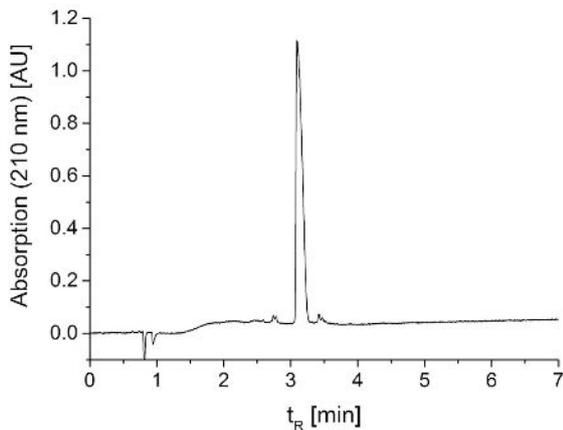
**Abbildung E 9.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von AKPSSPPTYKGGGS ( $U_1^5$ ).

Berechnet:  $m/z$  1332.69  $[M+H]^+$ , 1354.67  $[M+Na]^+$ .

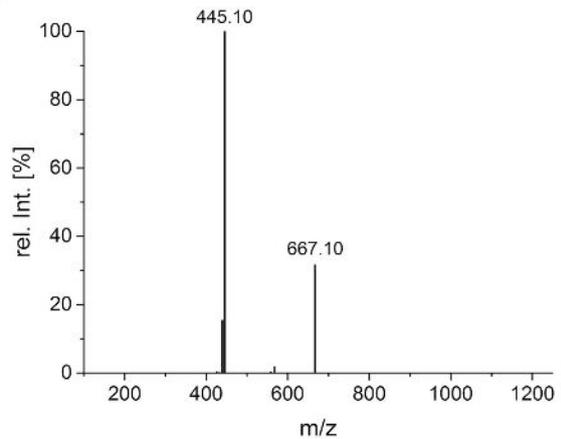
Gemessen:  $m/z$  1332.81  $[M+H]^+$ , 1354.83  $[M+Na]^+$ .

## UPLC-UV/VIS-QMS

a)



b)

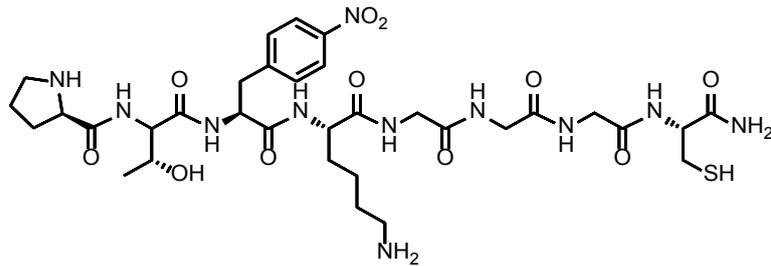


**Abbildung E 10.** UPLC-ESI-MS-Analyse von AKPSSPPTYKGGGS ( $U_1^5$ ). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 5-23 % B (7 min).

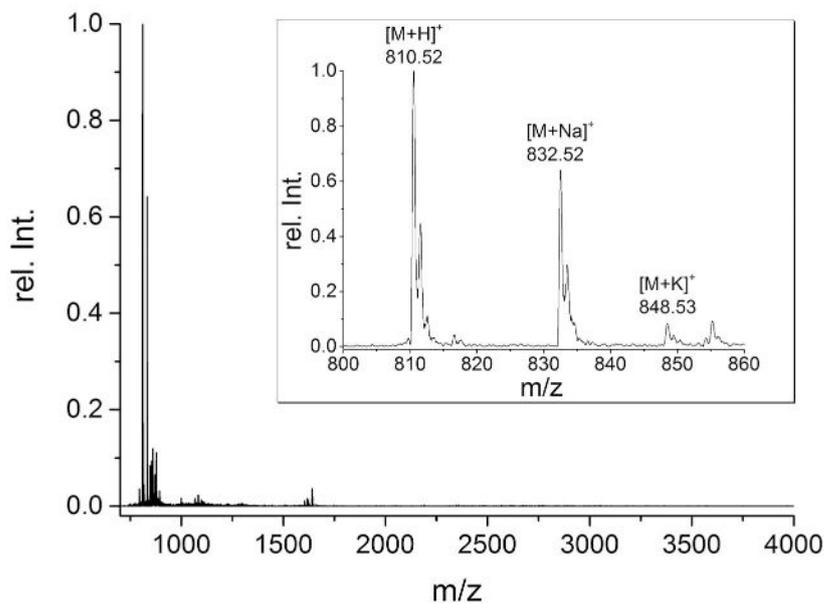
UV/VIS (210 nm):  $t_R = 3.10$  min, 97.4 % Reinheit.

ESI-QMS: berechnet:  $m/z$  667.25  $[M+2H]^{2+}$ , 445.18  $[M+3H]^{3+}$ ; gemessen:  $m/z$  667.10  $[M+2H]^{2+}$ , 445.10  $[M+3H]^{3+}$ .

6.5.5 U<sub>1N</sub><sup>C</sup> – PTF<sup>NO<sub>2</sub></sup>KGGGC

Die Peptidsynthese erfolgte nach **AAV1** in einem Synthesemaßstab von 0.05 mmol unter Nutzung von TentaGel S RAM Synthescharz (Beladung 0.23 mmol/g). Zur Einführung der Nitrogruppe wurde Fmoc-geschütztes 4-Nitrophenylalanin für die Festphasensynthese eingesetzt. Das geschützte Peptid wurde der **AAV3** entsprechend freigesetzt und mittels präparativer HPLC (Laufmittelgradient 5-30 % B in 30 min, Synergi Fusion-RP Trennsäule) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 64 % erhalten.

## MALDI-TOF-MS



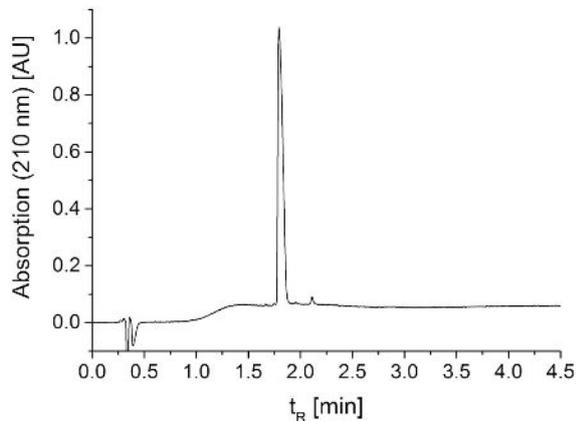
**Abbildung E 11.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von PTF(4-NO<sub>2</sub>)KGGGC (U<sub>1N</sub><sup>C</sup>).

Berechnet: m/z 810.36 [M+H]<sup>+</sup>, 832.34 [M+Na]<sup>+</sup>, 848.31 [M+K]<sup>+</sup>.

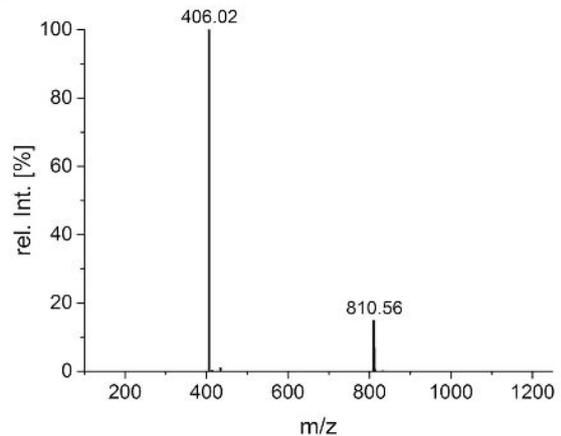
Gemessen: m/z 810.52 [M+H]<sup>+</sup>, 832.52 [M+Na]<sup>+</sup>, 848.53 [M+K]<sup>+</sup>.

## UPLC-UV/VIS-QMS

a)



b)

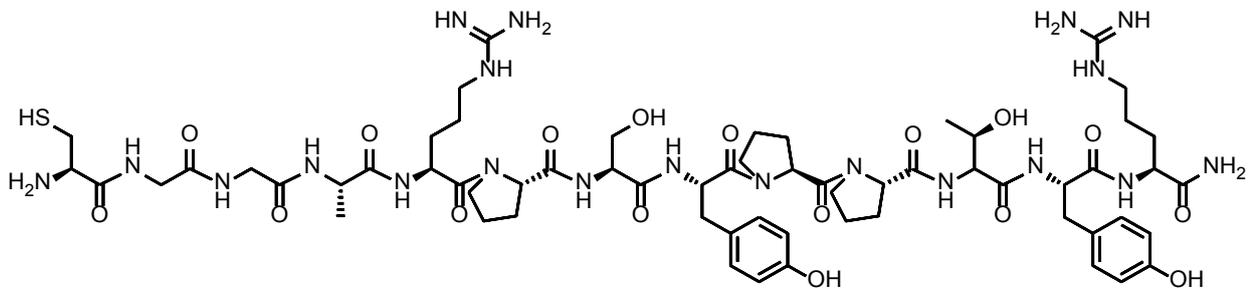


**Abbildung E 12.** UPLC-ESI-MS-Analyse von PTF(4-NO<sub>2</sub>)KGGGC (U<sub>1N</sub><sup>C</sup>). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 3-25 % B (4.5 min).

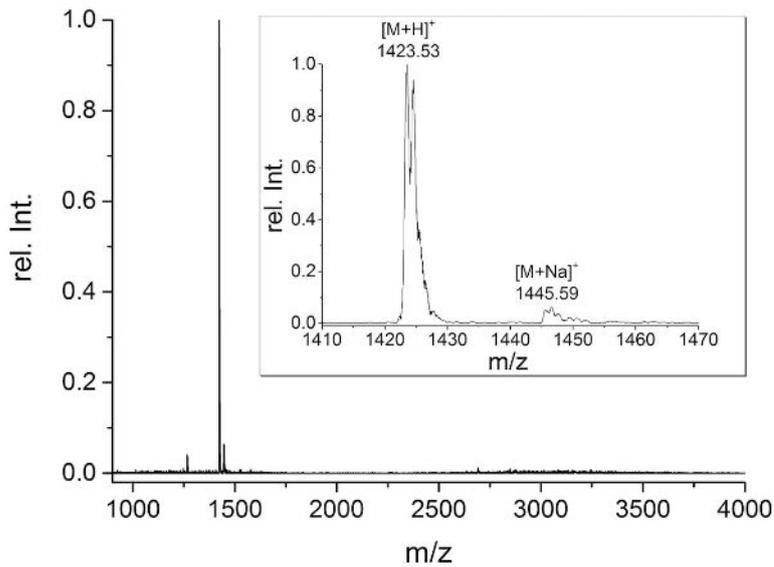
UV/VIS (210 nm):  $t_R = 1.80$  min, 98.8 % Reinheit.

ESI-QMS: berechnet:  $m/z$  810.91 [M+H]<sup>+</sup>, [405.96M+2H]<sup>2+</sup>; gemessen:  $m/z$  810.56 [M+H]<sup>+</sup>, 406.02 [M+2H]<sup>2+</sup>.

6.5.6 U<sub>R2</sub><sup>N</sup> – CGGARPSYPPTYR

Die Peptidsynthese erfolgte nach **AAV1** in einem Synthesemaßstab von 0.1 mmol unter Nutzung von TentaGel S RAM Syntheseharz (Beladung 0.23 mmol/g). Das geschützte Peptid wurde der **AAV3** entsprechend freigesetzt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 60 % erhalten.

## MALDI-TOF-MS



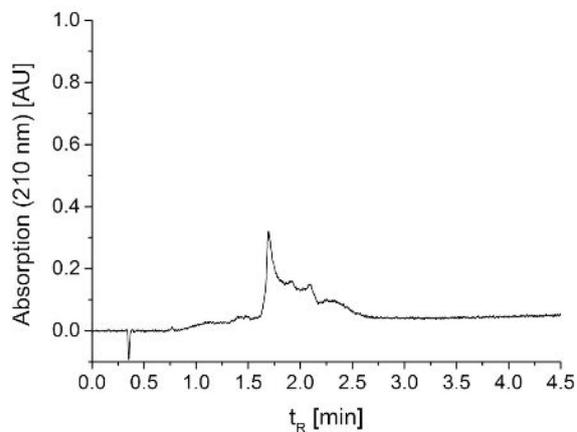
**Abbildung E 13.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von CGGARPSYPPTYR ( $U_{R2}^N$ ).

Berechnet:  $m/z$  1423.69  $[M+H]^+$ , 1445.67  $[M+Na]^+$ .

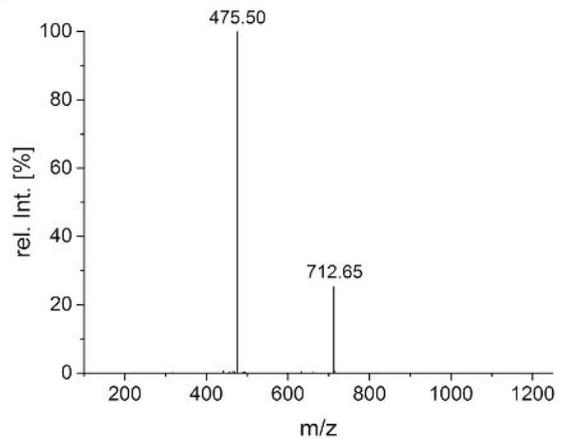
Gemessen:  $m/z$  1423.53  $[M+H]^+$ , 1445.59  $[M+Na]^+$ .

## UPLC-UV/VIS-QMS

a)



b)

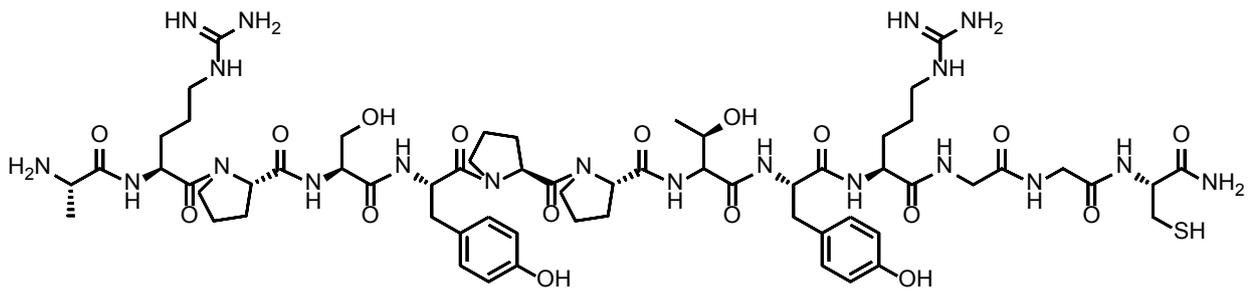


**Abbildung E 14.** UPLC-ESI-MS-Analyse von CGGARPSYPPTYR ( $U_{R2}^N$ ). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 5-35 % B (4.5 min).

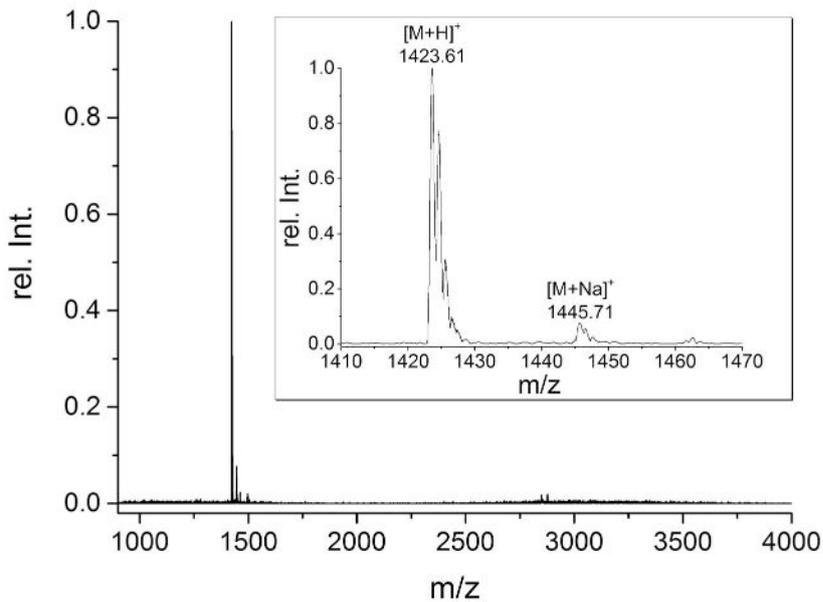
UV/VIS (210 nm):  $t_R = 1.69 - 2.51$  min, 88.4 % Reinheit.

ESI-QMS: berechnet:  $m/z$  712.82  $[M+2H]^2+$ , 475.55  $[M+3H]^3+$ ; gemessen:  $m/z$  712.65  $[M+2H]^2+$ , 475.50  $[M+3H]^3+$ .

6.5.7  $U_{R2}^C$  – ARPSYPPTYRGGC

Die Peptidsynthese erfolgte nach **AAV1** in einem Synthesemaßstab von 0.1 mmol unter Nutzung von TentaGel S RAM Syntheseharz (Beladung 0.23 mmol/g). Das geschützte Peptid wurde der **AAV3** entsprechend freigesetzt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 51 % erhalten.

## MALDI-TOF-MS

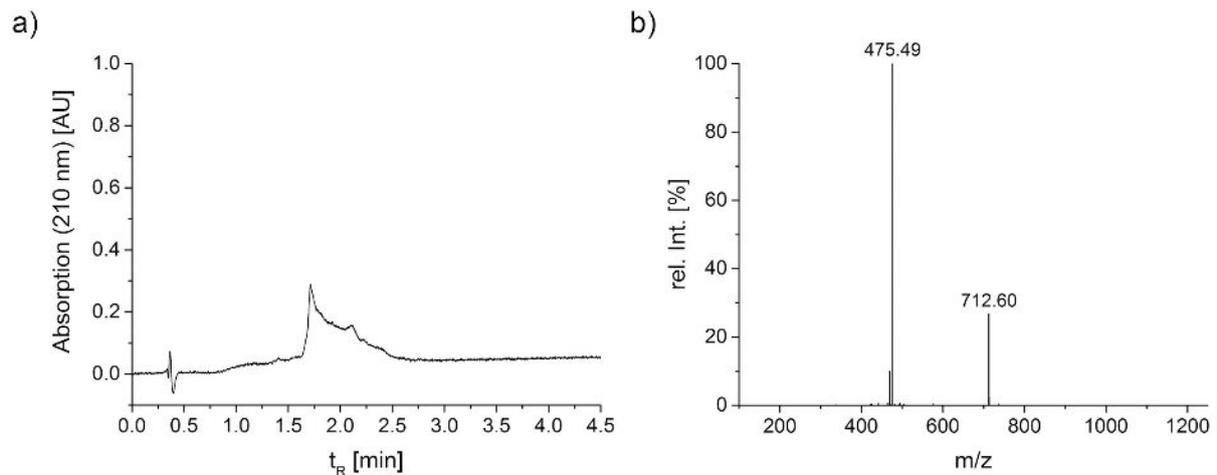


**Abbildung E 15.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von ARPSYPPTYRGGC ( $U_{R2}^C$ ).

Berechnet: m/z 1423.69  $[M+H]^+$ , 1445.67  $[M+Na]^+$ .

Gemessen: m/z 1423.61  $[M+H]^+$ , 1445.71  $[M+Na]^+$ .

## UPLC-UV/VIS-QMS



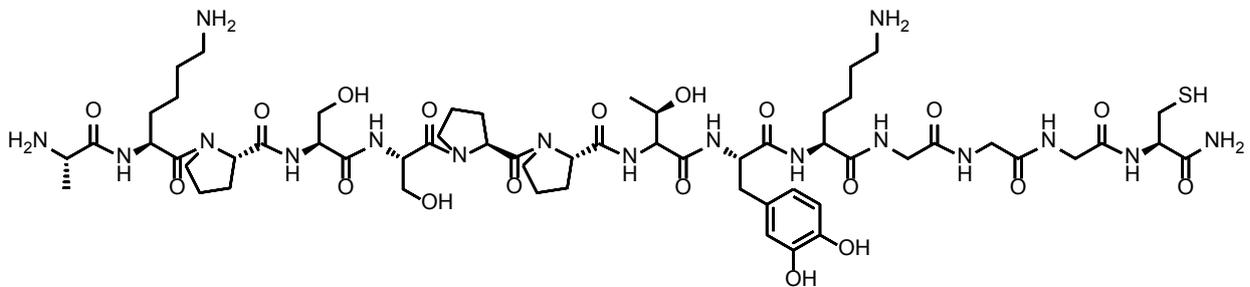
**Abbildung E 16.** UPLC-ESI-MS-Analyse von ARPSYPPTYRGGC ( $U_{R2}^C$ ). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 5-35 % B (4.5 min).

UV/VIS (210 nm):  $t_R = 1.41 - 2.41$  min, 95.8 % Reinheit.

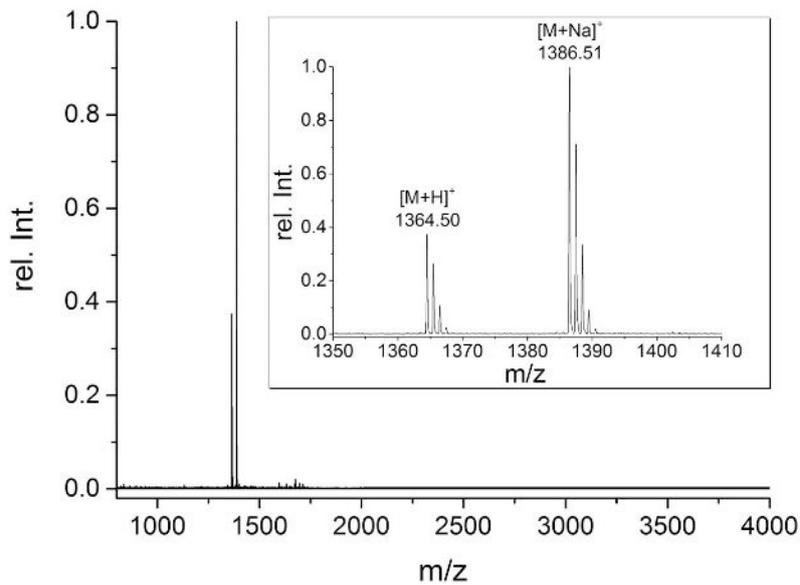
ESI-QMS: berechnet:  $m/z$  712.82  $[M+2H]^{2+}$ , 475.55  $[M+3H]^{3+}$ ; gemessen:  $m/z$  712.60  $[M+2H]^{2+}$ , 475.49  $[M+3H]^{3+}$ .

### 6.5.8 $U_{1+}^C$ – AKPSSPPTY\*KGGGC



Die Peptidsynthese erfolgte nach **AAV1** in einem Synthesemaßstab von 0.05 mmol unter Nutzung von TentaGel S RAM Syntheseharz (Beladung 0.23 mmol/g). Um Dopa in das Peptid einzuführen, wurde Fmoc-Dopa(Acetonid)-OH in fünffachem Überschuss bei der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt. Das geschützte Peptid wurde der **AAV3** entsprechend freigesetzt und mittels präparativer HPLC (Laufmittelgradient 5-20 % B in 30 min, Synergi Fusion-RP Trennsäule) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 51 % erhalten.

## MALDI-TOF-MS



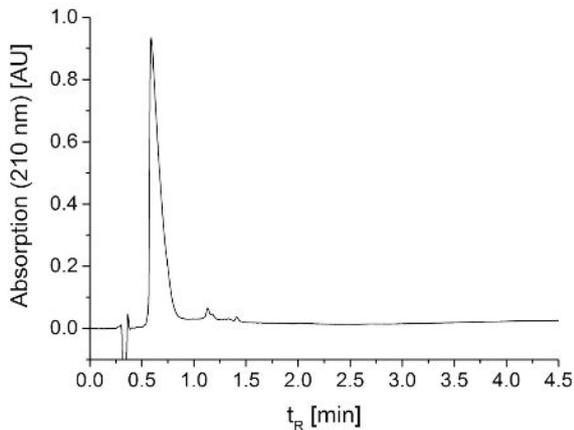
**Abbildung E 17.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von AKPSSPPTY\*KGGGC ( $U_1^{+c}$ ).

Berechnet:  $m/z$  1364.66  $[M+H]^+$ , 1386.64  $[M+Na]^+$ .

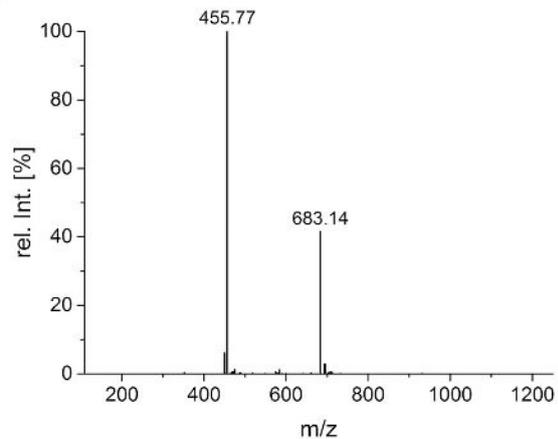
Gemessen:  $m/z$  1364.50  $[M+H]^+$ , 1386.51  $[M+Na]^+$ .

## UPLC-UV/VIS-QMS

a)



b)

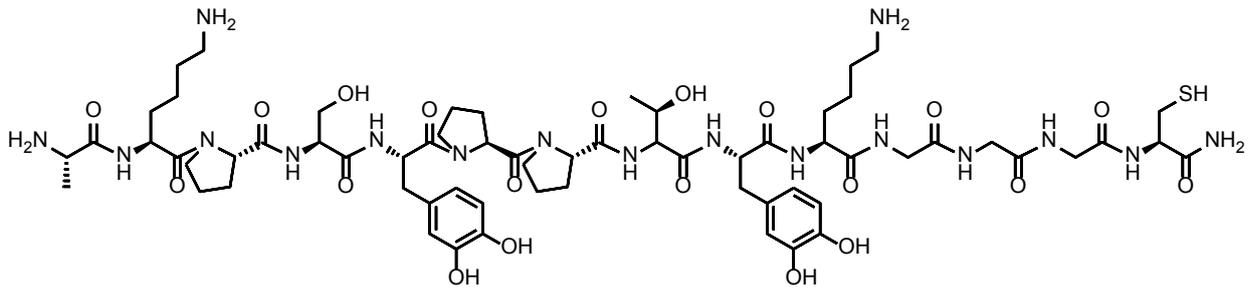


**Abbildung E 18.** UPLC-ESI-MS-Analyse von AKPSSPPTY\*KGGGC ( $U_1^{+c}$ ). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 5-20 % B (4.5 min).

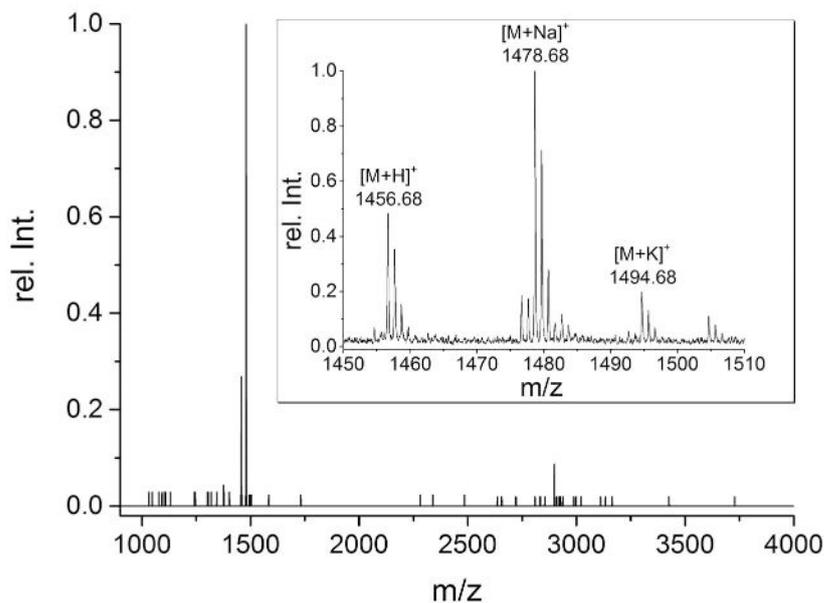
UV/VIS (210 nm):  $t_R = 0.59$  min, 96.9 % Reinheit.

ESI-QMS: berechnet:  $m/z$  683.28  $[M+2H]^{2+}$ , 455.86  $[M+3H]^{3+}$ ; gemessen:  $m/z$  683.14  $[M+2H]^{2+}$ , 455.77  $[M+3H]^{3+}$ .

6.5.9 U<sub>2</sub><sup>C</sup> – AKPSY\*PPTY\*KGGGC

Die Peptidsynthese erfolgte nach **AAV1** in einem Synthesemaßstab von 0.025 mmol unter Nutzung von TentaGel S RAM Syntheseharz (Beladung 0.23 mmol/g). Um Dopa in das Peptid einzuführen, wurde Fmoc-Dopa(Acetonid)-OH bei der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt. Das geschützte Peptid wurde der **AAV3** entsprechend freigesetzt und mittels präparativer HPLC (Laufmittelgradient 5-30 % B in 30 min, Synergi Fusion-RP Trennsäule) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 26 % erhalten.

## MALDI-TOF-MS

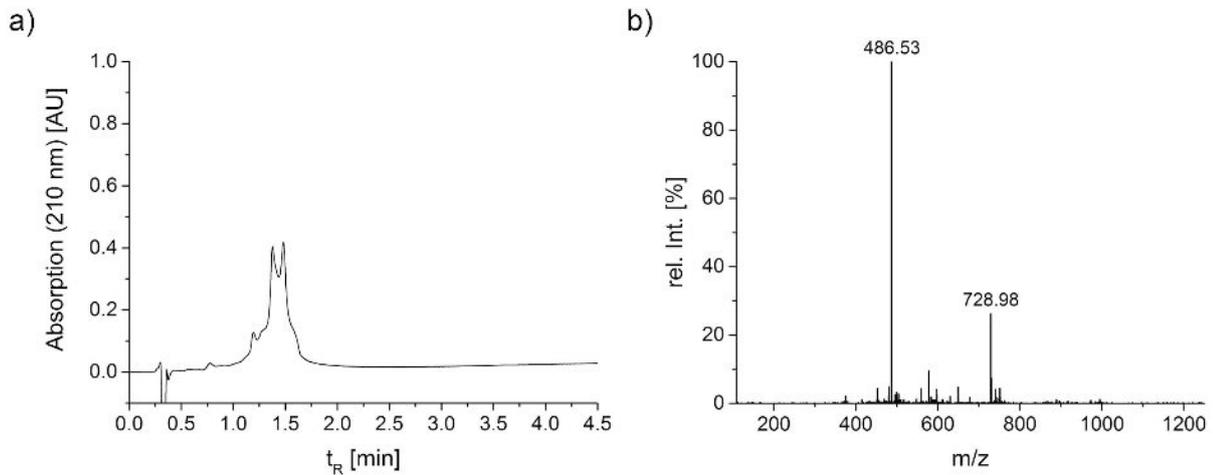


**Abbildung E 19.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von AKPSY\*PPTY\*KGGGC (U<sub>2</sub><sup>C</sup>).

Berechnet: m/z 1456.69 [M+H]<sup>+</sup>, 1478.67 [M+Na]<sup>+</sup>, 1494.64 [M+K]<sup>+</sup>.

Gemessen: m/z 1456.68 [M+H]<sup>+</sup>, 1478.68 [M+Na]<sup>+</sup>, 1494.68 [M+K]<sup>+</sup>.

## UPLC-UV/VIS-QMS

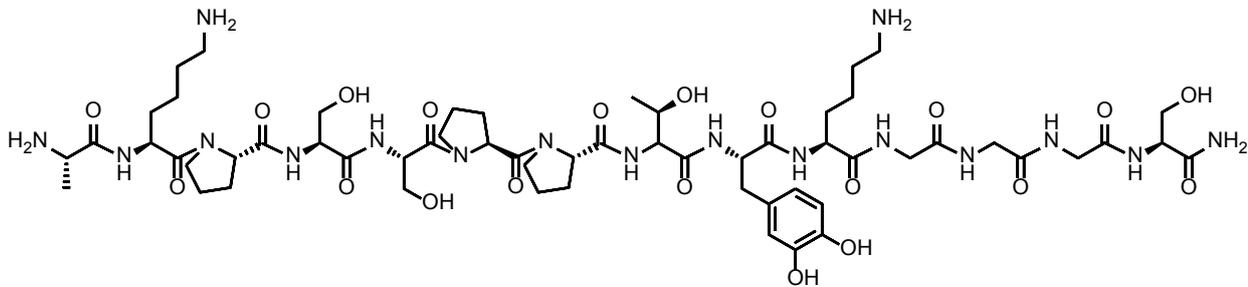


**Abbildung E 20.** UPLC-ESI-MS-Analyse von AKPSY\*PPTY\*KGGGC ( $U_2^{*C}$ ). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 5-20 % B (4.5 min).

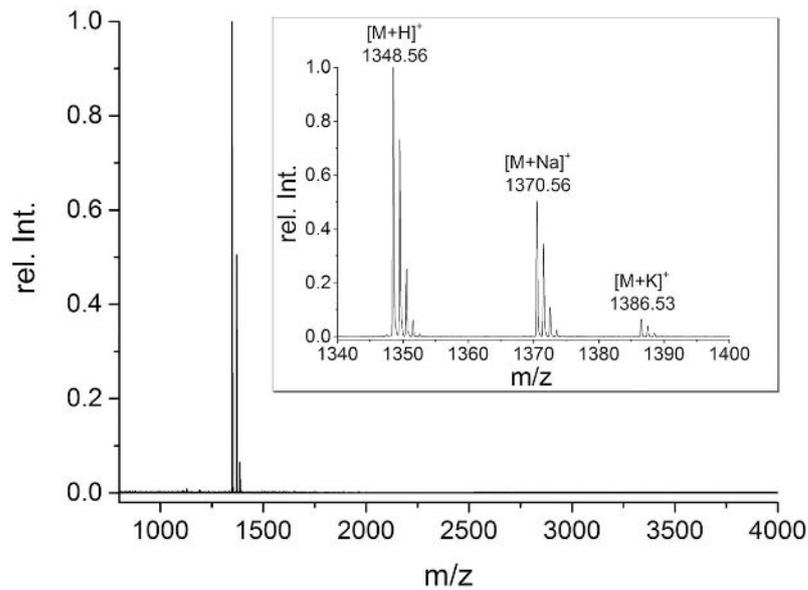
UV/VIS (210 nm):  $t_R = 1.19 - 1.48$  min, 97.8 % Reinheit.

ESI-QMS: berechnet:  $m/z$  729.33  $[M+2H]^{2+}$ , 486.55  $[M+3H]^{3+}$ ; gemessen:  $m/z$  728.98  $[M+2H]^{2+}$ , 486.53  $[M+3H]^{3+}$ .

6.5.10  $U_1^{*S}$  – AKPSSPPTY\*KGGGS

Die Peptidsynthese erfolgte nach **AAV1** in einem Synthesemaßstab von 0.1 mmol unter Nutzung von TentaGel S RAM Synthescharz (Beladung 0.23 mmol/g). Um Dopa in das Peptid einzuführen, wurde Fmoc-Dopa(Acetonid)-OH bei der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt. Das geschützte Peptid wurde der **AAV3** entsprechend freigesetzt und mittels präparativer HPLC (Laufmittelgradient 3-25 % B in 22 min, XBridge BEH C18 OBD Trennsäule) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 46 % erhalten.

## MALDI-TOF-MS



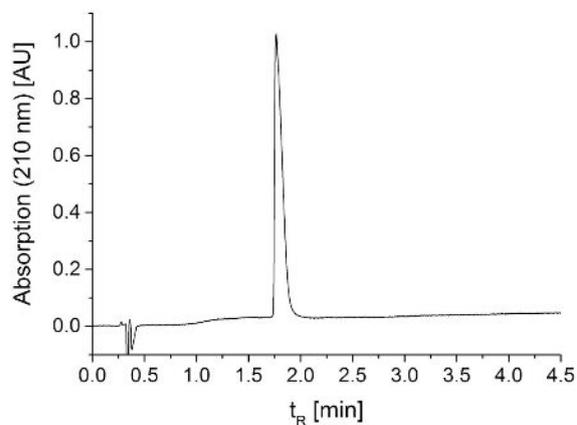
**Abbildung E 21.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von AKPSSPPTY\*KGGGS ( $U_1+^5$ ).

Berechnet:  $m/z$  1348.69  $[M+H]^+$ , 1370.67  $[M+Na]^+$ , 1386.64  $[M+K]^+$ .

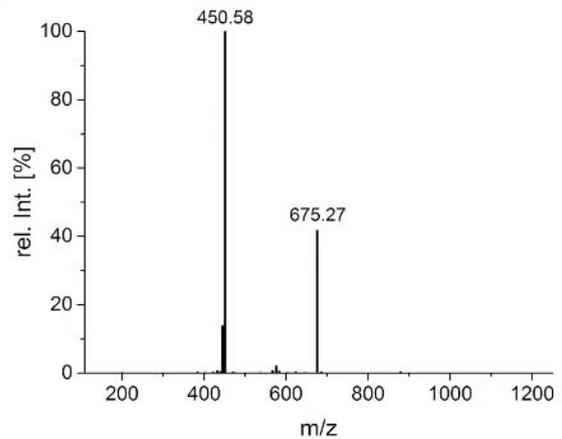
Gemessen:  $m/z$  1348.56  $[M+H]^+$ , 1370.56  $[M+Na]^+$ , 1386.53  $[M+K]^+$ .

## UPLC-UV/VIS-QMS

a)



b)

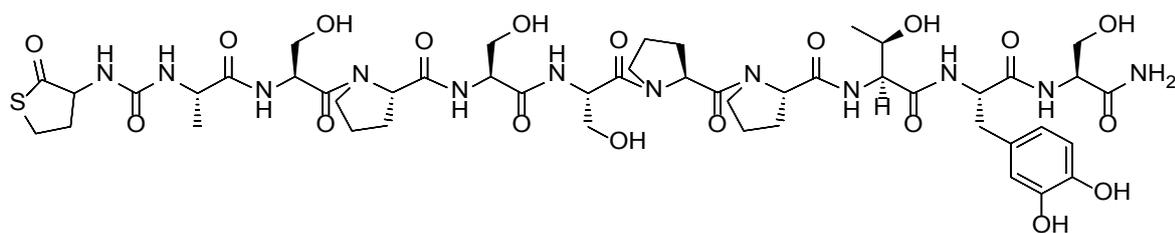


**Abbildung E 22.** UPLC-ESI-MS-Analyse von AKPSSPPTY\*KGGGS ( $U_1+^5$ ). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 5-25 % B (4.5 min).

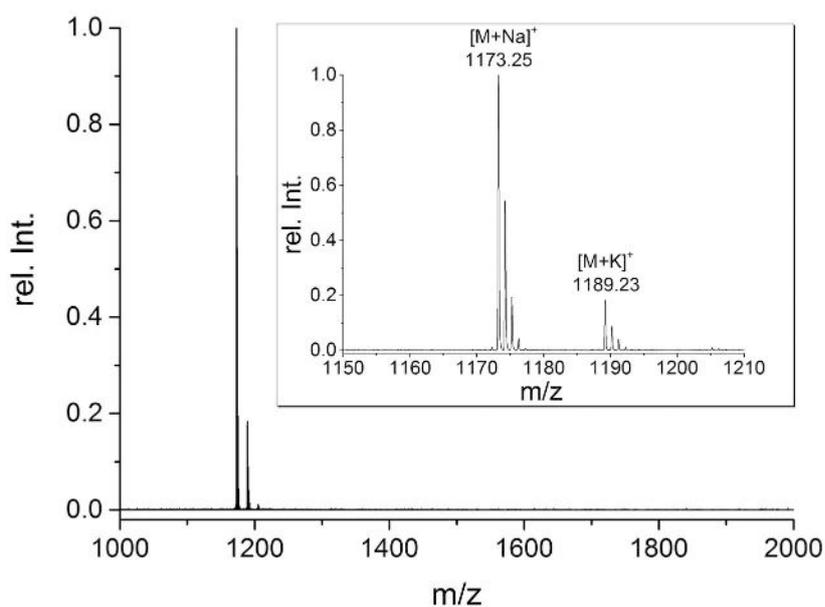
UV/VIS (210 nm):  $t_R = 1.77$  min, 99.9 % Reinheit.

ESI-QMS: berechnet:  $m/z$  675.25  $[M+2H]^{2+}$ , 450.50  $[M+3H]^{3+}$ ; gemessen:  $m/z$  675.27  $[M+2H]^{2+}$ , 450.58  $[M+3H]^{3+}$ .

6.5.11 U<sub>S1</sub>\*Tla - Tla-ASPSSPPTY\*S

Die Peptidsynthese erfolgte nach **AAV1** in einem Synthesemaßstab von 0.1 mmol unter Nutzung von Fmoc-Rink Amid AM Polystyrol-Syntheseharz (Beladung 0.59 mmol/g). Um Dopa in das Peptid einzuführen, wurde Fmoc-Dopa(Acetonid)-OH bei der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt. Zur abschließenden Einführung der Thiolacton-Gruppe, wurde das Peptid nach finaler Fmoc-Entschützung für 1 h mit 10 Äq.  $\alpha$ -Isocyanato- $\gamma$ -thiolacton (Tla-NCO) in CHCl<sub>3</sub> bei Raumtemperatur umgesetzt. Überschüssiges Tla-NCO wurde durch Waschen mit NMP, MeOH und CHCl<sub>3</sub> entfernt. Das geschützte Peptid wurde der **AAV3** entsprechend freigesetzt und mittels präparativer HPLC (Laufmittelgradient 10-25 % B in 22 min, XBridge BEH C18 OBD Trennsäule) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 41 % erhalten.

## MALDI-TOF-MS

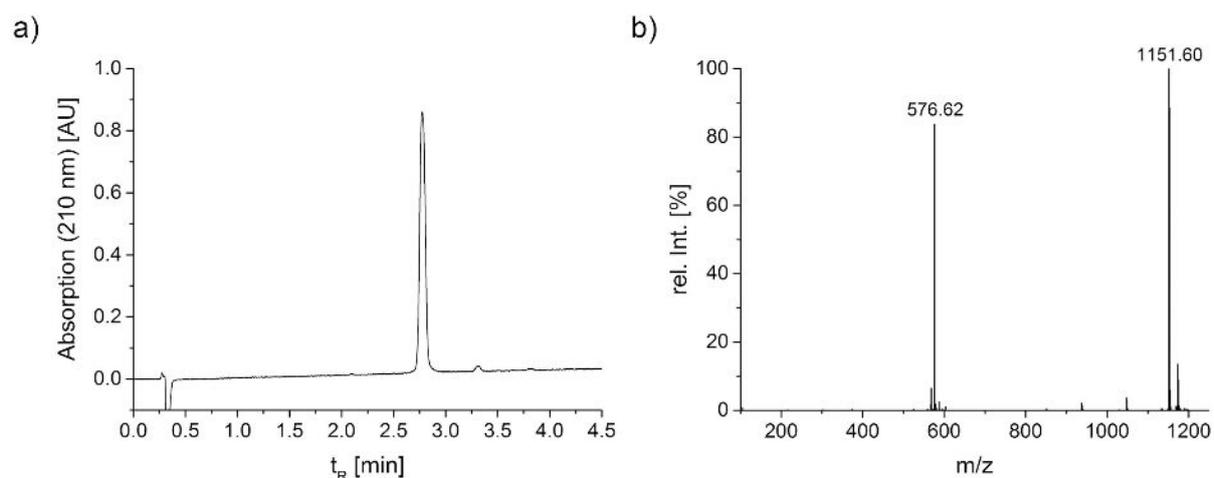


**Abbildung E 23.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von Tla-ASPSSPPTY\*S (U<sub>S1</sub>\*Tla).

Berechnet: m/z 1173.45 [M+Na]<sup>+</sup>, 1189.42 [M+K]<sup>+</sup>.

Gemessen: m/z 1173.25 [M+Na]<sup>+</sup>, 1189.23 [M+K]<sup>+</sup>.

## UPLC-UV/VIS-QMS

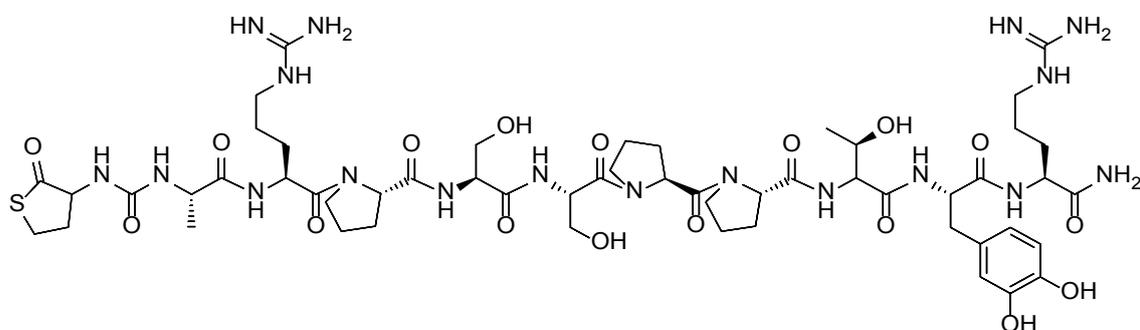


**Abbildung E 24.** UPLC-ESI-MS-Analyse von Tla-ASPSSPPTY\*S ( $U_{S1}^{Tla}$ ). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 10-25 % B (4.5 min).

UV/VIS (210 nm):  $t_R = 2.78$  min/3.32 min, 99.6 % Reinheit.

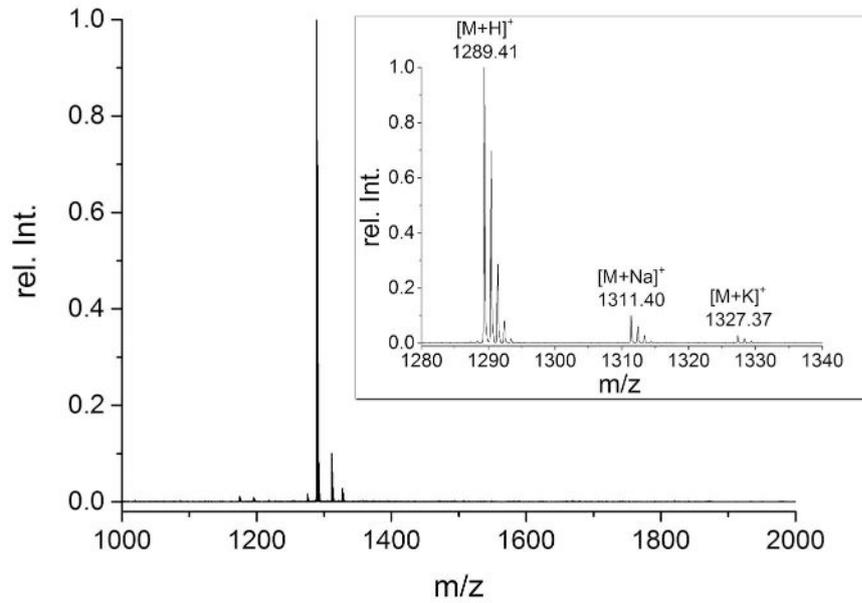
ESI-QMS: berechnet:  $m/z$  1152.22  $[M+H]^+$ , 576.61  $[M+2H]^{2+}$ ; gemessen:  $m/z$  1151.60  $[M+H]^+$ , 576.62  $[M+2H]^{2+}$ .

6.5.12  $U_{R1}^{Tla}$  - Tla-ARPSSPPTY\*R

Die Peptidsynthese erfolgte nach **AAV1** in einem Synthesemaßstab von 0.1 mmol unter Nutzung von Fmoc-Rink Amid AM Polystyrol-Synthescharz (Beladung 0.59 mmol/g). Um Dopa in das Peptid einzuführen, wurde Fmoc-Dopa(Acetonid)-OH bei der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt. Zur abschließenden Einführung der Thiolacton-Gruppe, wurde das Peptid nach finaler Fmoc-Entschützung für 1 h mit 10 Äq.  $\alpha$ -Isocyanato- $\gamma$ -thiolacton (Tla-NCO) in  $CHCl_3$  bei Raumtemperatur umgesetzt. Überschüssiges Tla-NCO wurde durch Waschen mit NMP, MeOH und  $CHCl_3$  entfernt. Das geschützte Peptid wurde der **AAV3** entsprechend freigesetzt und mittels

präparativer HPLC (Laufmittelgradient 10-20 % B in 22 min, XBridge BEH C18 OBD Trennsäule) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 14 % erhalten.

## MALDI-TOF-MS

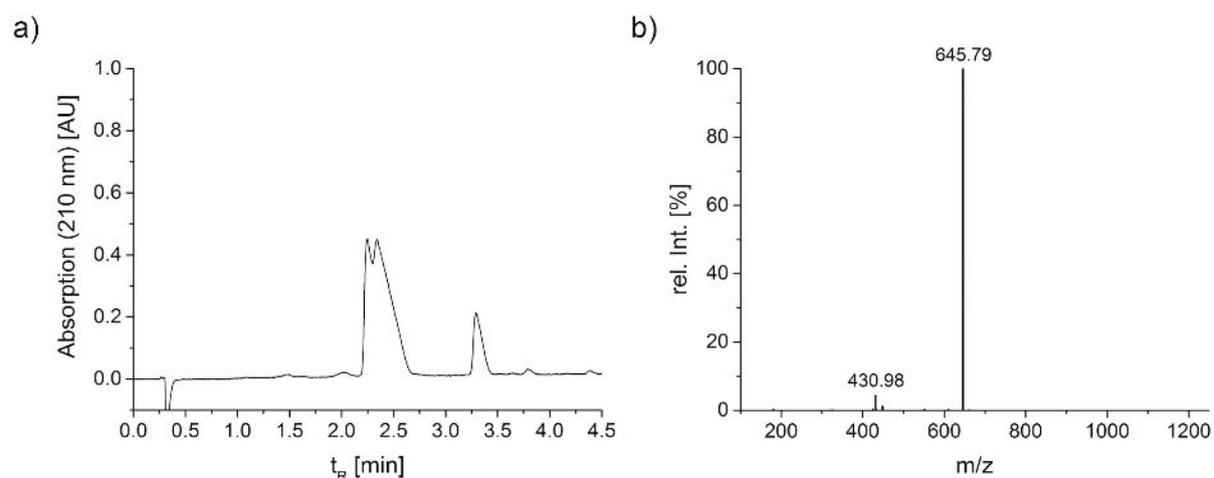


**Abbildung E 25.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von Tla-ARPSSPPTY\*R ( $U_{R1}^{Tla}$ ).

Berechnet: m/z 1289.61 [M+H]<sup>+</sup>, 1311.59 [M+Na]<sup>+</sup>, 1327.56 [M+K]<sup>+</sup>.

Gemessen: m/z 1289.41 [M+H]<sup>+</sup>, 1311.40 [M+Na]<sup>+</sup>, 1327.37 [M+K]<sup>+</sup>.

## UPLC-UV/VIS-QMS



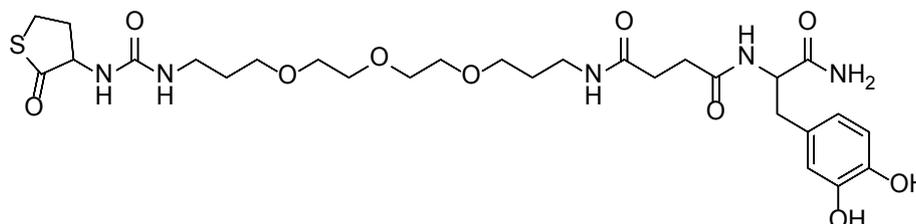
**Abbildung E 26.** UPLC-ESI-MS-Analyse von Tla-ARPSSPPTY\*R ( $U_{R1}^{Tla}$ ). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 10-20 % B (4.5 min).

UV/VIS (210 nm):  $t_R = 2.25$  min/ $3.29$  min, 97.1 % Reinheit.

ESI-QMS: berechnet:  $m/z$  645.73  $[M+2H]^{2+}$ , 430.82  $[M+3H]^{3+}$ ; gemessen:  $m/z$  645.79  $[M+2H]^{2+}$ , 430.98  $[M+3H]^{3+}$ .

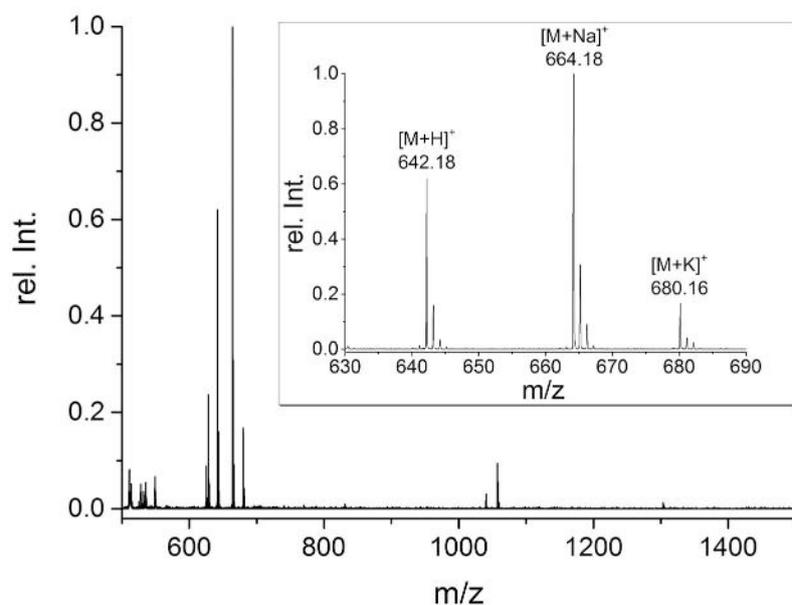
### 6.5.13 $U_{PEG1}^{Tla}$ - Tla-N-succinyl-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin-Y\*



Die Peptidsynthese wurde manuell nach **AAV2** in einem Synthesemaßstab von 0.25 mmol unter Nutzung von Fmoc-Rink Amid AM Polystyrol-Syntheseharz (Beladung 0.59 mmol/g) durchgeführt. Die Einführung von Dopa in das Peptid erfolgte mit einer Doppelkupplung von jeweils 5 Äq. Fmoc-Dopa(Acetonid)-OH, 5 Äq. PyBOP und 10 Äq. DIPEA für 5 N-succinyl-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin wurde als Fmoc-geschütztes Derivat mit ebenfalls 5 Äq., 5 Äq. PyBOP und 5 Äq. DIPEA für 3 h gekuppelt. Zur abschließenden Einführung der Thiolacton-Gruppe, wurde das Peptid nach finaler Fmoc-Entschützung für 1 h mit 10 Äq.  $\alpha$ -Isocyanato- $\gamma$ -thiolacton (Tla-NCO) in  $CHCl_3$  bei Raumtemperatur umgesetzt. Überschüssiges Tla-NCO wurde durch Waschen mit NMP, MeOH und  $CHCl_3$  entfernt. Das geschützte Peptid wurde der **AAV3** entsprechend freigesetzt und mittels

präparativer HPLC (Laufmittelgradient 5-35 % B in 22 min, XBridge BEH C18 OBD Trennsäule) aufgereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 32 % erhalten.

## MALDI-TOF-MS

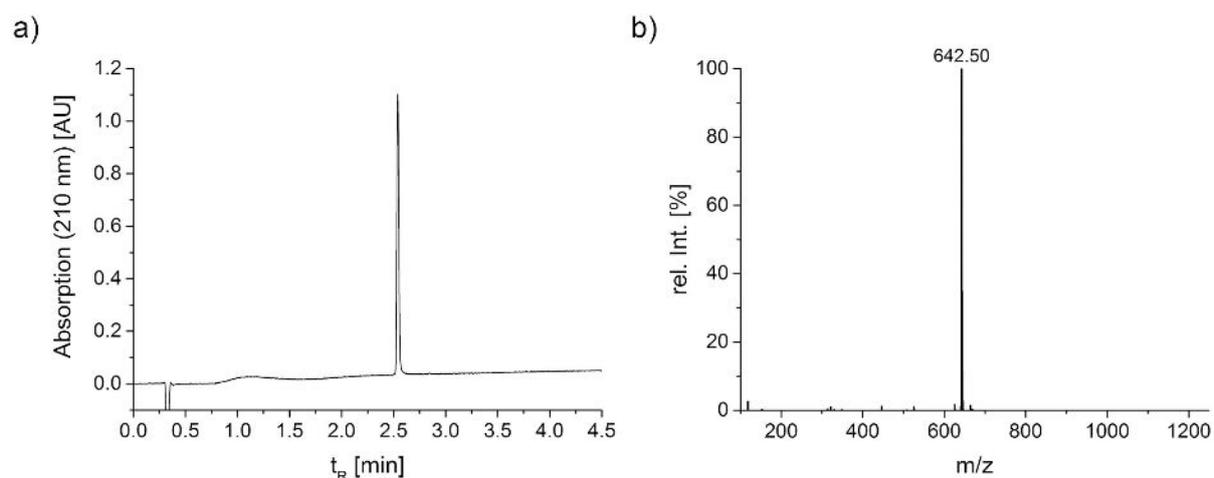


**Abbildung E 27.** MALDI-TOF-MS-Spektrum von Tla-N-succinyl-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin-Y\* (U<sub>PEG1\*</sub><sup>Tla</sup>).

Berechnet: m/z 642.28 [M+H]<sup>+</sup>, 664.26 [M+Na]<sup>+</sup>, 680.24 [M+K]<sup>+</sup>.

Gemessen: m/z 642.18 [M+H]<sup>+</sup>, 664.18 [M+Na]<sup>+</sup>, 680.16 [M+K]<sup>+</sup>.

## UPLC-UV/VIS-QMS

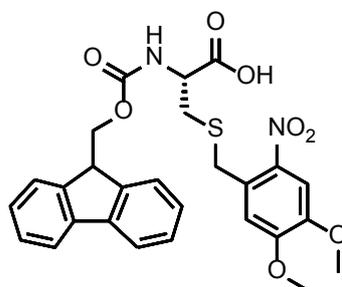


**Abbildung E 28.** UPLC-ESI-MS-Analyse von Tla-N-succinyl-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin-Y\* (UPEG1\*<sup>TB</sup>). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 5-40 % B (4.5 min).

UV/VIS (210 nm): t<sub>R</sub> = 2.54 min, 99.9 % Reinheit.

ESI-QMS: berechnet: m/z 642.74 [M+H]<sup>+</sup>; gemessen: m/z 642.50 [M+H]<sup>+</sup>.

6.5.14 Fmoc-Cys(*α*Nv)-OH

Die Synthese zur Einführung einer photolabilen 2-Nitroveratryl Thiol-Schutzgruppe an Fmoc-Cys-OH erfolgte nach Literaturvorschrift von KARAS *et. al.*<sup>294</sup> Dazu wurden 828.7 mg (3.0 mmol) 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylbromid in einem 100 mL Rundkolben vorgelegt und in 30 mL DCM gelöst. Der Lösung wurde tropfenweise 2.54 mL (1.933 g, 15.0 mmol, 5 Äq.) DIPEA hinzugegeben. Im Anschluss erfolgte die langsame Zugabe von 1.084 g (3.0 mmol, 1 Äq.) Fmoc-Cys-OH\*H<sub>2</sub>O. Das Gemisch wurde über Nacht für 18 h unter Lichtausschluss gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck, wurde der Rückstand in 25 mL DMF aufgenommen und anschließend in 300 mL kalter 0.5 M HCl ausgefällt. Der Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen (3-mal 120 mL), in THF gelöst und bei vermindertem Druck getrocknet. Abschließend erfolgte die Aufreinigung des Rohprodukts mittels Flash-Säulenchromatografie mit einem Laufmittelgradienten

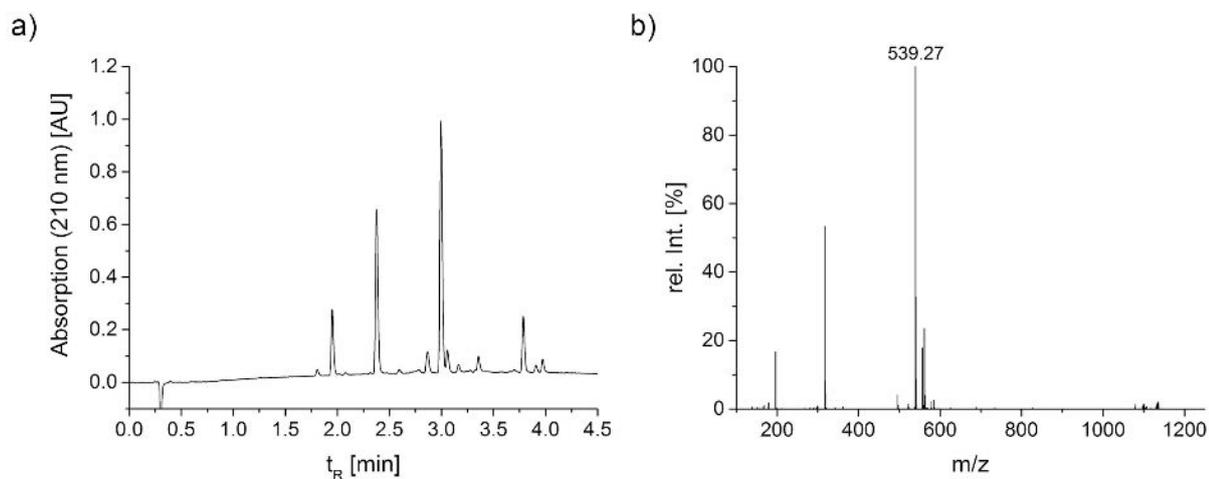
von 0-10 % MeOH in DCM. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck, wurden 1.28 g (79 %, 2.38 mmol) des Produkts erhalten.

### NMR

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  in ppm): 12.96 (s, 1H), 7.89 (d,  $J^\beta = 7.5$  Hz, 2H), 7.72 (d,  $J^\beta = 7.4$  Hz, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.41 (t,  $J^\beta = 7.4$  Hz, 2H), 7.32 (t,  $J^\beta = 7.4$  Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 4.33-4.19 (m, 3H), 4.16-4.02 (m, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 2.86 (dd,  $J^2 = 13.9$  Hz,  $J^\beta = 4.4$  Hz, 1H), 2.70 (dd,  $J^2 = 13.9$  Hz,  $J^\beta = 9.6$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  APT NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  in ppm): 172.29 (s, 1C, COOH), 156.00 (s, 1C, NCOO), 152.56 (s, 1C,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 147.42 (s, 1C,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 143.80 (s, 1C,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 143.78 (s, 1C,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 140.71 (s, 2C,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 139.78 (s, 1C,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.97 (s, 1C,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.65 (s, 2C,  $\text{CH}_{\text{AR}}$ ), 127.08 (s, 2C,  $\text{CH}_{\text{AR}}$ ), 125.30 (s, 1C,  $\text{CH}_{\text{AR}}$ ), 125.26 (s, 1C,  $\text{CH}_{\text{AR}}$ ), 120.12 (s, 2C,  $\text{CH}_{\text{AR}}$ ), 114.22 (s, 1C,  $\text{CH}_{\text{AR}}$ ), 108.85 (s, 1C,  $\text{CH}_{\text{AR}}$ ), 65.72 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ), 56.16 (s, 1C,  $\text{CH}_3$ ), 55.98 (s, 1C,  $\text{CH}_3$ ), 53.92 (s, 1C, CH), 46.60 (s, 1C,  $\text{C}_\alpha\text{H}$ ), 33.16 (s, 1C,  $\text{SCH}_2$ ), 32.49 (s, 1C,  $\text{SCH}_2$ ).

### UPLC-UV/VIS-QMS



**Abbildung E 29.** UPLC-ESI-MS-Analyse von Fmoc-Cys(OtBu)-OH. a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 30-90 % B (4.5 min).

UV/VIS (210 nm):  $t_{\text{R}} = 3.00$  min, 33.9 % Reinheit.

ESI-QMS: berechnet:  $m/z$  539.15  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; gemessen:  $m/z$  539.27  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



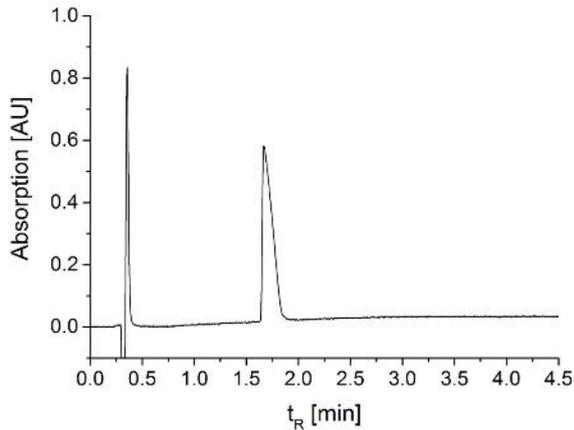
Berechnet:  $m/z$  1559.72  $[M+H]^+$ , 1581.70  $[M+Na]^+$ , 1597.67  $[M+K]^+$ .

Gemessen:  $m/z$  1559.60  $[M+H]^+$ , 1581.64  $[M+Na]^+$ , 1597.62  $[M+K]^+$ .

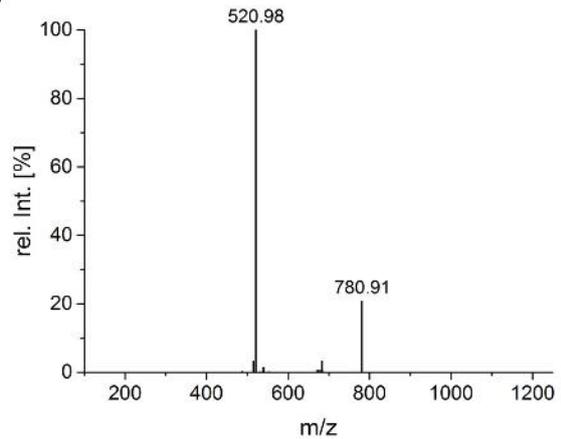
Signale bei  $m/z$  1364.55  $[M+H]^+$ , 1386.59  $[M+Na]^+$  und 1402.56  $[M+K]^+$  entsprechen dem Peptid ohne Nitroveratryl-Gruppe (-195.05 Da), die durch den Ionisierungsprozess teilweise abgespalten wird.

### UPLC-UV/VIS-QMS

a)



b)



**Abbildung E 31.** UPLC-ESI-MS-Analyse von AKPSSPPTY\*KGGGC(oNv) ( $U_1^{oNv}$ ). a) UV-Signal des UPLC-Chromatogramms. b) ESI-MS-Spektrum des Analytsignals.

Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA, Laufmittelgradient 10-40 % B (4.5 min).

UV/VIS (210 nm):  $t_R = 0.59$  min, 99.9 % Reinheit.

ESI-QMS: berechnet:  $m/z$  780.87  $[M+2H]^{2+}$ , 520.91  $[M+3H]^{3+}$ ; gemessen:  $m/z$  780.91  $[M+2H]^{2+}$ , 520.98  $[M+3H]^{3+}$ .

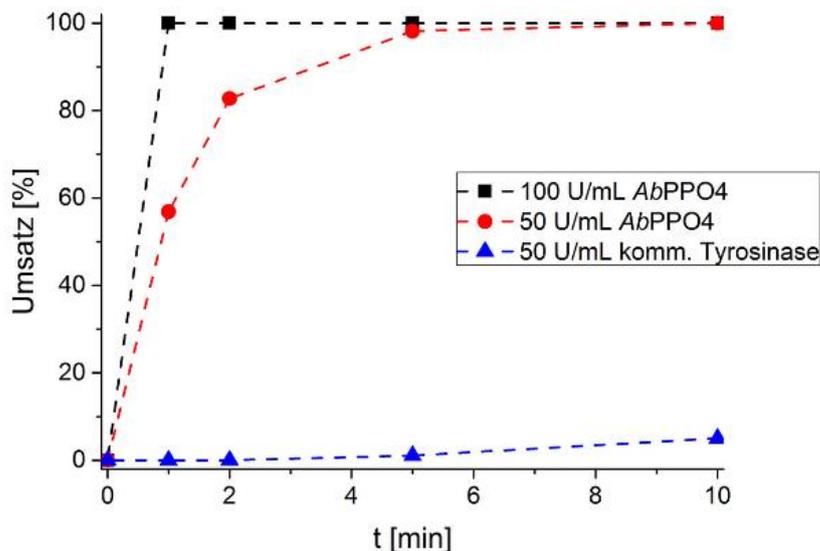
## 6.6 Experimentelle Daten

### 6.6.1 Kinetische HPLC-Messungen der Aktivierung von $U_1^S$

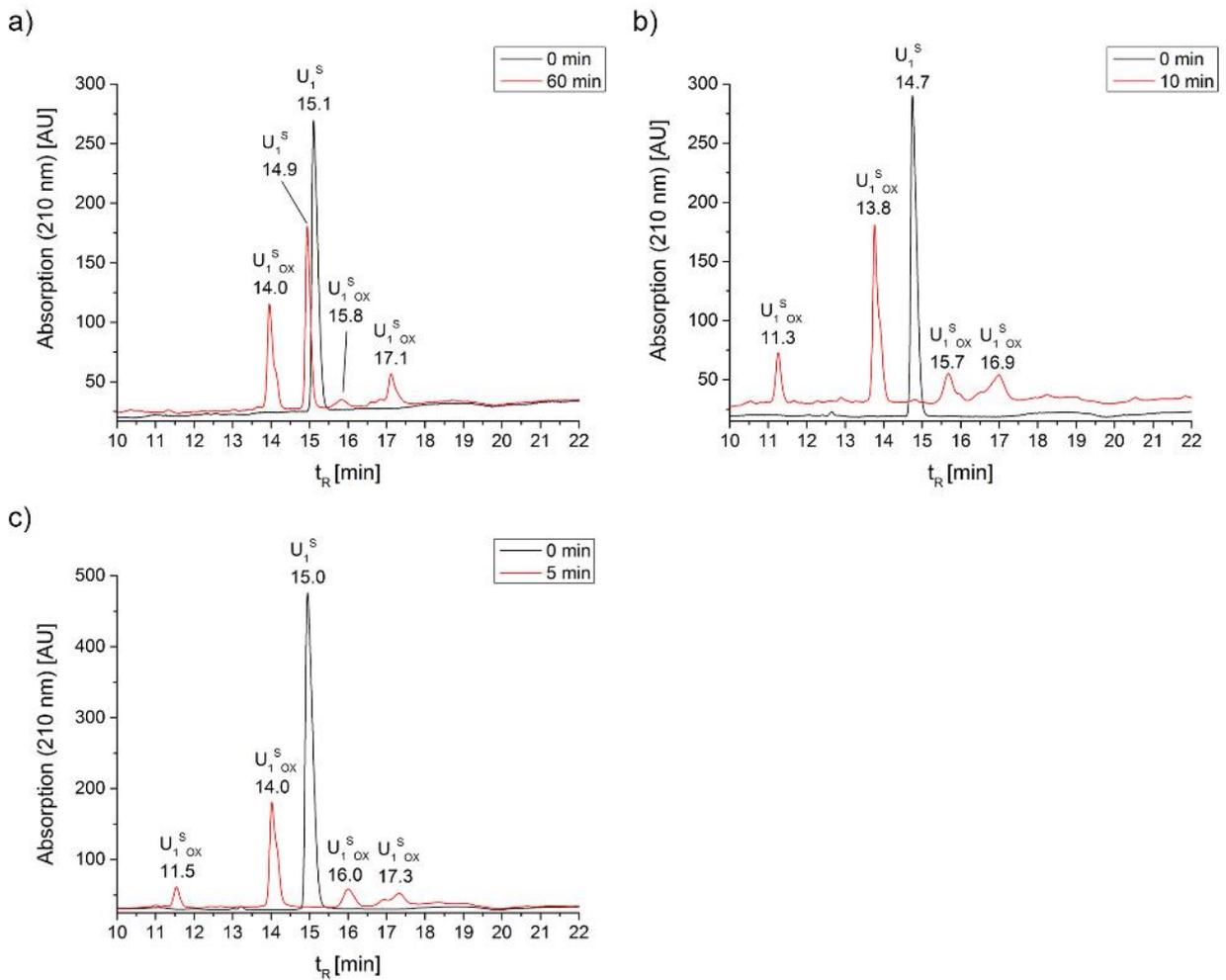
Es wurden 0.25  $\mu\text{M}$  Lösungen von  $U_1^S$  gemäß AAV4 mit 100 U/mL und 50 U/mL *Ab*PP<sub>4</sub> und 50 U/mL kommerzieller Tyrosinase aktiviert. Zu unterschiedlichen Reaktionszeiten wurden Proben von 100  $\mu\text{L}$  entnommen, 1.6  $\mu\text{L}$  6 M HCl zugegeben (resultiert in pH 2 der Probenlösung), um die enzymatische Reaktion zu stoppen und die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Messung der Proben erfolgte unmittelbar nach dem Auftauen.

Die Kinetiken für die verschiedenen Aktivierungen (Abbildung E 32) zeigen quantitative Umsätze nach 1 und 10 min für die Aktivierungen mit 100 U/mL bzw. 50 U/mL *Ab*PP<sub>4</sub>. Bei der Aktivierung mit 50 U/mL kommerzieller Tyrosinase wird einen Umsatz von 5 % nach 10 min erreicht. Änderungen in den HPLC-Chromatogrammen der Experimente sind in Abbildung E 33 zu sehen. Es bilden sich vier neue Signale bei den Aktivierungen mit *Ab*PP<sub>4</sub> und drei neue Signale bei der Reaktion mit kommerzieller Tyrosinase. Bei der *Ab*PP<sub>4</sub> Aktivierung verschwindet das Edukt-Signal von  $U_1^S$  (15.0/14.7 min), im Gegensatz zur Aktivierung mit kommerzieller Tyrosinase.

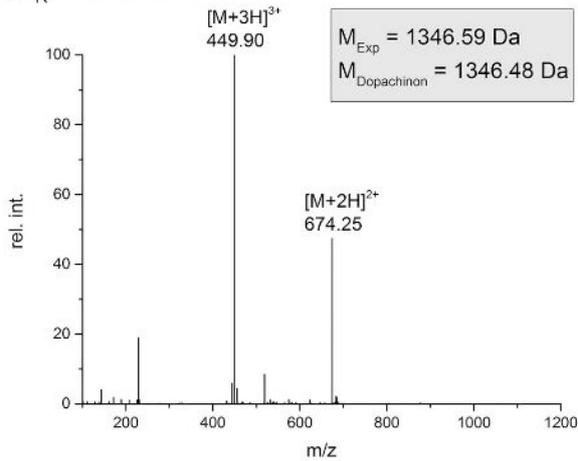
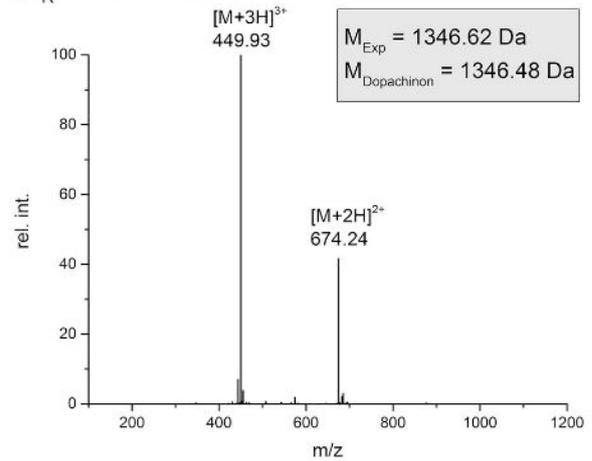
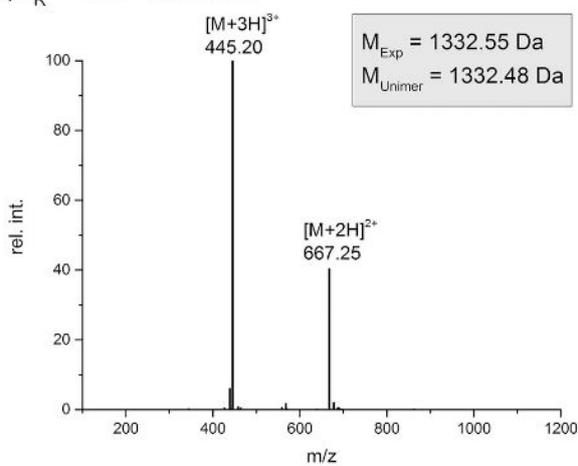
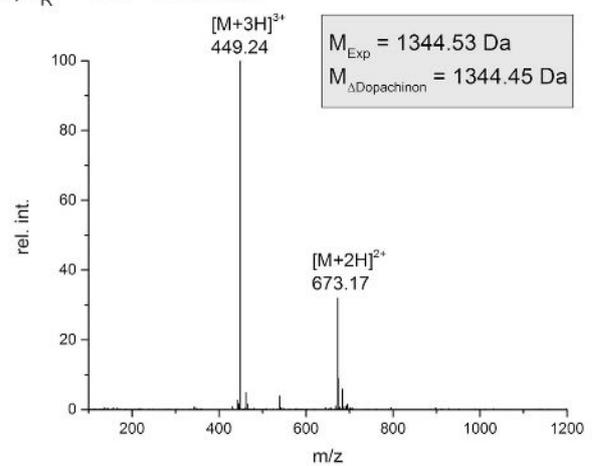
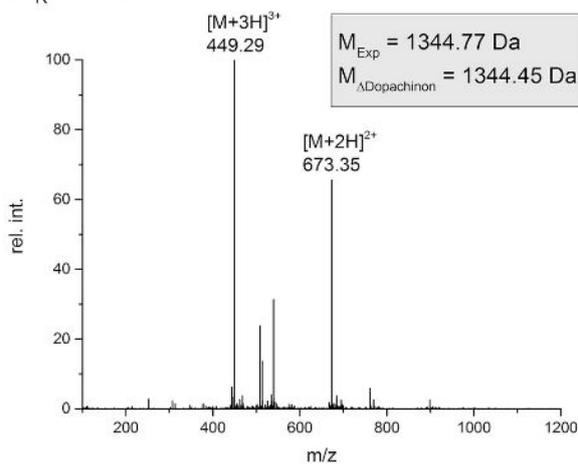
Die ESI-MS-Messungen der neu gebildeten Signale zeigen alle Massen aktivierter Unimerspezies mit Oxidationszuständen von Dopachinon und  $\Delta$ Dopachinon (siehe Abbildung E 34).



**Abbildung E 32.** Kinetiken der enzymatischen Aktivierung von  $U_1^S$  zu  $U_1^{S_{ox}}$ . Der zeitaufgelöste Umsatz ist für Aktivierungen mit 100 U/mL *Ab*PP<sub>4</sub>, 50 U/mL *Ab*PP<sub>4</sub> und 50 U/mL kommerzieller Tyrosinase dargestellt. (Gestrichelte Linien dienen zur Orientierung).



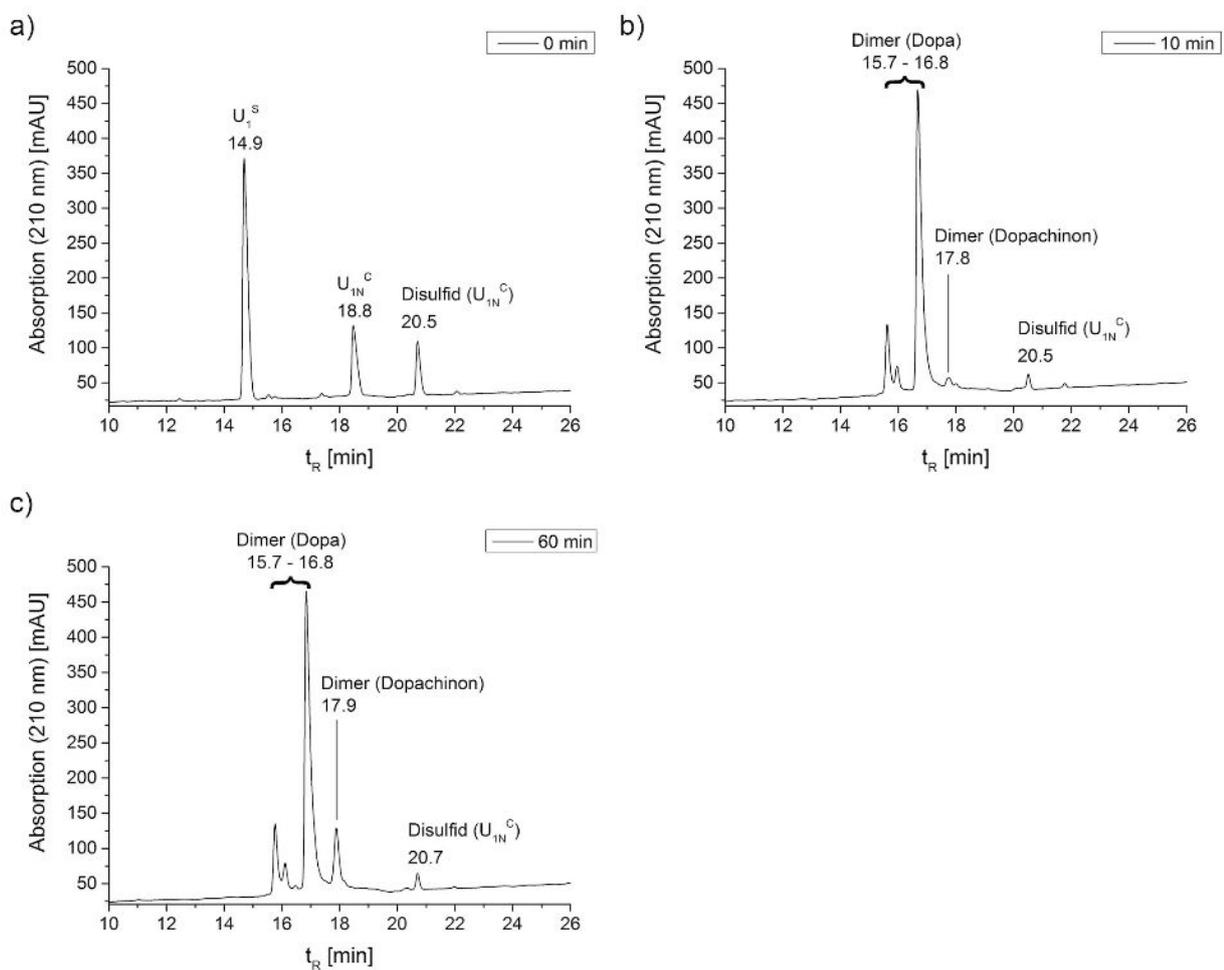
**Abbildung E 33.** Aktivierung von U<sub>1</sub><sup>S</sup>. Vergleich der HPLC-Chromatogramme vor und nach enzymatischer Aktivierung. a) Aktivierung mit 50 U/mL kommerzieller Tyrosinase. b) Aktivierung mit 50 U/mL AbPPO4. c) Aktivierung mit 100 U/mL AbPPO4. (Laufmittelgradient 3-25 % B (30 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).

a)  $t_R = 11.3-11.5$  minb)  $t_R = 13.8-14.0$  minc)  $t_R = 14.7-15.1$  mind)  $t_R = 15.7-16.0$  mine)  $t_R = 16.9-17.3$  min

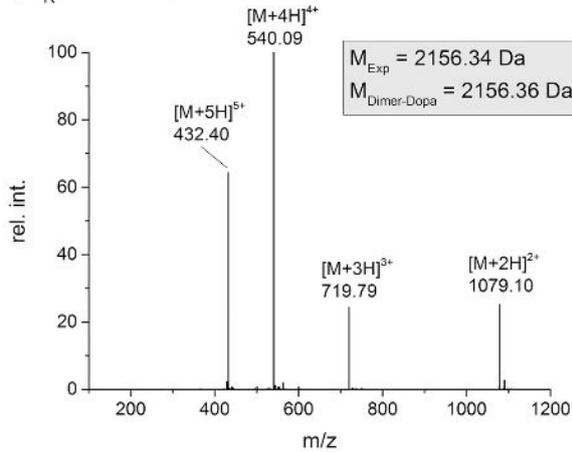
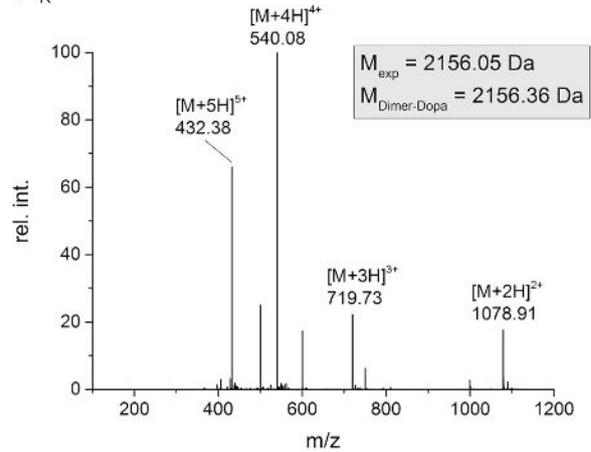
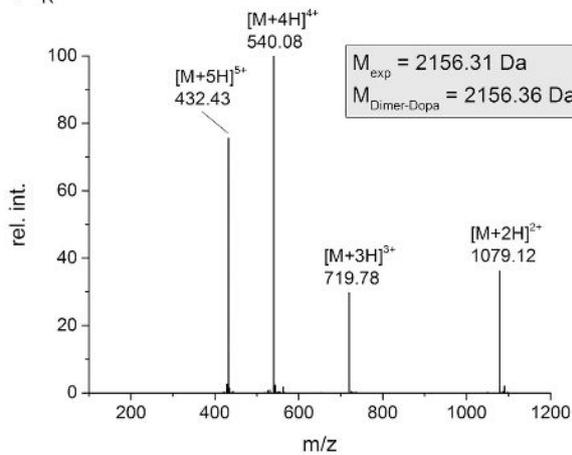
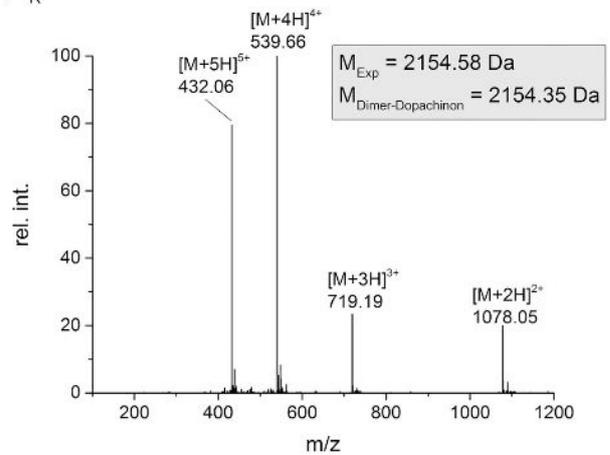
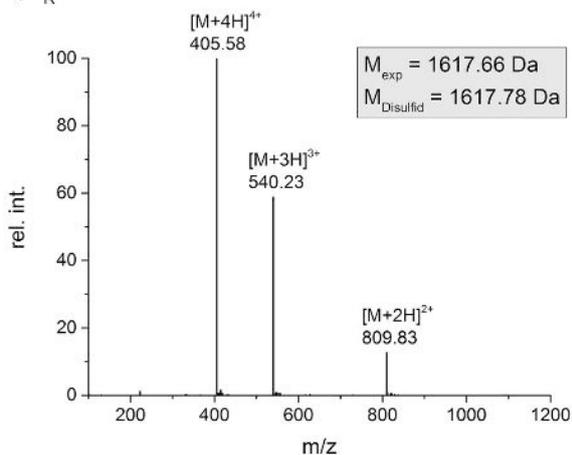
**Abbildung E 34.** ESI-MS-Spektren der verschiedenen Signale aus den Chromatogrammen der Aktivierung von  $U_1^S$ . a) und b) Die gemessenen Massen entsprechen dem aktivierten  $U_1^{S_{ox}}$  im Dopachinon Oxidationszustand. c) Das Spektrum zeigt die Masse des nicht aktivierten Unimers  $U_1^S$ . d) und e) Die Spektren dieser Signale weisen Massen auf, die dem aktivierten  $U_1^{S*}$  im Oxidationszustand von  $\Delta$ Dopachinon entsprechen.

### 6.6.2 Kinetische HPLC-Messungen der Dimerisierungsreaktion von $U_1^S$ und $U_{1N}^C$

Eine Mischung aus  $U_1^S$  ( $0.25 \mu\text{M}$ ) und  $U_{1N}^C$  ( $0.26 \mu\text{M}$ ) in einem Verhältnis von 1:1.05 wurde gemäß AAV4 mit  $50 \text{ U/mL } AbPPO_4$  aktiviert. Zu unterschiedlichen Reaktionszeiten wurden Proben von  $250 \mu\text{L}$  entnommen,  $2.25 \mu\text{L } 6 \text{ M HCl}$  zugegeben (resultiert in pH 2 der Probenlösung), um die enzymatische Reaktion zu stoppen und die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden unmittelbar nach dem Auftauen gemessen. Die HPLC-Chromatogramme der Kinetik (Abbildung E 35) zeigen die Bildung von einer Gruppe von drei Signalen und einem weiteren Signal, dessen Massen dem  $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimer im Oxidationszustand von Dopa und Dopachinon entsprechen (Abbildung E 36).



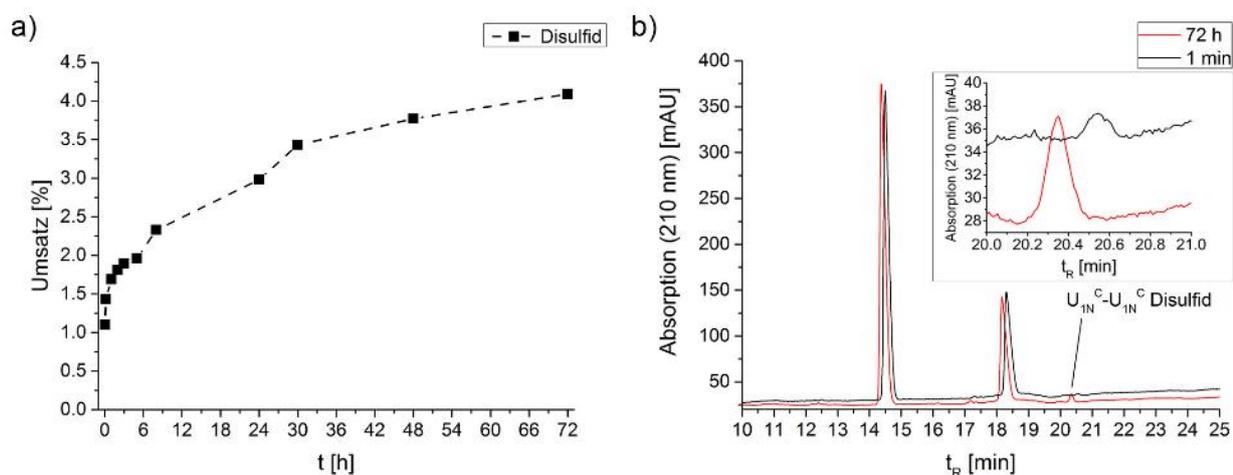
**Abbildung E 35.** Kinetische HPLC-Messungen der Modell-Dimerisierung von  $U_1^S$  und  $U_{1N}^C$ . a) Chromatogramm Unmittelbar nach Beginn der Reaktion. b) Chromatogramm nach 10 min Reaktionszeit. c) Chromatogramm nach 60 min Reaktionszeit (Laufmittelgradient 3-25 % B (30 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).

a)  $t_R = 15.8$  minb)  $t_R = 16.1$  minc)  $t_R = 16.8$  mind)  $t_R = 17.8-17.9$  mine)  $t_R = 20.5-20.7$  min

**Abbildung E 36.** Modell-Dimerisierung von  $U_1^S$  und  $U_{1N}^C$ . ESI-MS-Spektren der verschiedenen Signale aus den Chromatogrammen. a), b) und c) Die gemessenen Massen entsprechen dem  $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimer im Oxidationszustand des Catechols. d) Das Spektrum zeigt die Masse des  $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimers im Oxidationszustand des Chinons. e) Das Spektrum weist die Masse auf, die dem  $U_{1N}^C$ - $U_{1N}^C$  Disulfid entspricht.

### 6.6.3 Kinetische HPLC-Messungen zur $U_{1N}^C$ - $U_{1N}^C$ Disulfidbildung

Eine  $0.25 \mu\text{M}$ -Lösung von  $U_1^S$  und  $U_{1N}^C$  wurde über 72 h bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  geschüttelt, um zu bestimmen, wie schnell die Autooxidation des freien Thiols von  $U_{1N}^C$  zu Disulfid im Vergleich zum Dimerisierungsexperiment verläuft (siehe Abschnitt 6.6.2). Für kinetische HPLC-Messungen wurden zu unterschiedlichen Reaktionszeiten Proben entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden unmittelbar nach dem Auftauen gemessen. Abbildung E 37 zeigt, dass etwa 3 % des  $U_{1N}^C$ -Unimers innerhalb von drei Tagen zu Disulfid oxidiert.

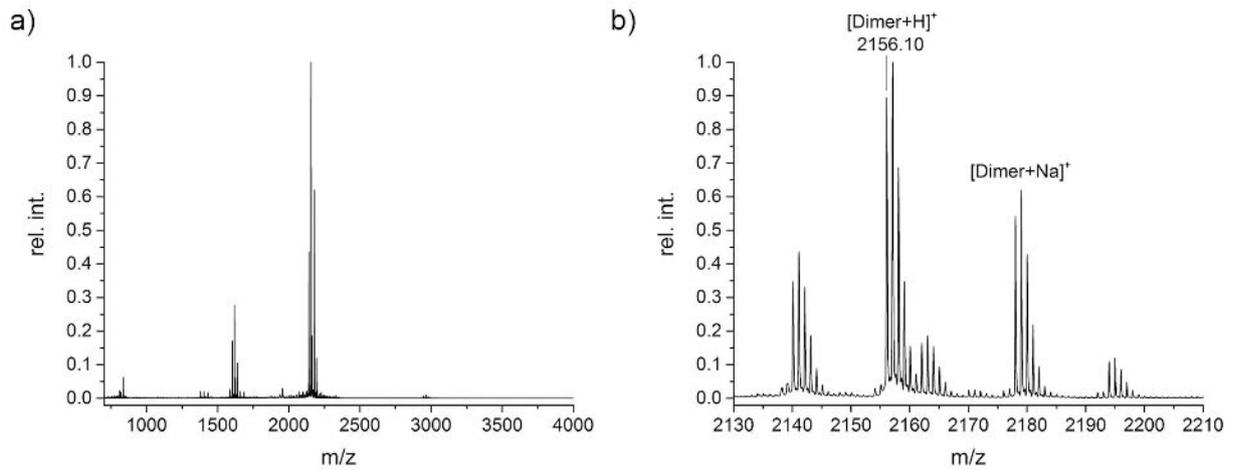


**Abbildung E 37.** HPLC-Kinetik der Autooxidation von  $U_{1N}^C$  zu Disulfid. a) Zeitaufgelöster Umsatz. b) Vergleich der HPLC-Chromatogramme nach 1 min und 72 h Reaktionszeit (Laufmittelgradient 3-25 % B (30 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0,1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0,1 % FA; gestrichelte Linien dienen zur Orientierung).

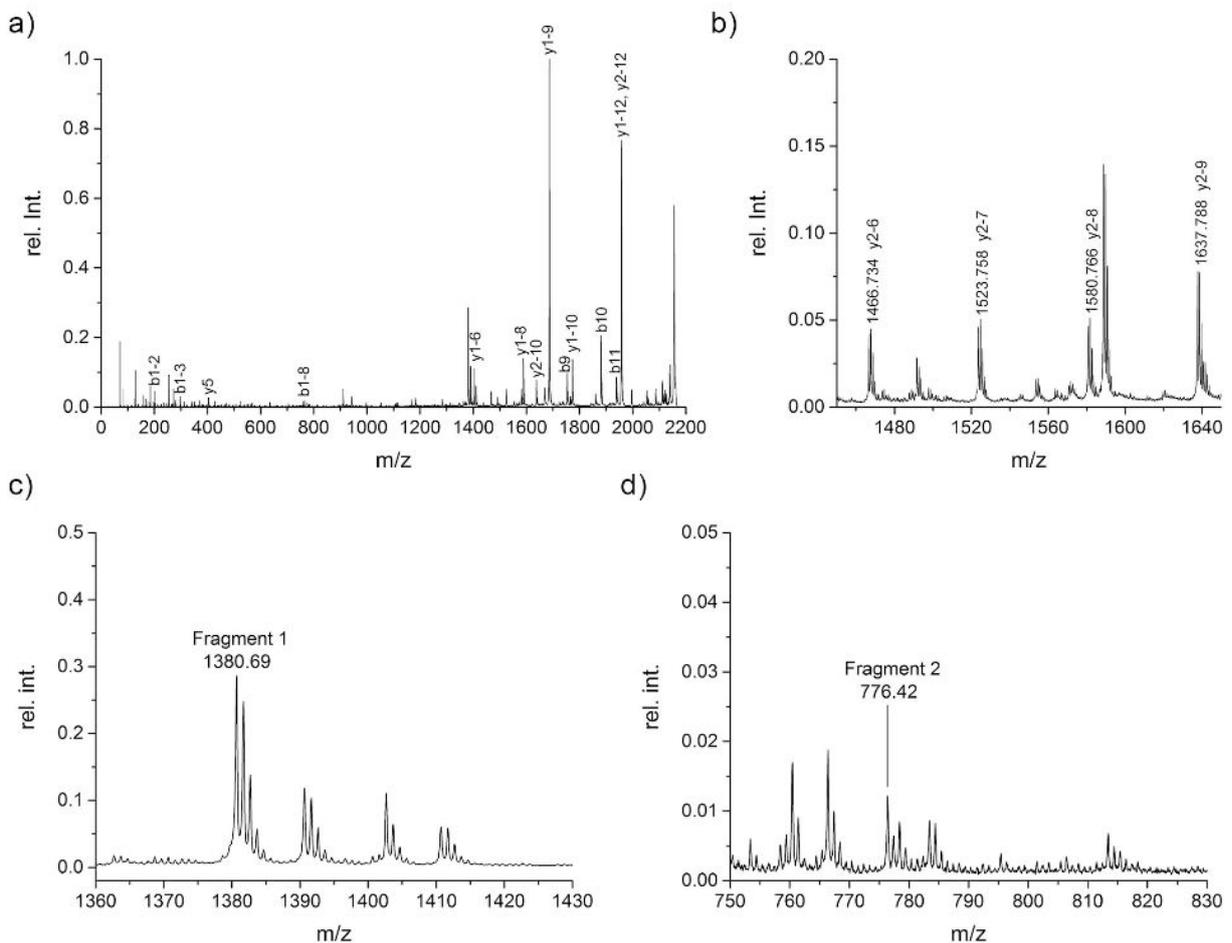
### 6.6.4 MALDI-TOF-MS/MS-Messungen des Modell-Dimers

Die Messungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. EBERHARD KRAUSE am *Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie (FMP)* von HEIKE STEPHANOWITZ durchgeführt.

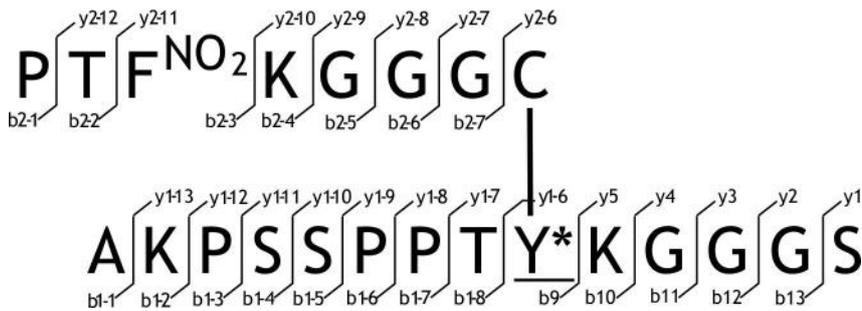
Vom Dimerisierungsprodukt der Modellreaktion von  $U_1^S$  und  $U_{1N}^C$  wurden Tandem-MS/MS-Fragmentierungsspektren aufgenommen. Dazu wurde eine Lösung von  $U_1^S$  ( $0.25 \mu\text{M}$ ) und  $U_{1N}^C$  ( $0.26 \mu\text{M}$ ) für 10 min gemäß AAV4 aktiviert.  $50 \mu\text{L}$  der Reaktionsmischung wurden lyophilisiert und in ACN/Wasser (1:1, v/v) + 0,1 % TFA für die MALDI-Messung resolubilisiert und gemessen. Im Fragmentierungsspektrum konnten 60 % der entsprechenden y und b Ionen für das Dimer mit einer mittleren Genauigkeit von  $m/z 0.02 \pm 0.01$  ( $15.1 \pm 16.2 \text{ ppm}$ , Tabelle E 1) zugeordnet werden.



**Abbildung E 38.** MALDI-TOF-MS-Analyse der Modell-Dimerisierung von  $U_1^S$  und  $U_{1N}^C$  nach 10 min Reaktionszeit. a) Gesamtes Spektrum. b) Der Ausschnitt des Spektrums zeigt die ausgewählte Masse von  $m/z$  2156.10 ( $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimer) für MALDI-TOF-MS/MS Fragmentierung.



**Abbildung E 39.** MALDI-TOF-MS/MS-Fragmentierungsspektrum vom Vorläuferion bei  $m/z$  2156.10 ( $U_1^S$ - $U_{1N}^C$  Dimer). a) Gesamtes Spektrum mit Markierung einiger y und b Ionen. b) Ausschnitt des Spektrums, der die Signale der für Cysteyndopa-Bindungen charakteristischen Fragmentationen zeigt. c) Ausschnitt des Spektrums, der das Signal vom Fragment 1 zeigt. d) Ausschnitt des Spektrums, der das Signal vom Fragment 2 zeigt.



**Abbildung E 40.** Fragmentierungsschema des  $U_1^S-U_{1N}^C$  Dimer-Peptids aus der Modellreaktion. Die Bezeichnungen der y und b Fragmente kennzeichnen die verschiedenen Ionen, die aus dem Bindungsbruch der N-C=O Peptidbindung resultieren.

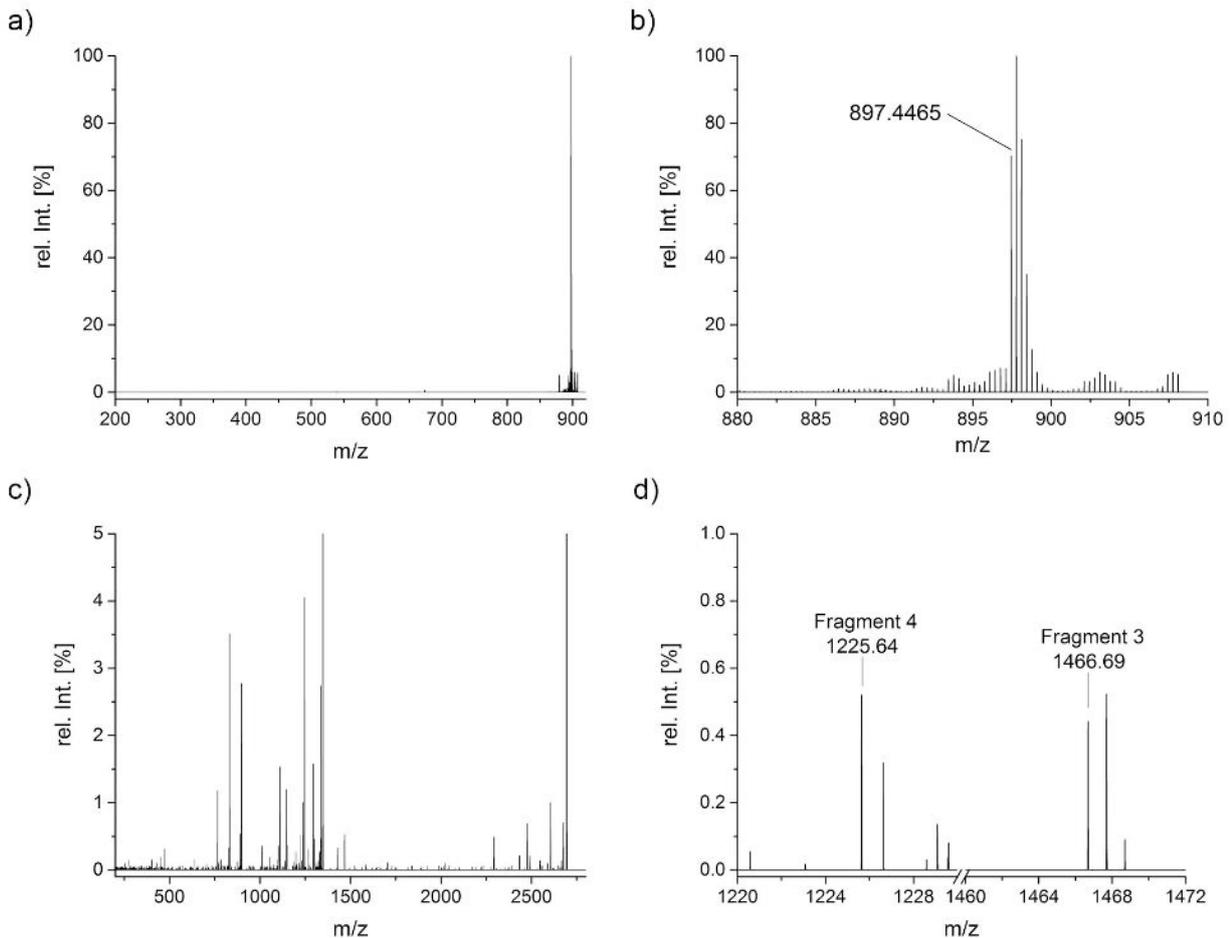
**Tabelle E 1.** Liste der gefundenen y und b Fragmentionen aus der MALDI-TOF-MS/MS-Messung des  $U_1^S-U_{1N}^C$  Modell-Dimers. Grün hinterlegte Ionen sind charakteristisch für eine Cysteinyldopa-Bindung.

Ion	berechn. [Da]	gefunden [Da]	Ion	berechn. [Da]	gefunden [Da]
b1-1	72.044	-	y1	105.066	-
b1-2	200.139	200.148	y2	162.087	-
b1-3	297.192	297.199	y3	219.109	-
b1-4	384.224	-	y4	276.130	-
b1-5	471.256	-	y5	404.225	404.254
b1-6	568.309	-	y1-6	1390.617	1390.650
b1-7	665.362	-	y1-7	1491.665	1491.700
b1-8	766.409	766.410	y1-8	1588.717	1588.753
b2-1	98.060	-	y1-9	1685.770	1685.798
b2-2	199.108	-	y1-10	1772.802	1772.814
b2-3	391.161	-	y1-11	1859.834	1859.857
b2-4	519.256	-	y1-12	1956.887	1956.892
b2-5	576.278	-	y1-13	2084.982	2085.027
b2-6	633.299	-	y2-6	1466.706	1466.734
b2-7	690.327	-	y2-7	1523.727	1523.758
b9	1752.801	1752.807	y2-8	1580.749	1580.766
b10	1880.896	1880.894	y2-9	1637.770	1637.788
b11	1937.917	1937.914	y2-10	1765.865	1765.869
b12	1994.939	1994.937	y2-11	1957.918	1957.901
b13	2051.960	2051.965	y2-12	2058.966	2058.981

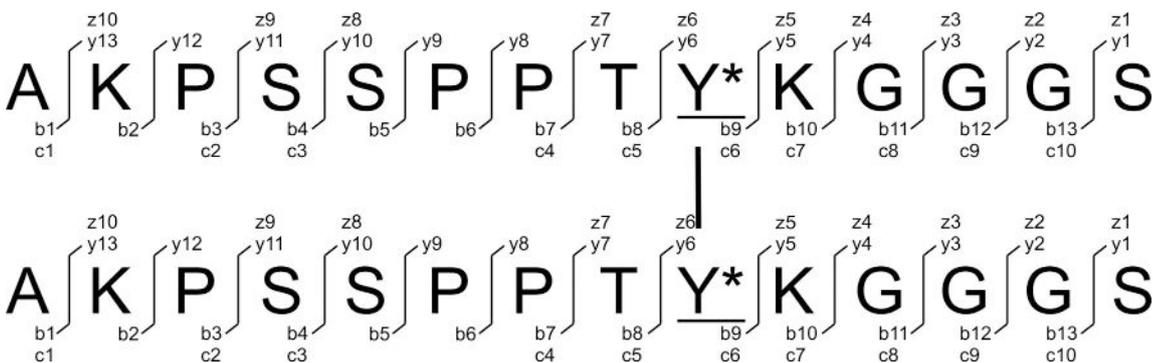
### 6.6.5 LC-ESI-MS/MS-Messungen zur Verknüpfung von $U_1^S$

Die Messungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. EBERHARD KRAUSE am Leibniz Institut für molekulare Pharmakologie (FPM) von Dr. MICHAEL SCHÜMANN durchgeführt.

Eine Lösung von  $U_1^S$  (0.25 mM) wurde gemäß AAV4 mit 50 U/mL *AbPPO4* aktiviert. Nach 1 h wurde die Reaktion gestoppt und die Probe mittels MALDI-TOF-MS gemessen. Die Bildung eines dimerisierten Produkts mit Massen zwischen  $m/z$  2685.28 und 2693.34 wurde bestätigt (Abbildung 4.13). Die Probe wurde dann auf eine Konzentration von 20  $\mu$ M verdünnt und mit einer pikoTip-Säule (75  $\mu$ m x 50 cm, Agilent Poroshell 120 EC-C18) mit einem Gradienten von 5.5-20.5 % Acetonitril in Wasser (0.1 % FA) über 30 min (250 nL/min Durchfluss bei 50 °C) mittels LC-ESI-MS/MS gemessen. Da die Dimersignale mit einer Ladung von 2 durch Unimer-Signale überlagert werden, wurden die MS-Signale mit einer Ladung von 3 analysiert. Bei einer Retentionszeit von 22.2, 22.9 und 27.0 min wurden Signale mit  $m/z$  897.4465 (Abbildung E 41a und b) detektiert, die einem  $U_1^S$ - $U_1^S$ -Dimer im Oxidationszustand des Chinons (2689.3096 Da) bei  $z = 3$  entsprechen. Diese Ionen wurden mittels EThcD mit 30 % Kollisionsenergie fragmentiert (Abbildung E 41c und d). Im resultierenden Fragmentierungsspektrum konnten 44 % der entsprechenden  $y$ ,  $b$  und  $c$ ,  $z$  Ionen für das Dimer mit einer mittleren Genauigkeit von  $m/z$   $0.008 \pm 0.009$  ( $4.8 \pm 6.1$  ppm, siehe Tabelle E 2) gefunden werden.



**Abbildung E 41.** LC-ESI-MS-Analyse des  $U_1^S$ - $U_1^S$  Dimers bei  $t_R$  22.2 min. a) Das Spektrum (Ausschnitt b) zeigt das Signal des  $U_1^S$ - $U_1^S$  Dimers bei  $m/z$  897.4465 ( $z = 3$ ). c) LC-ESI-MS/MS Fragmentierungsspektrum des Vorläuferions  $m/z$  897.4465. d) Der Ausschnitt des LC-ESI-MS/MS-Spektrums zeigt die Fragmente 3 ( $m/z$  1466.69) und 4 ( $m/z$  1225.64).



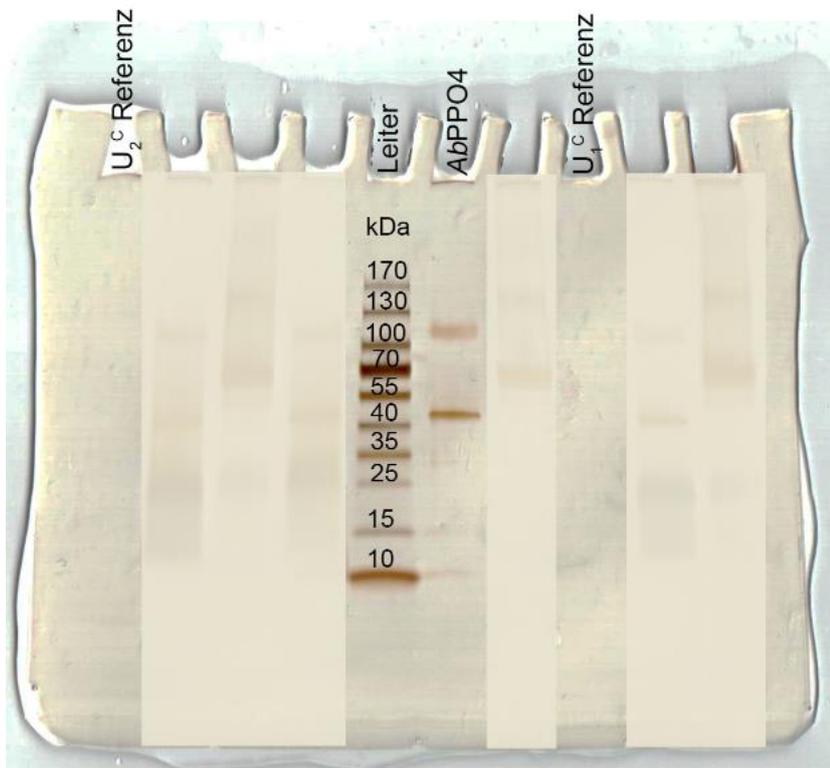
**Abbildung E 42.** Fragmentierungsschema des  $U_1^S$ - $U_1^S$  Dimer-Peptids. Die Bezeichnungen der y und b sowie der c und z Fragmente kennzeichnen die verschiedenen Ionen, die aus dem Bindungsbruch der N-C=O Peptidbindung bzw. der N- $C_\alpha$  Bindung resultieren.

**Tabelle E 2.** Liste der zugeordneten Fragmentionen der LC-ESI-MS/MS-Messung des  $U_1^S-U_1^S$  Dimers mit  $m/z$  897.445 bei 22,9 min.

Ion	Ladungszustand	berechn. [m/z]	gefunden [m/z]	$\Delta$ [ppm]
b2	z=1	200.1394	200.1393	0.5
b5	z=1	471.2562	471.2560	0.4
b9	z=2 (C13)	1144.5553	1144.5508	3.9
b11	z=1+2H (C13)	2475.2354	2475.2288	2.7
b11	z=2 (C13)	1237.1136	1237.0893	19.6
b11	z=3 (C13)	825.0781	825.0622	19.3
b13	z=2+H (C13)	1294.6390	1294.6243	11.4
c3	z=1	401.2507	401.2502	1.2
c5	z=1	783.4359	783.4360	0.1
c6	z=2	1152.5664	1152.5667	0.3
c7	z=1 (C13)	2433.2238	2433.2189	2.2
c9	z=1+2H	2548.2790	2548.2783	0.3
c10	z=1	2603.2849	2603.2708	5.4
y5	z=1	404.2252	404.2248	1.1
y10	z=2	1154.0536	1154.0534	0.2
y11	z=2 (C13)	1198.0714	1198.0698	1.3
y12	z=2	1246.0960	1246.0948	1.1
y12	z=3	831.0664	831.0660	0.5
y13	z=2+H (C13)	1311.1492	1311.1310	13.9
z5	z=1+H	388.2065	388.2061	1.1
z8	z=1+2H	2292.0891	2292.0879	0.5
z8	z=2	1145.5404	1145.5496	8.8
z8	z=3+2H (C13)	765.0357	765.0230	16.6
z9	z=2+H	1189.5603	1189.5685	6.9
z10	z=1+H (C13)	2604.2643	2604.2651	0.3
z10	z=2	1301.6302	1301.6204	7.5

### 6.6.6 SDS PAGE Referenz zum Zeitpunkt Null

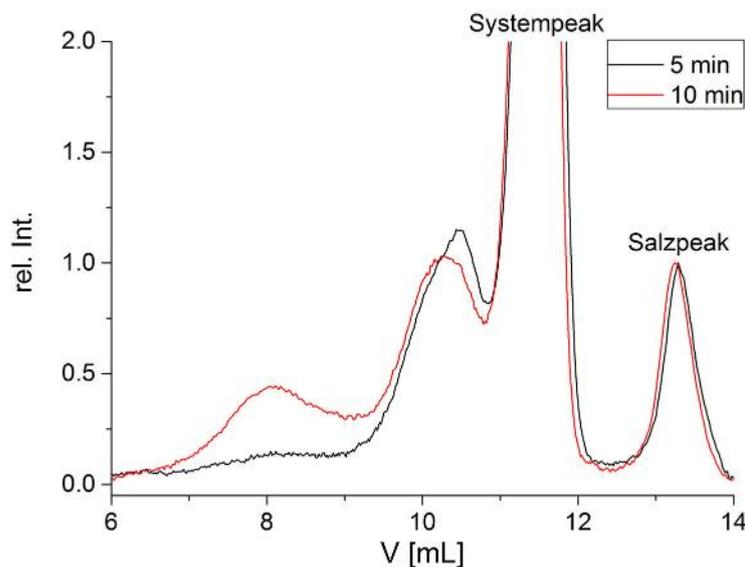
Es wurden Nullpunkt-Referenzmessungen durchgeführt, indem SDS PAGE Messungen von nicht-polymerisierten Unimer-Proben in der gleichen Konzentration wie bei den SDS PAGE Polymerisationsexperimenten in Abschnitt 4.3.1 (15  $\mu$ L Probe aus 0.25 mM Lösung aus  $U_1^c$  und  $U_2^c$ ) erfolgten. Die Abwesenheit von Banden bei den Unimerproben ohne Enzymzugabe zeigt, dass die Multimerisierung der Unimere sofort nach Zugabe des Enzyms beginnt (siehe initiale Proben bei Abbildung 4.18).



**Abbildung E 43.** SDS PAGE Messung der Unimere  $U_1^c$  (rechts) und  $U_2^c$  (links) als Referenz zum Zeitpunkt Null. Irrelevante Proben wurden überdeckt. (Bedingungen: 0.25 mM  $U_1^c$ , 0.25 mM  $U_2^c$ , in Natriumcitratpuffer (17 mM, pH 6.8)).

### 6.6.7 GPC-Messung von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>

Eine 0.75 mM Lösung von U<sub>1</sub><sup>C</sup> wurde gemäß AAV5 unter Verwendung einer AbPPO4-Konzentration von 50 U/mL polymerisiert. Nach unterschiedlichen Reaktionszeiten wurden Proben von 1.5 mL genommen und 13.5  $\mu$ L 6 M HCl zugegeben (resultiert in pH 2 der Probenlösung), um die enzymatische Reaktion zu stoppen. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Für die GPC-Messung wurden die lyophilisierten Proben vollständig in 2 mL Acetatpuffer (100 mM, pH 4.5)/Methanol (4:1, v/v) gelöst, was zu einer Polymerlösung mit einer Konzentration von 0.75 g/L führte. Zwei Molekulargewichtsfractionen sind nach 10 min Reaktionszeit sichtbar. Der niedermolekulare Anteil bei 9-11 mL Elutionsvolumen hat ein maximales Molekulargewicht von  $M_{P,app}=19.4$  kg/mol (siehe Tabelle E 3). Dies entspricht den Ergebnissen der SDS PAGE Messungen (siehe Abschnitt 4.3.1), bei denen eine Hauptbande bei ~20 kDa beobachtet wurde. Der hochmolekulare Anteil bei 6-9 mL Elutionsvolumen hat ein Molekulargewicht von  $M_{P,app}=530$  kg/mol und liegt damit über dem auflösbaren Massenbereich in SDS PAGE. Die Elugramme der wässrigen GPC zeigen einen Systempeak und einen Salzpeak bei einem Elutionsvolumen von 11.4 bzw. 13.2 mL, die allgegenwärtig und für das System charakteristisch sind.



**Abbildung E 44.** GPC-Analyse von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> nach unterschiedlichen Reaktionszeiten.

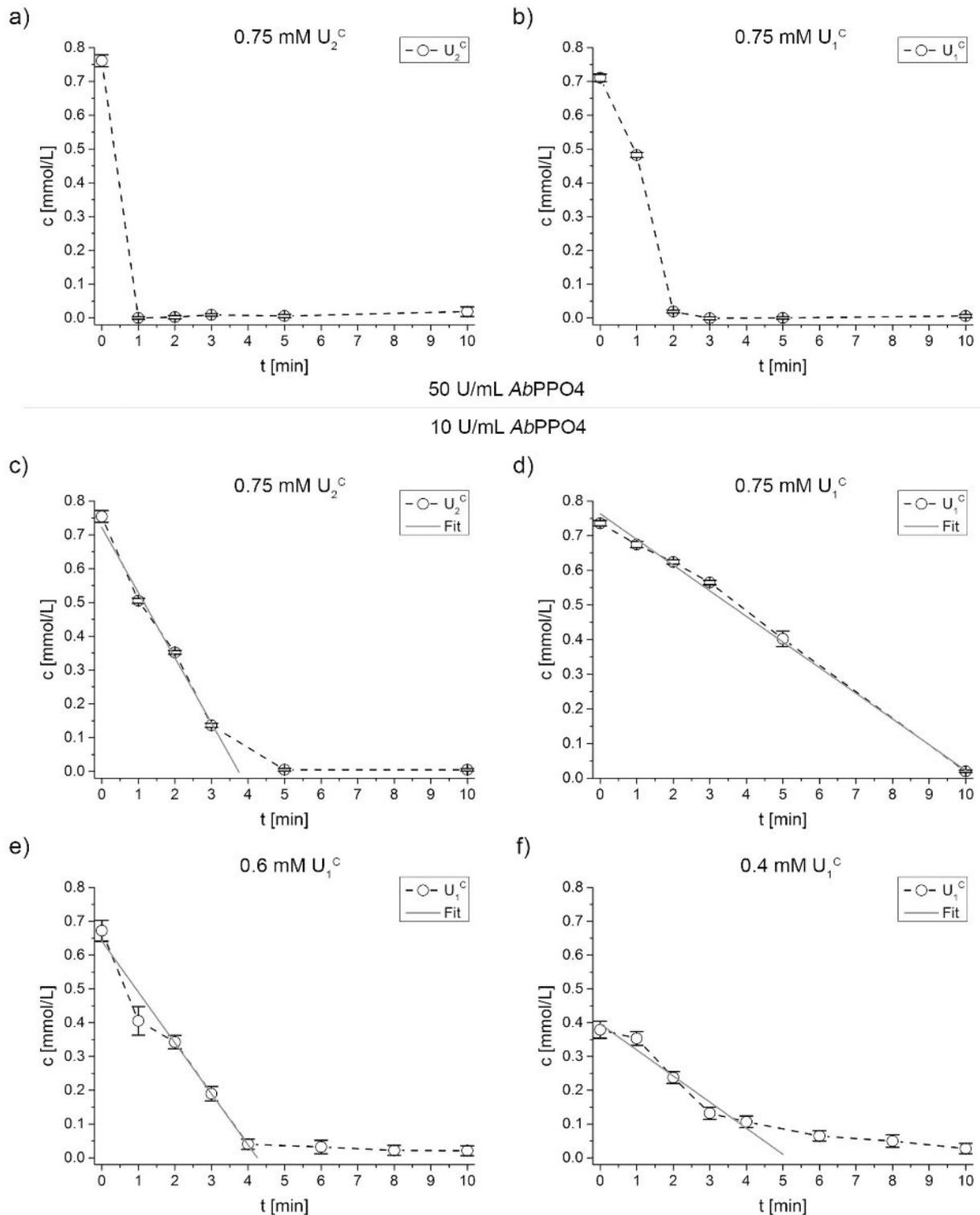
**Tabelle E 3.** Apparentes Peak-Molekulargewicht ( $M_{P,app}$ ) jeder Fraktion der GPC-Messungen.

t	$M_P$ app.(Fraktion1) [g/mol]	$M_P$ app.(Fraktion2) [g/mol]
5 min	14 400	-
10 min	19 400	530 000

### 6.6.8 UV/VIS-spektroskopische Bestimmung des Thiolverbrauchs mit Ellmans Reagenz

Für die Bestimmung der Unimerkonzentration über freie Thiole wurden Lösungen von  $U_1^C$  und  $U_2^C$  nach AAV4 polymerisiert, zu bestimmten Zeitpunkten 70  $\mu\text{L}$  Proben entnommen und mit 3.5  $\mu\text{L}$  1.08 M HCl versetzt (resultiert in pH 2 der Probenlösung), um die enzymatische Reaktion zu stoppen. Von diesen Proben wurden jeweils 20  $\mu\text{L}$  für die photometrische Zweifachbestimmung der Absorption entnommen und mit 180  $\mu\text{L}$  Messlösung (2 mM DTNB in 50 mM NaOAc/1 M Tris-Puffer (pH 8.0)/Reinstwasser, 1:2:15, v/v) versetzt. Als Referenz wurden 20  $\mu\text{L}$  derselben Probe mit 180  $\mu\text{L}$  Referenzlösung (50 mM NaOAc/1 M Tris-Puffer (pH 8.0)/Reinstwasser, 1:2:15, v/v) ohne DTNB versetzt, um die Absorption aller anderen Komponenten zu bestimmen. Nach der Messung der Absorption bei 412 nm im Microplate wurde die Referenzabsorption von der Probenabsorption subtrahiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels externer Kalibrierung, die auf demselben Weg wie die Probenmessung, durch Messung von Lösungen mit bekannten Unimerkonzentrationen, durchgeführt wurde.

Es wurden Messungen mit Enzymkonzentrationen von 50 und zusätzlich 10 U/mL *AbPPO4* bei einer Unimerkonzentration von 0.75 mM vorgenommen, da der messbare Zeitraum unter den Standard-Polymerisationsbedingungen von 50 U/mL *AbPPO4* sehr kurz war. Zudem wurden bei einer Enzymkonzentration von 10 U/mL *AbPPO4* weitere Unimerkonzentrationen von 0.6 und 0.4 mM  $U_1^C$  gemessen, um einen Konzentrationseinfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit zu untersuchen. Die c-t-Diagramme der Messungen sind in Abbildung E 45 dargestellt. Aus der Steigung der an die Daten gefitteten Regressionsgeraden wurde die Geschwindigkeitskonstante der jeweiligen Reaktion ermittelt (siehe Tabelle E 4). Diese stimmt für die Reaktionen bei unterschiedlichen Unimerkonzentrationen nicht überein und zeigt somit, dass keine Reaktion nullter Ordnung vorliegt.



**Abbildung E 45.** Thiolverbrauch der Polymerisationen von  $U_1^C$  und  $U_2^C$ . Bestimmung durch UV/VIS-Spektroskopie bei 412 nm mit externer Kalibrierung mittels Ellmans Reagenz. a) Polymerisation von 0.75 mM  $U_2^C$  mit 50 U/mL AbPPO4. b) Polymerisation von 0.75 mM  $U_1^C$  mit 50 U/mL AbPPO4. c) Polymerisation von 0.75 mM  $U_2^C$  mit 10 U/mL AbPPO4. d) Polymerisation von 0.75 mM  $U_1^C$  mit 50 U/mL AbPPO4. e) Polymerisation von 0.6 mM  $U_1^C$  mit 10 U/mL AbPPO4. f) Polymerisation von 0.4 mM  $U_1^C$  mit 10 U/mL AbPPO4. Gestrichelte Linien dienen zur Orientierung.

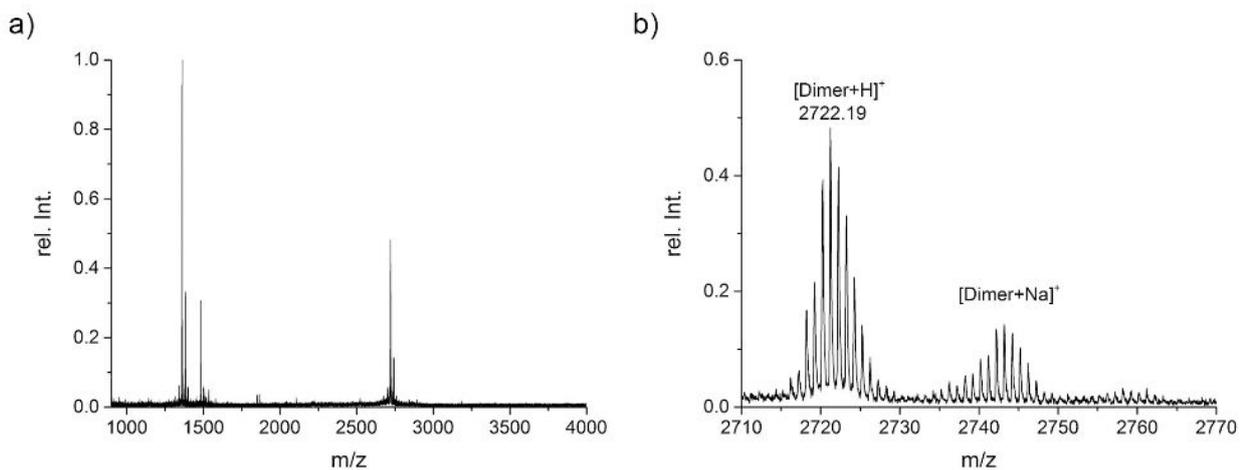
**Tabelle E 4.** Geschwindigkeitskonstanten für die Polymerisationen von  $U_1^C$  bei 10 U/mL AbPPO4. Die Bestimmung erfolgte aus den Regressionsgeraden der c-t-Diagramme.

c [mmol/L]	k [mol/L·s]
0.75	$7.4 \cdot 10^{-5}$
0.6	$1.5 \cdot 10^{-4}$
0.4	$7.7 \cdot 10^{-5}$

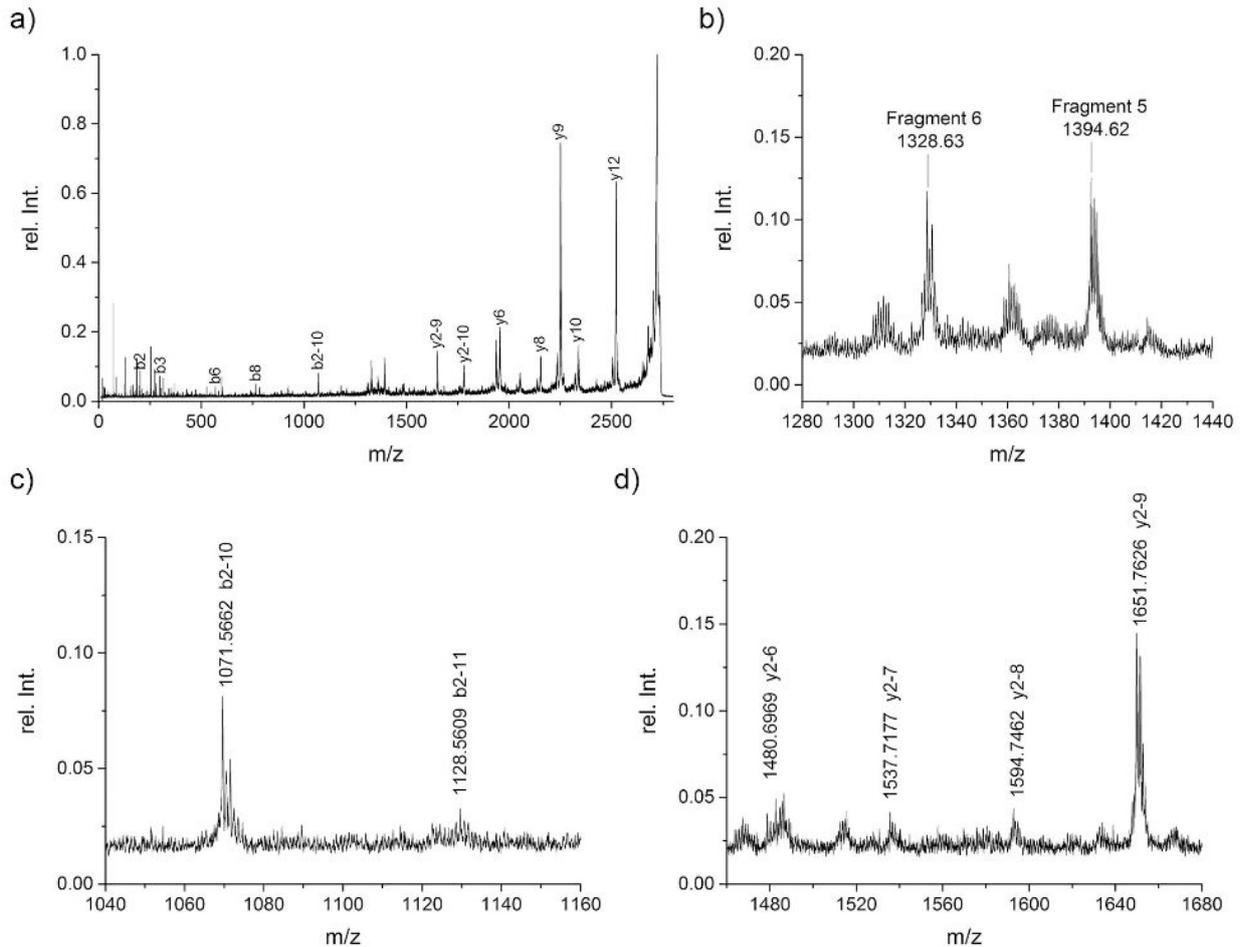
### 6.6.9 MALDI-TOF MS/MS-Messungen der Polymerisationsmischung

Die Messungen erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. EBERHARD KRAUSE am *Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie* (FMP) und wurden von HEIKE STEPHANOWITZ durchgeführt.

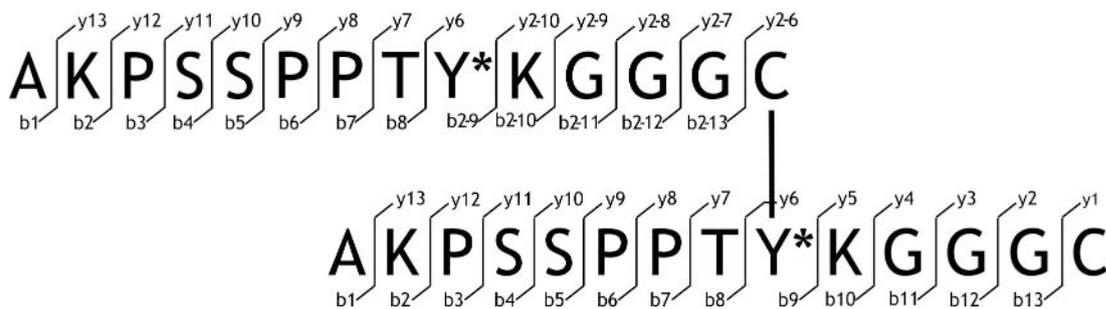
Es wurde Tandem-Massenspektrometrie vom  $U_1^C$ - $U_1^C$  Dimer der Polymerisationsmischung gemessen. Dazu wurde eine 0.25 mM Lösung von  $U_1^C$  für 10 min gemäß AAV4 polymerisiert. Nach Zugabe von 0.9  $\mu$ L 6 M HCl (resultiert in pH 2 der Probenlösung) zur Beendigung der enzymatischen Reaktion zu 100  $\mu$ L der Reaktionsmischung, wurde das Gemisch lyophilisiert und in ACN/Wasser (1:1, v/v) + 0.1 % TFA für die MALDI-Messung resolubilisiert. Im Fragmentierungsspektrum konnten 57 % der entsprechenden y und b Ionen für das  $U_1^C$ - $U_1^C$  Dimer mit einer mittleren Genauigkeit von  $m/z$   $0.03 \pm 0.02$  ( $32.0 \pm 39.7$  ppm) zugeordnet werden (Tabelle E 5).



**Abbildung E 46.** MALDI-TOF-MS-Analyse der Polymerisation von  $U_1^C$  nach 10 min Reaktionszeit. a) Gesamtes Spektrum. b) Der Ausschnitt des Spektrums zeigt die Signale des  $U_1^C$ - $U_1^C$  Dimers. Der intensivste Peak bei  $m/z$  2722.19 wurde für MALDI-TOF-MS/MS Fragmentierung ausgewählt.



**Abbildung E 47.** MALDI-TOF-MS/MS-Fragmentierung. Spektrum vom Vorläuferion bei  $m/z$  2722.19 ( $U_1^C$ - $U_1^C$  Dimer). a) Gesamtes Spektrum mit Markierung einiger y und b Ionen. b) Ausschnitt des Spektrums, der die Signale der Fragmente 5 ( $m/z$  1394.62) und 6 ( $m/z$  1328.63) zeigt. c) Ausschnitt des Spektrums, der die Signale der charakteristischen Fragmentationen b2-10 und b2-11 zeigt. d) Ausschnitt des Spektrums, der die Signale der charakteristischen Fragmentationen y2-6 bis y2-9 zeigt.



**Abbildung E 48.** Fragmentierungsschema des  $U_1^C$ - $U_1^C$  Dimer-Peptids aus der Polymerisation von  $U_1^C$ . Die Bezeichnungen der y und b Fragmente kennzeichnen die verschiedenen Ionen, die aus dem Bindungsbruch der N-C=O Peptidbindung resultieren.

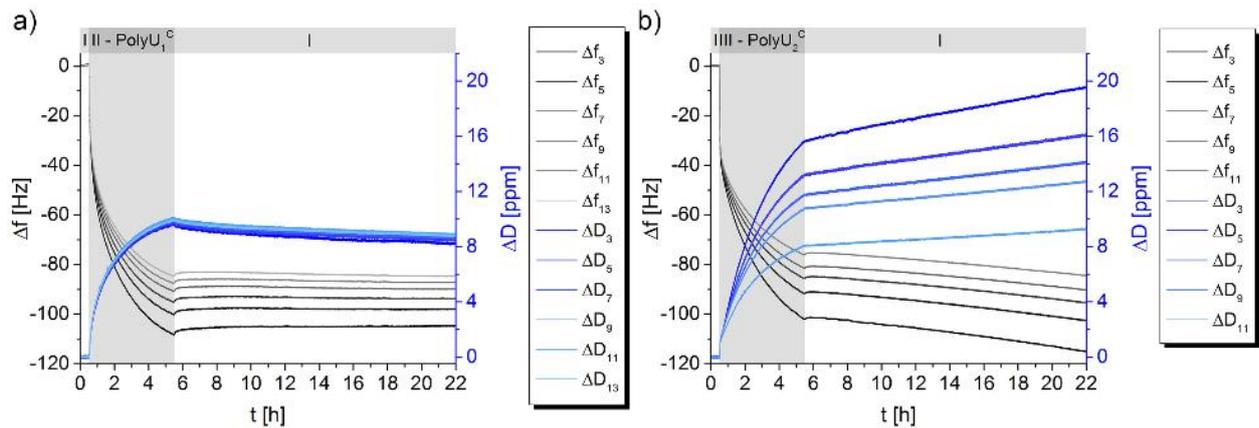
**Tabelle E 5.** Liste der gefundenen y und b Fragmentionen der MALDI-TOF-MS/MS-Messung des  $U_1^C$ - $U_1^C$  Dimers aus der Polymerisation von  $U_1^C$ . Grün hinterlegte Ionen sind charakteristisch für eine Cysteinyldopa-Bindung.

Ion	berechn. [Da]	gefunden [Da]	Ion	berechn. [Da]	gefunden [Da]
b1	72.044	-	y1	121.043	-
b2	200.139	200.168	y2	178.064	-
b3	297.192	297.228	y3	235.086	-
b4	384.224	-	y4	292.107	-
b5	471.256	471.294	y5	420.202	-
b6	568.309	568.358	y6	1956.869	1956.846
b7	665.362	665.364	y7	2057.917	-
b8	766.409	766.419	y8	2154.970	2154.980
b9	2303.076	-	y9	2252.022	2251.982
b10	2431.171	-	y10	2339.054	2339.001
b11	2488.193	-	y11	2426.086	2426.039
b12	2545.214	-	y12	2523.139	2523.095
b13	2602.235	-	y13	2651.234	2651.181
b2-9	943.452	943.455	y2-6	1480.667	1480.697
b2-10	1071.547	1071.566	y2-7	1537.689	1537.718
b2-11	1128.568	1128.561	y2-8	1594.710	1594.746
b2-12	1185.590	-	y2-9	1651.732	1651.763
b2-13	1242.611	-	y2-10	1779.827	1779.834

## 6.6.10 QCM-D-Adsorptionskinetiken auf Aluminiumoxidoberflächen

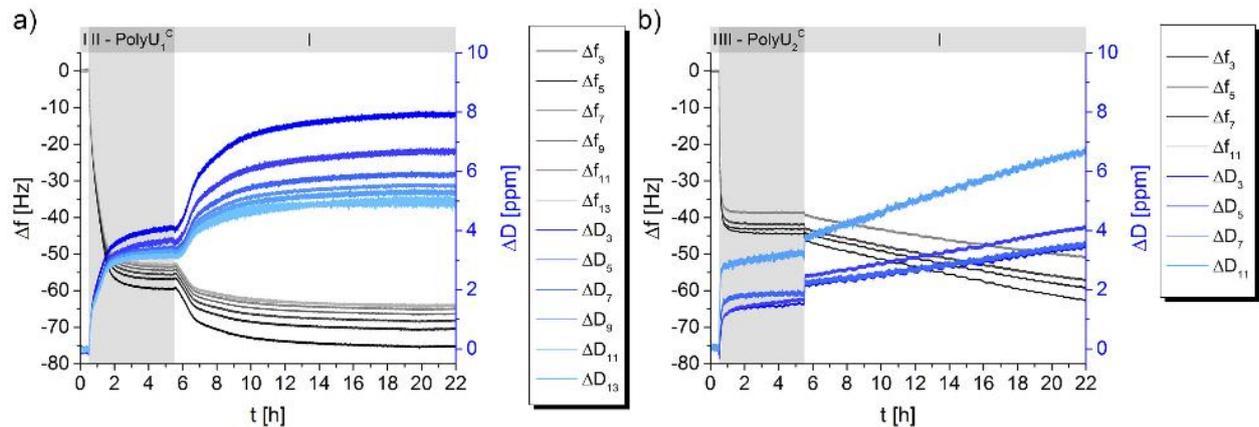
### 6.6.10.1 Adsorption der Polymere auf $Al_2O_3$ -Oberflächen

Zur Messung der Adsorptionskinetiken der Polymere wurden 0.75 mM Lösungen von  $U_1^C$  und  $U_2^C$  nach AAV5 mit 50 U/mL *Ab*PPPO4 für 1 h polymerisiert. Die Polymerisation erfolgte bei pH 6.8 und 1.5 mL der Polymerlösung wurden im Anschluss mit 31.5 mL entgastem Reinstwasser (1:21, v/v) verdünnt, sodass eine Polymerkonzentration von 34.1  $\mu$ M erhalten wurde. Die Na-Citratpufferkonzentration der Messprobe verringerte sich somit auf 0.8 mM und die Konzentration des Puffers zum Equilibrieren und Spülen wurde entsprechend angepasst. Vor jeder Messung wurden die QCM-D-Sensoren gemäß AAV6 gereinigt und die Inkubation erfolgte für jeweils 5 h.



**Abbildung E 49.** QCM-D-Adsorptionskinetiken von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> (a) und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> (b) auf Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Oberflächen. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 0.8 mM (pH 6.8), II – 34.1  $\mu\text{M}$  PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Lösung in 0.8 mM Na-Citratpuffer, III – 34.1  $\mu\text{M}$  PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Lösung in 0.8 mM Na-Citratpuffer).

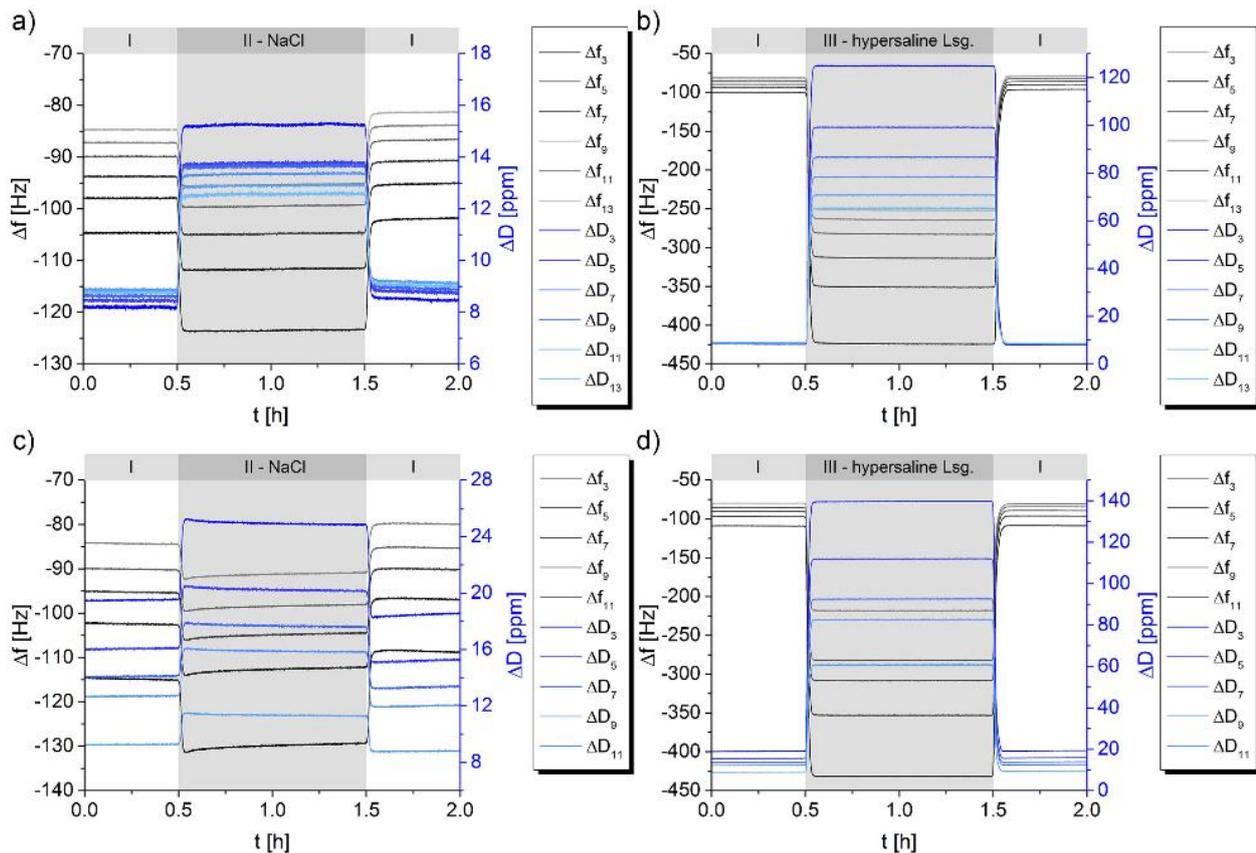
Es wurden zusätzlich die Adsorptionskinetiken der Polymere in 599 mM NaCl-Lösung als Meerwassermodell gemessen. Dazu wurden, analog zur Messung in einfacher Pufferlösung, 1.5 mL PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>- und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Lösung (0.75 mM in 17 mM Na-Citratpuffer bei pH 6.8) für 1 h mit 50 U/mL *Ab*PPPO<sub>4</sub> nach AAV5 polymerisiert und dann im Verhältnis 1:21 mit 31.5 mL entgaster NaCl-Lösung (628 mM) verdünnt. Es wurde somit eine Polymerlösung mit einer Polymerkonzentration von 34.1  $\mu\text{M}$  und einer Salzkonzentration von 599 mM NaCl (+ 0.8 mM Na-Citratpuffer) erhalten.



**Abbildung E 50.** QCM-D-Adsorptionskinetiken von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> (a) und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup> (b) unter Meerwassermodell-Bedingungen auf Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Oberflächen. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. (Bedingungen: I – 599 mM NaCl, II – 34.1  $\mu\text{M}$  PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Lösung in 599 mM NaCl (+ 0.8 mM Na-Citratpuffer), III – 34.1  $\mu\text{M}$  PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Lösung in 599 mM NaCl (+ 0.8 mM Na-Citratpuffer)).

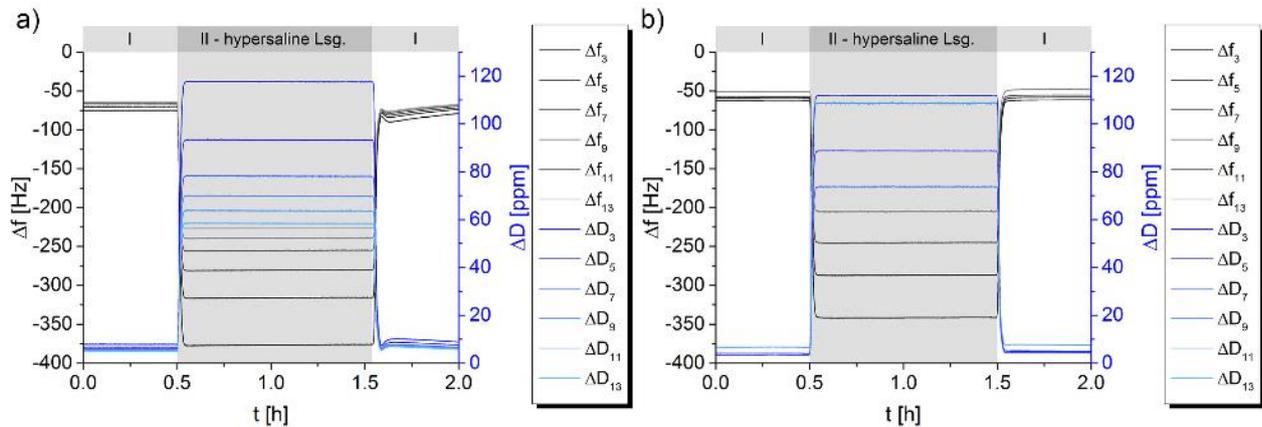
### 6.6.10.2 Desorption der Polymerbeschichtungen von $Al_2O_3$ -Oberflächen

Die mit  $PolyU_1^C$  und  $PolyU_2^C$  beschichteten  $Al_2O_3$ -Substrate wurden in Desorptionsexperimenten mit salzhaltigen Lösungen gespült, um die Stabilität der Polymerfilme zu untersuchen. Dazu erfolgten jeweils für 1 h Spülschritte mit NaCl-Lösung (599 mM) als Meerwasser-Modell und hypersaliner Lösung (4.2 M) als Modell für Totes Meer Wasser.



**Abbildung E 51.** Stabilitätsexperimente von Polymerbeschichtungen auf  $Al_2O_3$ -Oberflächen. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. a) Spülen der  $PolyU_1^C$ -Beschichtung mit NaCl-Lösung. b) Spülen der  $PolyU_1^C$ -Beschichtung mit hypersaliner Lösung. c) Spülen der  $PolyU_2^C$ -Beschichtung mit NaCl-Lösung. d) Spülen der  $PolyU_2^C$ -Beschichtung mit hypersaliner Lösung. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 0.8 mM (pH 6.8), II – 599 mM NaCl-Lösung, III – 4.2 M hypersaline Lösung).

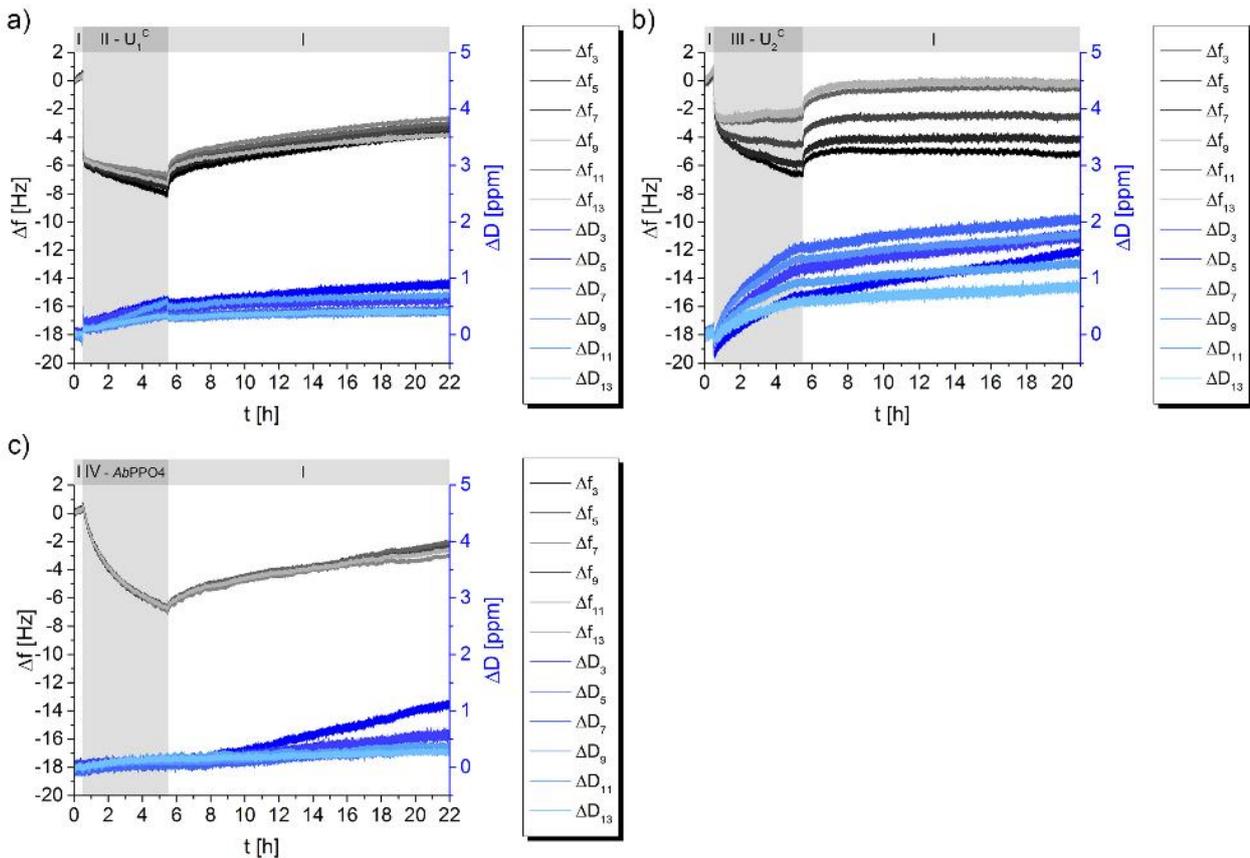
Die unter Meerwasserbedingung adsorbierten PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>- und PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Beschichtungen wurden in weiteren Desorptionsexperimenten ebenfalls durch Spülen mit 4.2 M hypersaliner Lösung auf ihre Stabilität überprüft.



**Abbildung E 52.** Stabilitätsexperimente von unter Meerwassermodellbedingungen beschichteten Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Oberflächen. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. a) Spülen der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung mit hypersaliner Lösung. b) Spülen der PolyU<sub>2</sub><sup>C</sup>-Beschichtung mit hypersaliner Lösung. (Bedingungen: I – 599 mM NaCl, II – 4.2 M hypersaline Lösung).

### 6.6.10.3 Adsorption der Unimer- und AbPPO4-Referenzen auf $Al_2O_3$ -Oberflächen

Kontrollexperimente zur Adsorption der Unimere  $U_1^C$  und  $U_2^C$  sowie des Enzyms *AbPPO4* wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei den Beschichtungsexperimenten der Polymere durchgeführt. Dazu wurden 1.5 mL der 0.75 mM Unimerlösung bzw. 50 U/mL *AbPPO4*-Lösung in 17 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8) mit 31.5 mL entgastem Reinstwasser (1:21, v/v) verdünnt und die QCM-D-Sensoren für 5 h mit den Lösungen inkubiert.

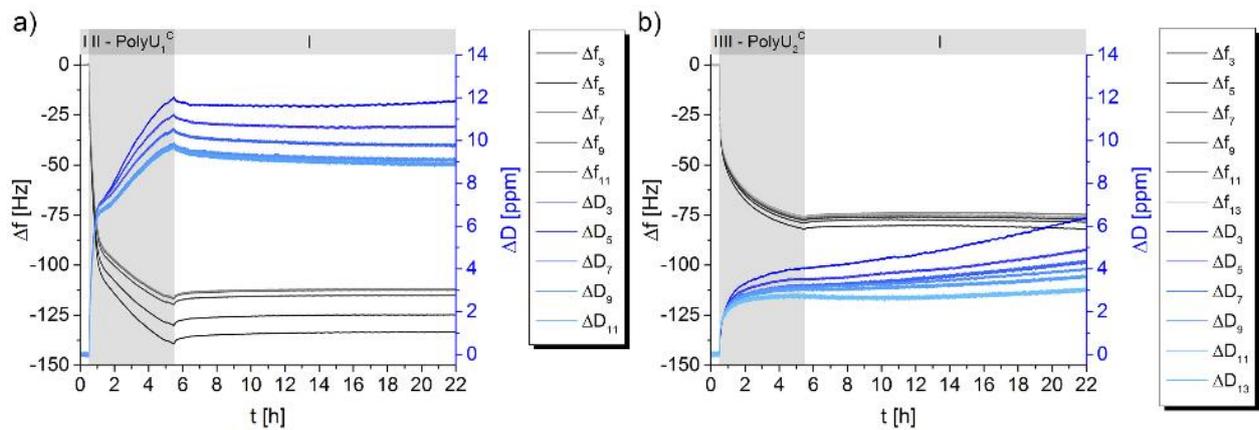


**Abbildung E 53.** QCM-D-Referenzexperimente. Adsorptionskinetiken von  $U_1^C$  (a),  $U_2^C$  (b) und *AbPPO4* (c) auf  $Al_2O_3$ -Oberflächen. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 0.8 mM (pH 6.8), II – 34.1  $\mu M$   $U_1^C$ -Lösung in 0.8 mM Na-Citratpuffer, III – 34.1  $\mu M$   $U_2^C$ -Lösung in 0.8 mM Na-Citratpuffer, IV – 2.3 U/mL *AbPPO4* in 0.8 mM Na-Citratpuffer).

## 6.6.11 QCM-D-Adsorptionskinetiken auf Fluoropolymer-Oberflächen

### 6.6.11.1 Adsorption der Polymere auf Fluoropolymer-Oberflächen

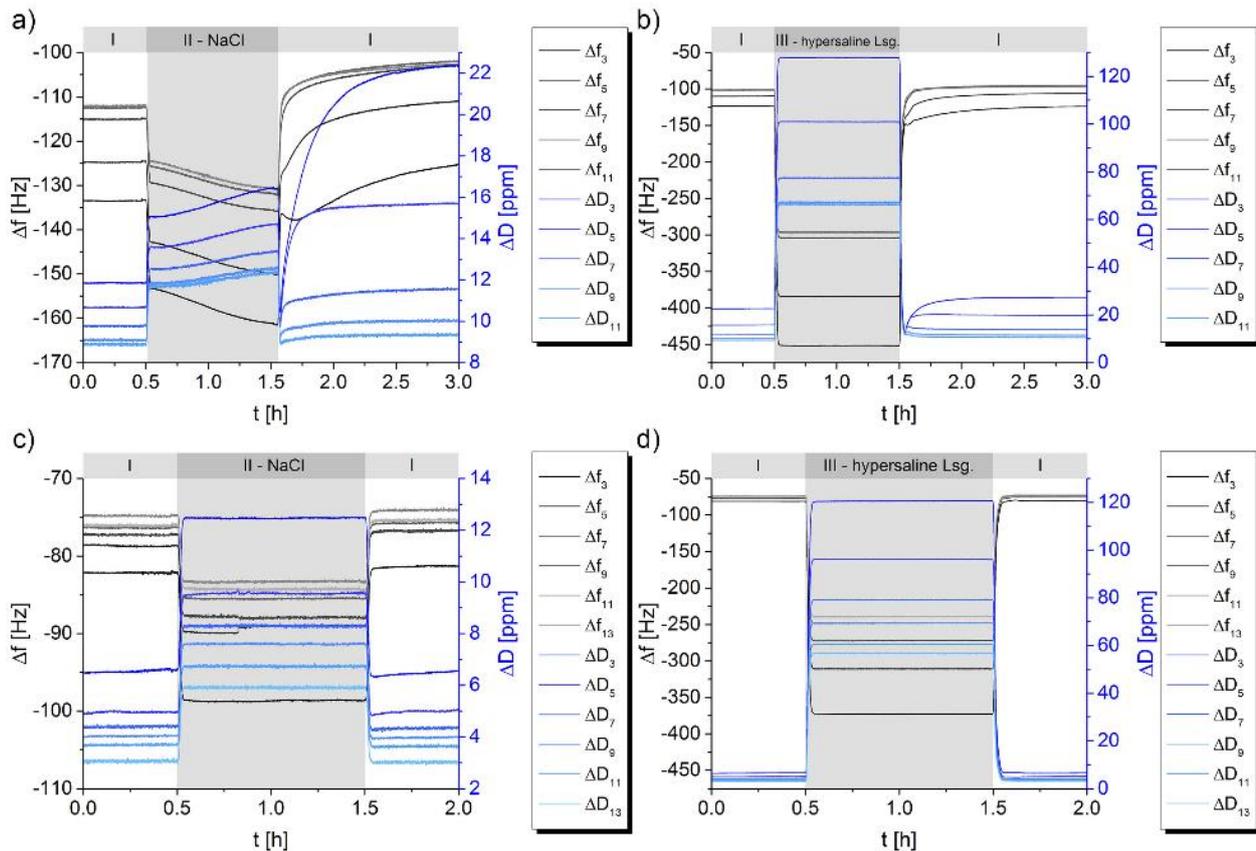
Zur Messung der Adsorptionskinetiken der Polymere wurden 0.75 mM Lösungen von  $U_1^C$  und  $U_2^C$  nach AAV5 mit 50 U/mL *Ab*PPO4 für 1 h polymerisiert. Die Polymerisation erfolgte bei pH 6.8 und 1.5 mL der Polymerlösung wurden im Anschluss mit 31.5 mL entgastem Reinstwasser (1:21, v/v) verdünnt, sodass eine Polymerkonzentration von 34.1  $\mu$ M erhalten wurde. Die Na-Citratpufferkonzentration der Messprobe verringerte sich somit auf 0.8 mM und die Konzentration des Puffers zum Equilibrieren und Spülen wurde entsprechend angepasst. Vor jeder Messung wurden die QCM-D-Sensoren gemäß AAV8 gereinigt und die Inkubation erfolgte für jeweils 5 h.



**Abbildung E 54.** QCM-D-Adsorptionskinetiken von Poly $U_1^C$  (a) und Poly $U_2^C$  (b) auf Fluoropolymer-Oberflächen. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 0.8 mM (pH 6.8), II – 34.1  $\mu$ M Poly $U_1^C$ -Lösung in 0.8 mM Na-Citratpuffer, III – 34.1  $\mu$ M Poly $U_2^C$ -Lösung in 0.8 mM Na-Citratpuffer).

### 6.6.11.2 Desorption der Polymerbeschichtungen von Fluoropolymer-Oberflächen

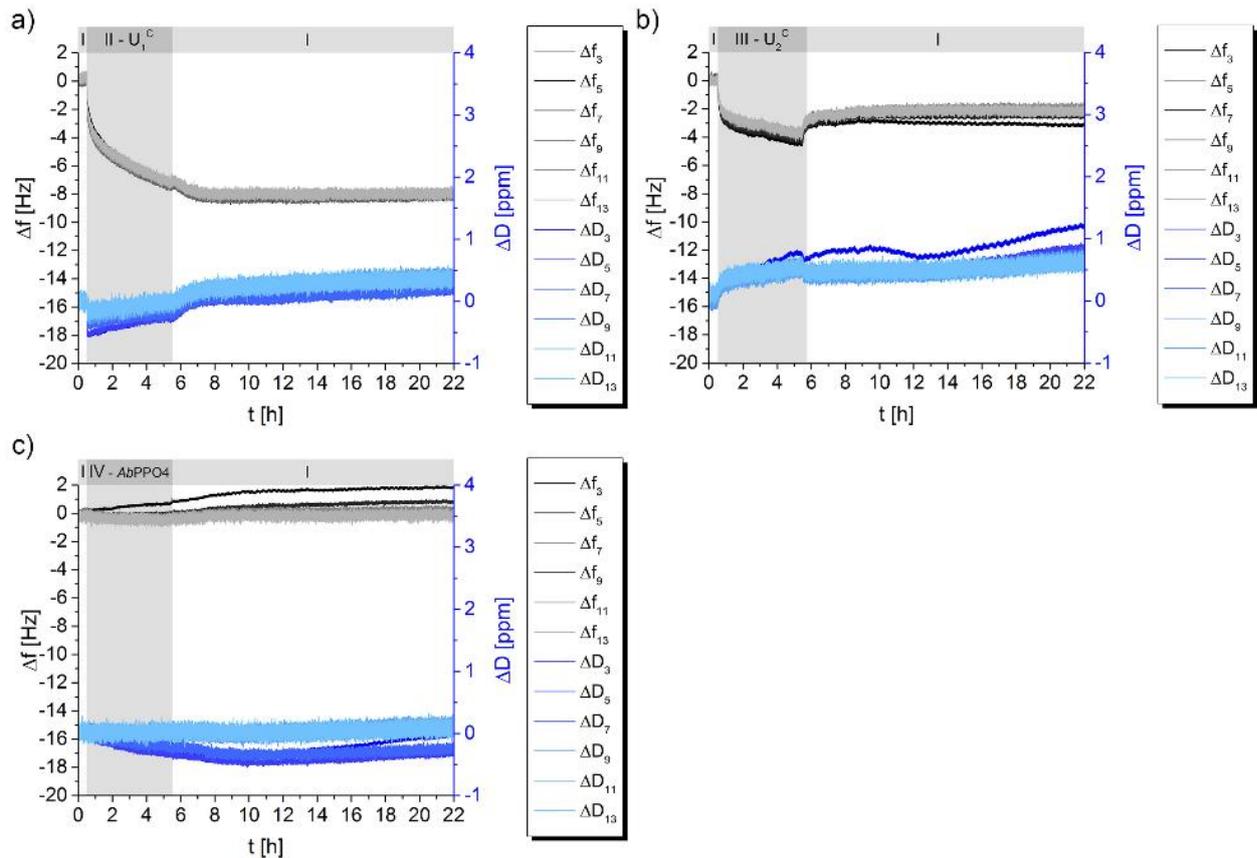
Die mit  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$  und  $\text{PolyU}_2^{\text{C}}$  beschichteten Fluoropolymer-Substrate wurden in Desorptionsexperimenten mit salzhaltigen Lösungen gespült, um die Stabilität der Polymerfilme zu untersuchen. Dazu erfolgten jeweils für 1 h Spülschritte mit NaCl-Lösung (599 mM) als Meerwasser-Modell und hypersaliner Lösung (4.2 M) als Modell für Totes Meer Wasser.



**Abbildung E 55.** Stabilitätsexperimente von Polymerbeschichtungen auf Fluoropolymer-Oberflächen. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. a) Spülen der  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ -Beschichtung mit NaCl-Lösung. b) Spülen der  $\text{PolyU}_1^{\text{C}}$ -Beschichtung mit hypersaliner Lösung. c) Spülen der  $\text{PolyU}_2^{\text{C}}$ -Beschichtung mit NaCl-Lösung. d) Spülen der  $\text{PolyU}_2^{\text{C}}$ -Beschichtung mit hypersaliner Lösung. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 0.8 mM (pH 6.8), II – 599 mM NaCl-Lösung, III – 4.2 M hypersaline Lösung).

### 6.6.11.3 Adsorption der Unimer- und AbPPO<sub>4</sub>-Referenzen auf Fluoropolymer-Oberflächen

Kontrollexperimente zur Adsorption der Unimere  $U_1^C$  und  $U_2^C$  sowie des Enzyms *AbPPO*<sub>4</sub> wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei den Beschichtungsexperimenten der Polymere durchgeführt. Dazu wurden 1.5 mL der 0.75 mM Unimerlösung bzw. 50 U/mL *AbPPO*<sub>4</sub>-Lösung in 17 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8) mit 31.5 mL entgastem Reinstwasser (1:21, v/v) verdünnt und die QCM-D-Sensoren für 5 h mit den Lösungen inkubiert.

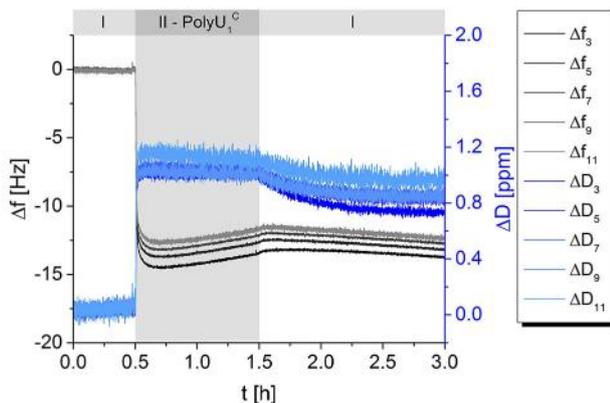


**Abbildung E 56.** QCM-D-Referenzexperimente. Adsorptionskinetiken von  $U_1^C$  (a),  $U_2^C$  (b) und *AbPPO*<sub>4</sub> (c) auf Fluoropolymer-Oberflächen. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 0.8 mM (pH 6.8), II – 34.1  $\mu$ M  $U_1^C$ -Lösung in 0.8 mM Na-Citratpuffer, III – 34.1  $\mu$ M  $U_2^C$ -Lösung in 0.8 mM Na-Citratpuffer, IV – 2.3 U/mL *AbPPO*<sub>4</sub> in 0.8 mM Na-Citratpuffer).

## 6.6.12 QCM-D-Adsorptionskinetiken auf SiO<sub>2</sub>-Oberflächen

### 6.6.12.1 Adsorption von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> auf SiO<sub>2</sub>-Oberflächen bei pH 3.0

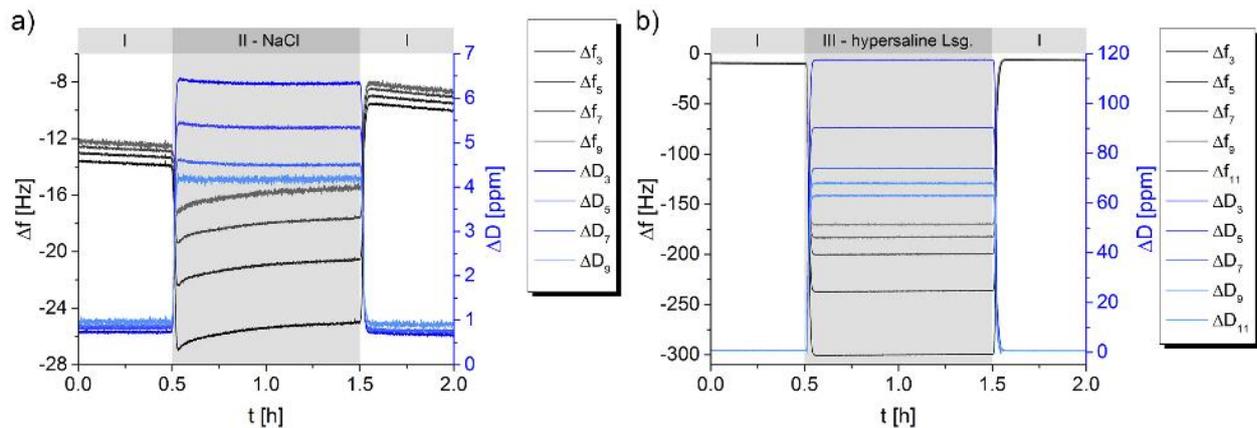
Das Unimer U<sub>1</sub><sup>C</sup> wurde nach AAV5 mit 50 U/mL AbPPO4 bei einer Konzentration von 0.75 mM für 1 h in 17 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8) polymerisiert. Anschließend wurden zu 454.7 µL der Polymerisationslösung 136.3 µL Na-Citratpuffer (0.3 M, pH 1.5) zugegeben, um den pH Wert auf 3.0 zu senken. Die Lösung wurde mit 9.41 mL entgastem Reinstwasser (1:16.05, v/v) auf 10 mL verdünnt, sodass eine Polymerkonzentration von 34.1 µM erhalten wurde. Die Konzentration des Puffers verringerte sich auf 4.9 mM und die gleiche Mischung wurde als Puffer zum Equilibrieren und Spülen der Sensoren genutzt. Die Sensoren wurden vor jeder Messung nach AAV7 gereinigt und die Inkubation der Polymerlösung erfolgte für 1 h.



**Abbildung E 57.** QCM-D-Adsorptionskinetik von PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> auf einer SiO<sub>2</sub>-Oberfläche bei pH 3.0. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-11$  dargestellt. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 4.9 mM (pH 3.0), II – 34.1 µM PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Lösung in 4.9 mM Na-Citratpuffer (pH 3.0)).

### 6.6.12.2 Desorption der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung bei pH 3.0 von SiO<sub>2</sub>-Oberflächen

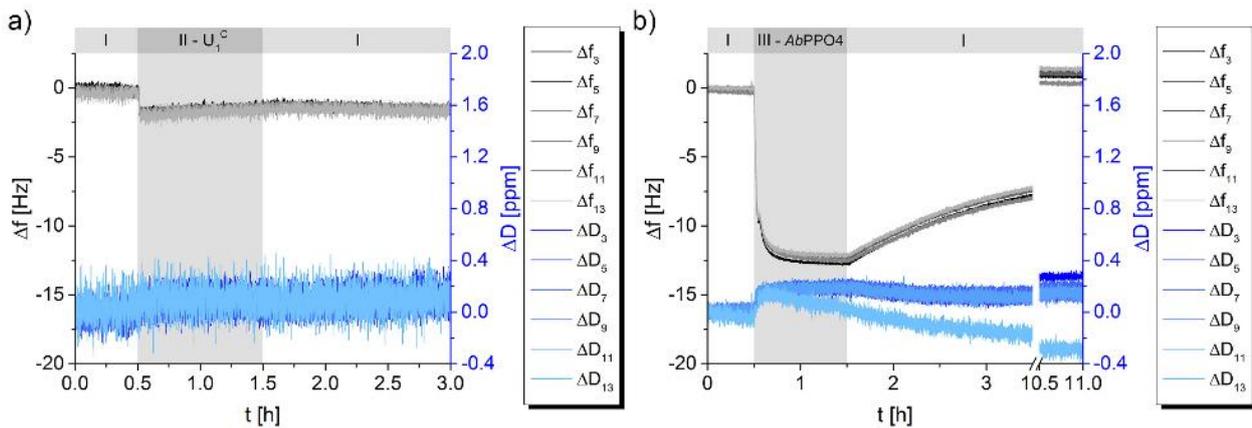
Das mit PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> bei pH 3.0 beschichtete SiO<sub>2</sub>-Substrat wurde in Desorptionsexperimenten mit salzhaltigen Lösungen gespült, um die Stabilität des Polymerfilms zu untersuchen. Dazu erfolgten jeweils für 1 h Spülschritte mit NaCl-Lösung (599 mM) als Meerwasser-Modell und hypersaliner Lösung (4.2 M) als Modell für Totes Meer Wasser.



**Abbildung E 58.** Stabilitätsexperimente der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung auf einer SiO<sub>2</sub>-Oberfläche, beschichtet bei pH 3.0. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-11$  dargestellt. a) Spülen der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung mit NaCl-Lösung. b) Spülen der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung mit hypersaliner Lösung. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 4.9 mM (pH 3.0), II – 599 mM NaCl-Lösung, III – 4.2 M hypersaline Lösung).

### 6.6.12.3 Adsorption der Unimer- und AbPPO<sub>4</sub>-Referenz auf SiO<sub>2</sub>-Oberflächen bei pH 3.0

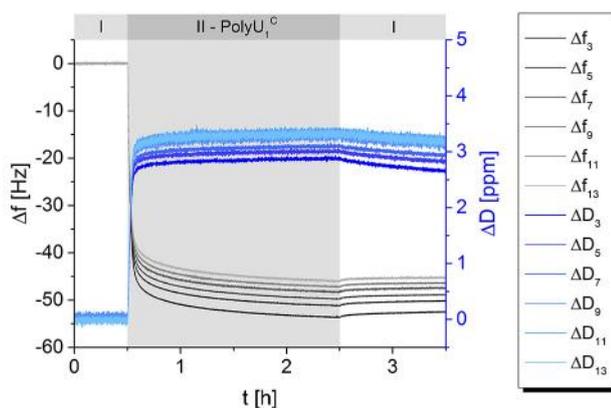
Die Adsorption des Unimers U<sub>1</sub><sup>C</sup> und des Enzyms AbPPO<sub>4</sub> bei pH 3.0 wurde in Kontrollexperimenten unter den gleichen Bedingungen wie bei dem Beschichtungsexperiment mit PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> (Abschnitt 6.6.12.1) durchgeführt. Dazu wurden Lösungen mit 0.75 mM U<sub>1</sub><sup>C</sup> sowie 50 U/mL AbPPO<sub>4</sub> in 17 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8) hergestellt. Zu 454.7  $\mu$ L dieser Lösungen wurden 136.3  $\mu$ L Na-Citratpuffer (0.3 M, pH 1.5) hinzugegeben, die Mischungen mit 9.41 mL entgastem Reinstwasser (1:16.05, v/v) auf 10 mL verdünnt und die QCM-D-Sensoren für 1 h mit den resultierenden Lösungen inkubiert.



**Abbildung E 59.** QCM-D-Adsorptionskinetiken der Referenzen  $U_1^C$  (a) und  $AbPPO4$  (b) auf  $SiO_2$ -Oberflächen bei pH 3.0. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 4.9 mM (pH 3.0), II – 34.1  $\mu M$   $U_1^C$ -Lösung in 4.9 mM Na-Citratpuffer (pH 3.0), III – 2.3 U/mL  $AbPPO4$  in 4.9 mM Na-Citratpuffer (pH 3.0)).

#### 6.6.12.4 Adsorption von $PolyU_1^C$ auf $SiO_2$ -Oberflächen bei pH 5.5

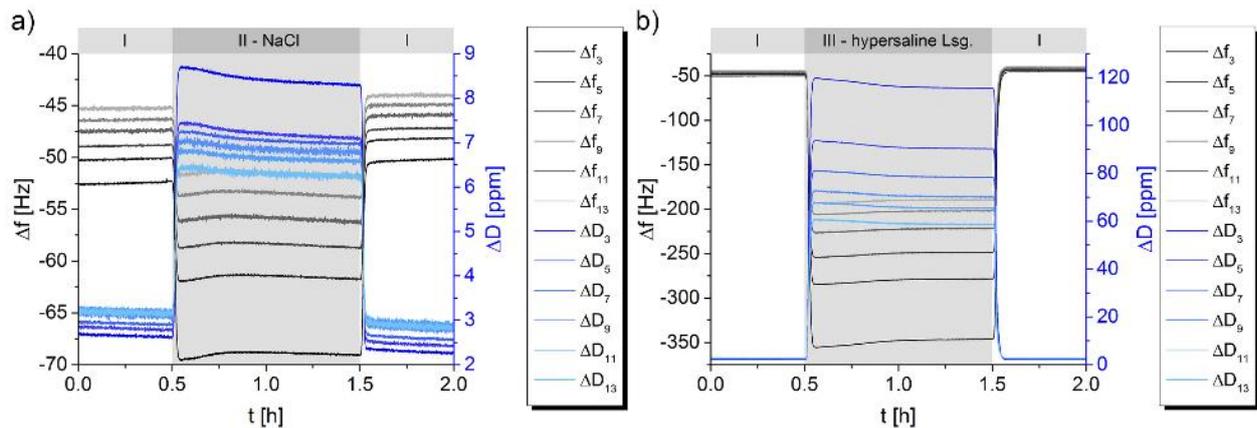
Das Unimer  $U_1^C$  wurde nach AAV5 mit 50 U/mL  $AbPPO4$  bei einer Konzentration von 0.75 mM für 1 h in 17 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8) polymerisiert. Anschließend wurden zu 636.0  $\mu L$  der Polymerisationslösung 110.5  $\mu L$  Na-Citratpuffer (0.3 M, pH 5.0) und 22.4  $\mu L$  Na-Citratpuffer (0.3 M, pH 1.5) zugegeben, um den pH Wert auf 5.5 zu senken. Die Lösung wurde mit 13.23 mL entgastem Reinstwasser (1:17.21, v/v) auf 14 mL verdünnt, sodass eine Polymerkonzentration von 34.1  $\mu M$  erhalten wurde. Die Konzentration des Puffers verringerte sich auf 3.6 mM und die gleiche Mischung wurde als Puffer zum Equilibrieren und Spülen der Sensoren genutzt. Die Sensoren wurden vor jeder Messung nach AAV7 gereinigt und die Inkubation der Polymerlösung erfolgte für 2 h.



**Abbildung E 60.** QCM-D-Adsorptionskinetik von  $PolyU_1^C$  auf einer  $SiO_2$ -Oberfläche bei pH 5.5. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 3.6 mM (pH 5.5), II – 34.1  $\mu M$   $PolyU_1^C$ -Lösung in 3.6 mM Na-Citratpuffer (pH 5.5)).

### 6.6.12.5 Desorption der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung bei pH 5.5 von SiO<sub>2</sub>-Oberflächen

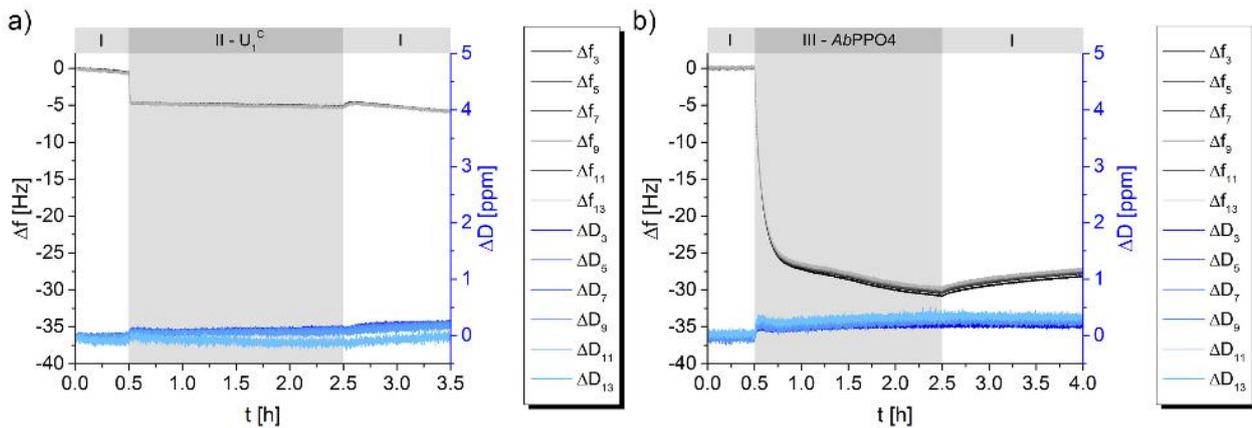
Das mit PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> bei pH 5.5 beschichtete SiO<sub>2</sub>-Substrat wurde in Desorptionsexperimenten mit salzhaltigen Lösungen gespült, um die Stabilität des Polymerfilms zu untersuchen. Dazu erfolgten jeweils für 1 h Spülschritte mit NaCl-Lösung (599 mM) als Meerwasser-Modell und hypersaliner Lösung (4.2 M) als Modell für Totes Meer Wasser.



**Abbildung E 61.** Stabilitätsexperimente der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung auf einer SiO<sub>2</sub>-Oberfläche, beschichtet bei pH 5.5. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. a) Spülen der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung mit NaCl-Lösung. b) Spülen der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung mit hypersaliner Lösung. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 3.6 mM (pH 5.5), II – 599 mM NaCl-Lösung, III – 4.2 M hypersaline Lösung).

### 6.6.12.6 Adsorption der Unimer- und AbPPO4-Referenz auf SiO<sub>2</sub>-Oberflächen bei pH 5.5

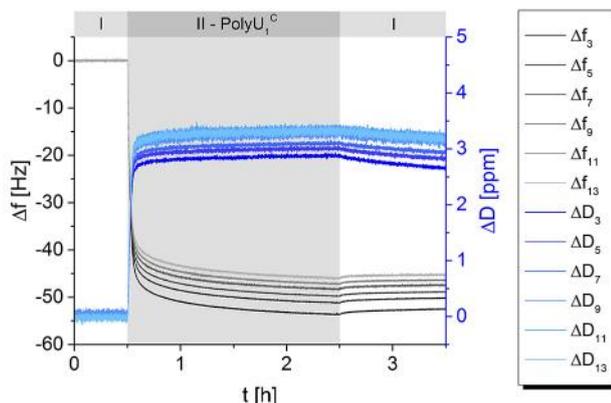
Die Adsorption des Unimers U<sub>1</sub><sup>C</sup> und des Enzyms AbPPO4 bei pH 5.5 wurde in Kontrollexperimenten unter den gleichen Bedingungen wie bei dem Beschichtungsexperiment mit PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> (Abschnitt 6.6.12.4) durchgeführt. Dazu wurden Lösungen mit 0.75 mM U<sub>1</sub><sup>C</sup> sowie 50 U/mL AbPPO4 in 17 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8) hergestellt. Zu 636.0  $\mu$ L dieser Lösungen wurden 110.5  $\mu$ L Na-Citratpuffer (0.3 M, pH 5.0) und 22.4  $\mu$ L Na-Citratpuffer (0.3 M, pH 1.5) hinzugegeben, die Mischungen mit 13.23 mL entgastem Reinstwasser (1:17.21, v/v) auf 14 mL verdünnt und die QCM-D-Sensoren für 2 h mit den resultierenden Lösungen inkubiert.



**Abbildung E 62.** QCM-D-Adsorptionskinetiken der Referenzen  $U_1^C$  (a) und  $AbPPO4$  (b) auf  $SiO_2$ -Oberflächen bei pH 5.5. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 3.6 mM (pH 5.5), II – 34.1  $\mu M$   $U_1^C$ -Lösung in 3.6 mM Na-Citratpuffer (pH 5.5), III – 2.3 U/mL  $AbPPO4$  in 3.6 mM Na-Citratpuffer (pH 5.5)).

### 6.6.12.7 Adsorption von $PolyU_1^C$ auf $SiO_2$ -Oberflächen bei pH 6.8

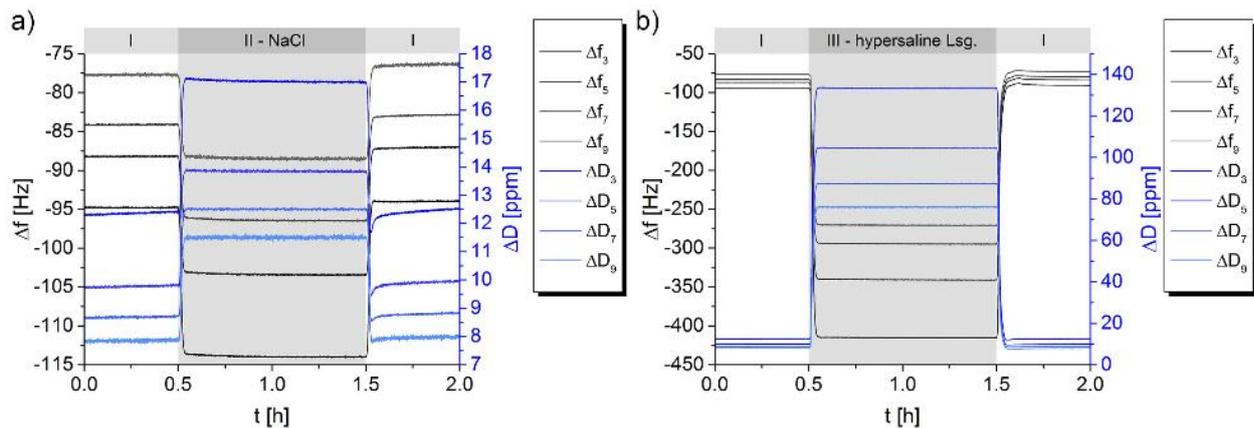
Das Unimer  $U_1^C$  wurde nach AAV5 mit 50 U/mL  $AbPPO4$  bei einer Konzentration von 0.75 mM für 1 h in 17 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8) polymerisiert. Anschließend wurden 1.5 mL der Polymerisationslösung mit 31.5 mL entgastem Reinstwasser (1:21, v/v) auf 33 mL verdünnt, sodass eine Polymerkonzentration von 34.1  $\mu M$  erhalten wurde. Die Konzentration des Puffers verringerte sich auf 0.8 mM und die gleiche Konzentration wurde für den Puffer zum Equilibrieren und Spülen der Sensoren genutzt. Die Sensoren wurden vor jeder Messung nach AAV7 gereinigt und die Inkubation der Polymerlösung erfolgte für 5 h.



**Abbildung E 63.** QCM-D-Adsorptionskinetik von  $PolyU_1^C$  auf einer  $SiO_2$ -Oberfläche bei pH 6.8. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-9$  dargestellt. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 0.8 mM (pH 6.8), II – 34.1  $\mu M$   $PolyU_1^C$ -Lösung in 0.8 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8)).

### 6.6.12.8 Desorption der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung bei pH 6.8 von SiO<sub>2</sub>-Oberflächen

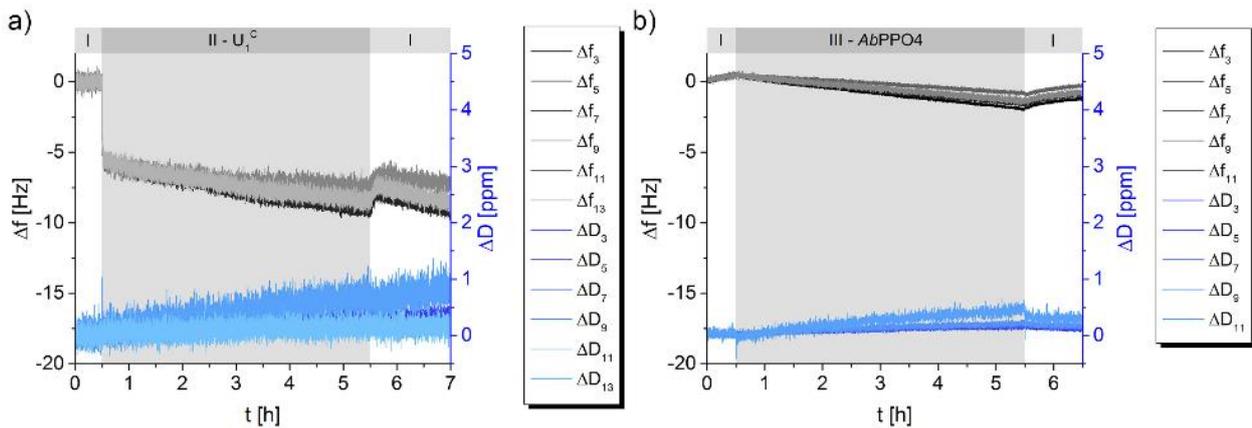
Das mit PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> bei pH 6.8 beschichtete SiO<sub>2</sub>-Substrat wurde in Desorptionsexperimenten mit salzhaltigen Lösungen gespült, um die Stabilität des Polymerfilms zu untersuchen. Dazu erfolgten jeweils für 1 h Spülschritte mit NaCl-Lösung (599 mM) als Meerwasser-Modell und hypersaliner Lösung (4.2 M) als Modell für Totes Meer Wasser.



**Abbildung E 64.** Stabilitätsexperimente der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung auf einer SiO<sub>2</sub>-Oberfläche, beschichtet bei pH 6.8. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-9$  dargestellt. a) Spülen der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung mit NaCl-Lösung. b) Spülen der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung mit hypersaliner Lösung. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 0.8 mM (pH 6.8), II – 599 mM NaCl-Lösung, III – 4.2 M hypersaline Lösung).

### 6.6.12.9 Adsorption der Unimer- und AbPPO4-Referenz auf SiO<sub>2</sub>-Oberflächen bei pH 6.8

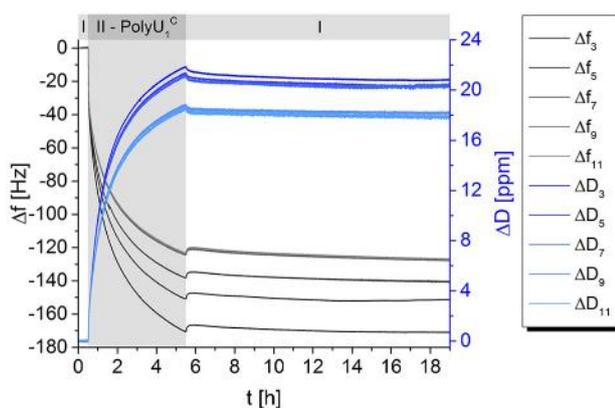
Die Adsorption des Unimers U<sub>1</sub><sup>C</sup> und des Enzyms AbPPO4 bei pH 6.8 wurde in Kontrollexperimenten unter den gleichen Bedingungen wie bei dem Beschichtungsexperiment mit PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> (Abschnitt 6.6.12.7) durchgeführt. Dazu wurden Lösungen mit 0.75 mM U<sub>1</sub><sup>C</sup> sowie 50 U/mL AbPPO4 in 17 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8) hergestellt und diese mit 31.5 mL entgastem Reinstwasser (1:21, v/v) auf 33 mL verdünnt. Es folgte eine Inkubation der QCM-D-Sensoren mit den resultierenden Lösungen für 5 h.



**Abbildung E 65.** QCM-D-Adsorptionskinetiken der Referenzen  $U_1^C$  (a) und  $AbPPO4$  (b) auf  $SiO_2$ -Oberflächen bei pH 6.8. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 0.8 mM (pH 6.8), II – 34.1  $\mu M$   $U_1^C$ -Lösung in 0.8 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8), III – 2.3 U/mL  $AbPPO4$  in 0.8 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8)).

#### 6.6.12.10 Adsorption von $PolyU_1^C$ auf $SiO_2$ -Oberflächen bei pH 8.0

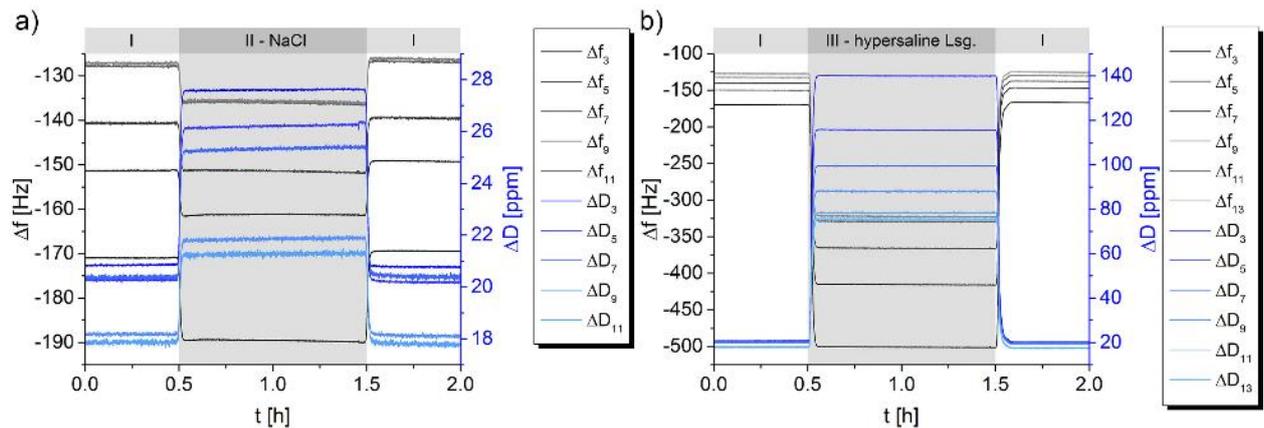
Das Unimer  $U_1^C$  wurde nach AAV5 mit 50 U/mL  $AbPPO4$  bei einer Konzentration von 0.75 mM für 1 h in 17 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8) polymerisiert. Anschließend wurden zu 1.5 mL der Polymerisationslösung 118.7  $\mu L$  Na-Phosphatpuffer (0.3 M, pH 8.2) zugegeben, um den pH Wert auf 8.0 zu erhöhen. Die Lösung wurde mit 31.5 mL entgastem Reinstwasser (1:19.39, v/v) auf 33 mL verdünnt, sodass eine Polymerkonzentration von 34.1  $\mu M$  erhalten wurde. Die Konzentration des Puffers verringerte sich auf 1.9 mM und die gleiche Mischung wurde als Puffer zum Equilibrieren und Spülen der Sensoren genutzt. Die Sensoren wurden vor jeder Messung nach AAV7 gereinigt und die Inkubation der Polymerlösung erfolgte für 5 h.



**Abbildung E 66.** QCM-D-Adsorptionskinetik von  $PolyU_1^C$  auf einer  $SiO_2$ -Oberfläche bei pH 8.0. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-11$  dargestellt. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 1.9 mM (pH 8.0), II – 34.1  $\mu M$   $PolyU_1^C$ -Lösung in 1.9 mM Na-Citratpuffer (pH 8.0)).

### 6.6.12.11 Desorption der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung bei pH 8.0 von SiO<sub>2</sub>-Oberflächen

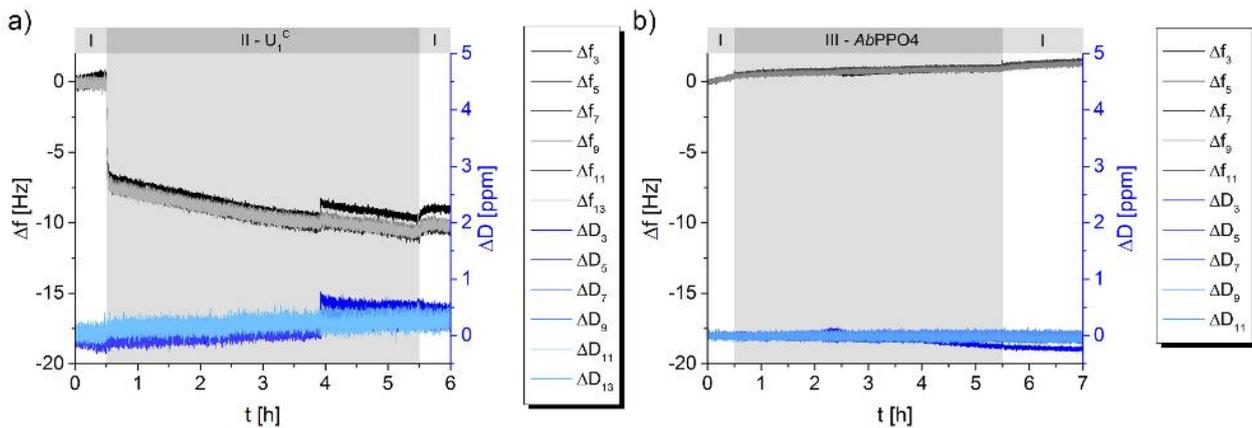
Das mit PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> bei pH 8.0 beschichtete SiO<sub>2</sub>-Substrat wurde in Desorptionsexperimenten mit salzhaltigen Lösungen gespült, um die Stabilität des Polymerfilms zu untersuchen. Dazu erfolgten jeweils für 1 h Spülschritte mit NaCl-Lösung (599 mM) als Meerwasser-Modell und hypersaliner Lösung (4.2 M) als Modell für Totes Meer Wasser.



**Abbildung E 67.** Stabilitätsexperimente der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung auf einer SiO<sub>2</sub>-Oberfläche, beschichtet bei pH 8.0. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. a) Spülen der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung mit NaCl-Lösung. b) Spülen der PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup>-Beschichtung mit hypersaliner Lösung. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 1.9 mM (pH 8.0), II – 599 mM NaCl-Lösung, III – 4.2 M hypersaline Lösung).

### 6.6.12.12 Adsorption der Unimer- und AbPPO<sub>4</sub>-Referenz auf SiO<sub>2</sub>-Oberflächen bei pH 8.0

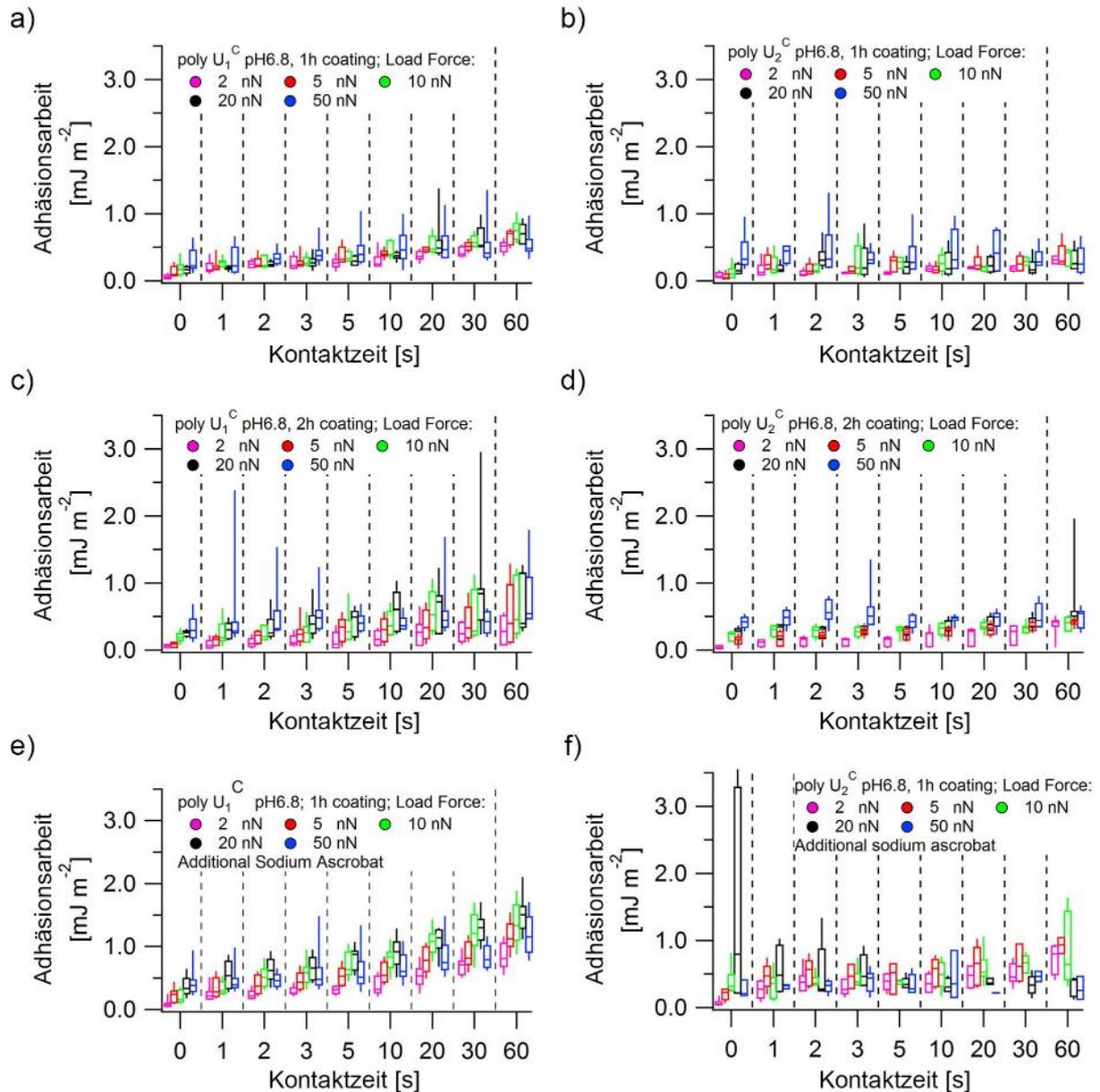
Die Adsorption des Unimers U<sub>1</sub><sup>C</sup> und des Enzyms AbPPO<sub>4</sub> bei pH 8.0 wurde in Kontrollexperimenten unter den gleichen Bedingungen wie bei dem Beschichtungsexperiment mit PolyU<sub>1</sub><sup>C</sup> (Abschnitt 6.6.12.10) durchgeführt. Dazu wurden Lösungen mit 0.75 mM U<sub>1</sub><sup>C</sup> sowie 50 U/mL AbPPO<sub>4</sub> in 17 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8) hergestellt. Zu 1.5 mL dieser Lösungen wurden 118.7  $\mu$ L Na-Phosphatpuffer (0.3 M, pH 8.2) hinzugegeben, die Mischungen mit 31.5 mL entgastem Reinstwasser (1:19.39, v/v) auf 33 mL verdünnt und die QCM-D-Sensoren für 5 h mit den resultierenden Lösungen inkubiert.



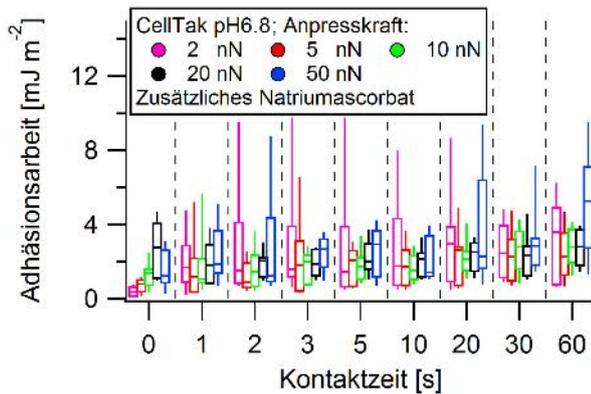
**Abbildung E 68.** QCM-D-Adsorptionskinetiken der Referenzen  $U_1^C$  (a) und  $AbPPO4$  (b) auf  $SiO_2$ -Oberflächen bei pH 8.0. Die Frequenz- und Dissipationsänderungen  $\Delta f$  und  $\Delta D$  sind für verschiedene Obertöne  $n=3-13$  dargestellt. (Bedingungen: I – Na-Citratpuffer 1.9 mM (pH 8.0), II –  $34.1 \mu M$   $U_1^C$ -Lösung in 1.9 mM Na-Citratpuffer (pH 8.0), III –  $2.3 U/mL$   $AbPPO4$  in 1.9 mM Na-Citratpuffer (pH 8.0)).

### 6.6.13 CP-AFM-Messungen der Polymerbeschichtungen und Cell-Tak™ Referenz

Wie in Abschnitt 6.4.7 beschrieben, wurden  $SiO_2$ -Substrate mit  $PolyU_1^C$  und  $PolyU_2^C$  in jeweils drei Beschichtungsexperimenten (1 h, 2 h, 1 h + 1 h mit Natriumascorbat) und Cell-Tak™ in einem Beschichtungsexperiment (1 h + 1 h mit Natriumascorbat) beschichtet und aus den gewonnenen Messdaten mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens die flächennormierte Adhäsionsarbeit  $\gamma_{rip}$  für konsekutive Abrissereignisse errechnet.



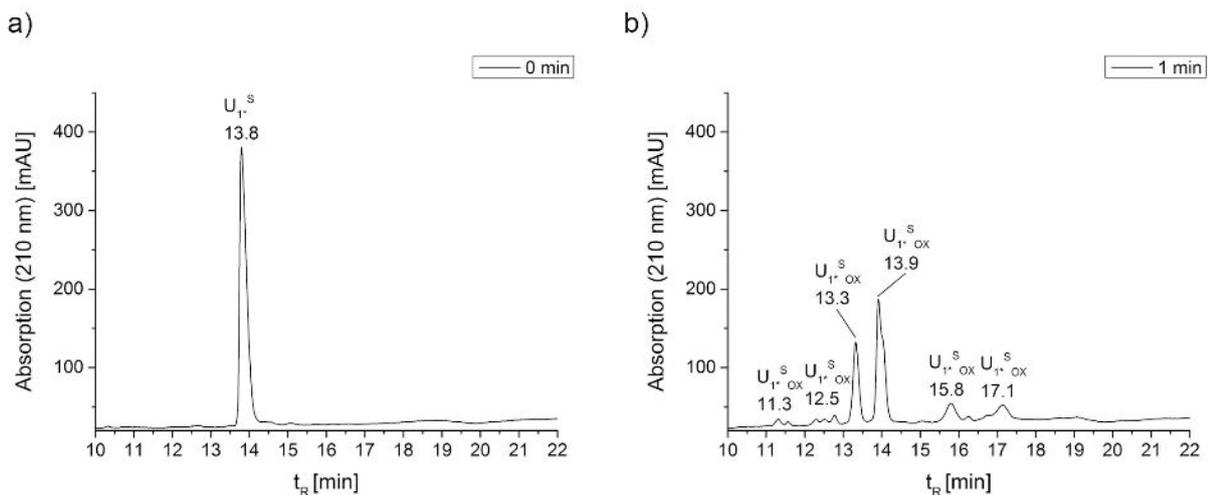
**Abbildung E 69.** Adhäsionsarbeit der Poly $U_1^C$ - und Poly $U_2^C$ -Beschichtungen auf  $SiO_2$ -Substraten. Die statistische Verteilung der Adhäsionsarbeit  $\gamma_{rip}$  für konsekutive Abrissereignisse ist für verschiedene Anpresskräfte in Abhängigkeit der Kontaktzeit als Box-Plot dargestellt. Senkrechte Linien zeigen Werte zwischen 10 % und 90 %, Kästen zeigen Werte zwischen 25 % und 75 % und waagerechte Linien zeigen den Mittelwert der gemessenen Daten. a) Für 1 h mit Poly $U_1^C$  beschichtetes Substrat. b) Für 1 h mit Poly $U_2^C$  beschichtetes Substrat. c) Für 2 h mit Poly $U_1^C$  beschichtetes Substrat. d) Für 2 h mit Poly $U_2^C$  beschichtetes Substrat. e) Für 1 h in Na-Citratpuffer und weitere 1 h unter Zusatz von 7.5 mM Na-Ascorbat mit Poly $U_1^C$  beschichtetes Substrat. f) Für 1 h in Na-Citratpuffer und weitere 1 h unter Zusatz von 7.5 mM Na-Ascorbat mit Poly $U_2^C$  beschichtetes Substrat. (Bedingungen: Anpresskraft 2 – 50 nN, Kontaktzeit 0 – 60 s, Messung in 17 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8)).



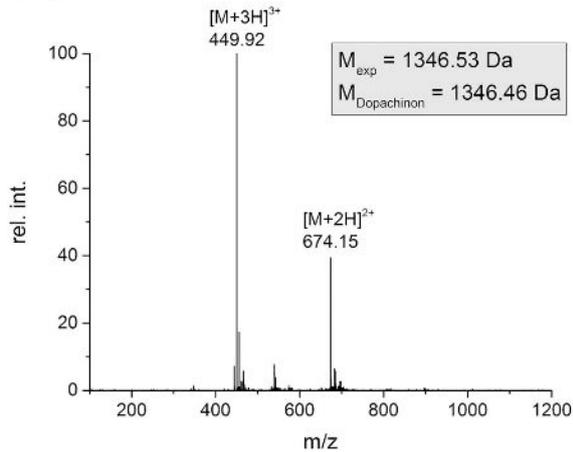
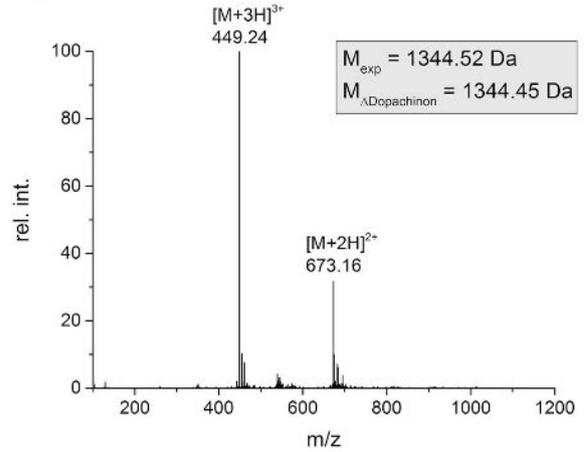
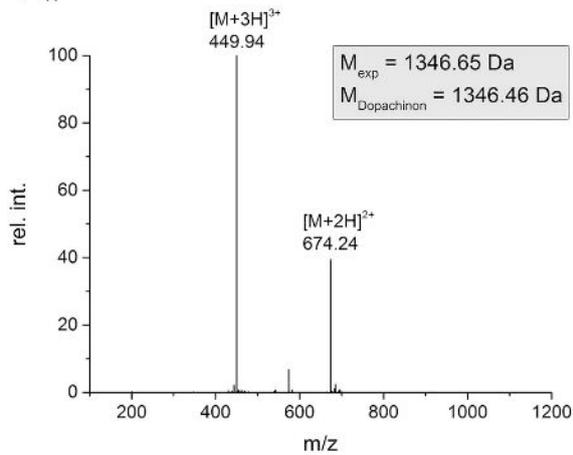
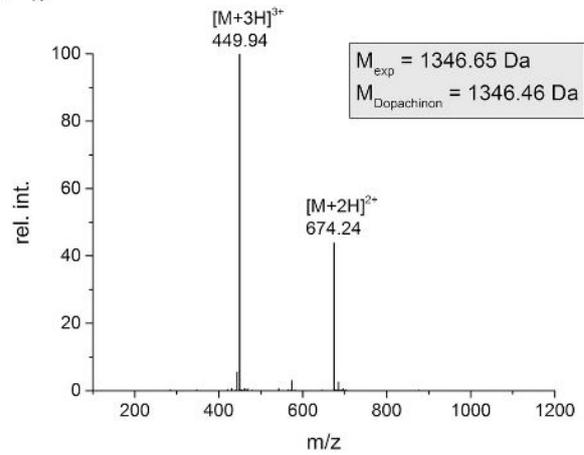
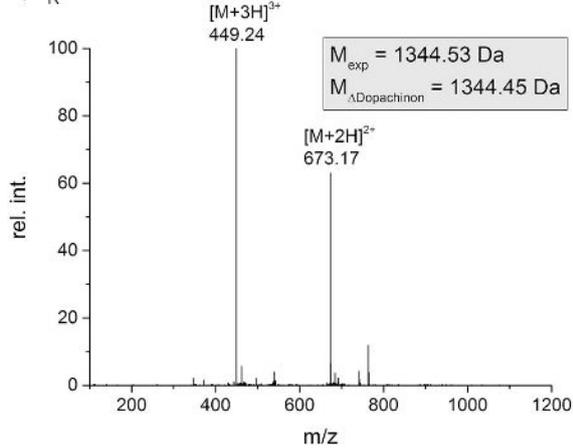
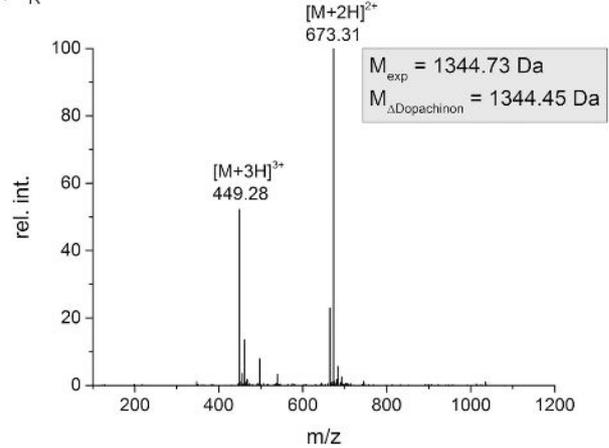
**Abbildung E 70.** Adhäsionsarbeit der Cell-Tak™-Beschichtung auf einem SiO<sub>2</sub>-Substrat. Die statistische Verteilung der Adhäsionsarbeit  $\gamma_{rip}$  für konsekutive Abrissereignisse ist für verschiedene Anpresskräfte in Abhängigkeit der Kontaktzeit als Box-Plot dargestellt. Senkrechte Linien zeigen Werte zwischen 10 % und 90 %, Kästen zeigen Werte zwischen 25 % und 75 % und waagerechte Linien zeigen den Mittelwert der gemessenen Daten. (Bedingungen: Anpresskraft 2 – 50 nN, Kontaktzeit 0 – 60 s, Messung in 17 mM Na-Citratpuffer (pH 6.8)).

#### 6.6.14 Kinetische HPLC-Messungen der NaIO<sub>4</sub>-Oxidation von U<sub>1</sub><sup>S</sup>

Eine 0.25  $\mu$ M Lösung von U<sub>1</sub><sup>S</sup> in Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 8.0) wurde mit 1 Äq. NaIO<sub>4</sub> umgesetzt. Nach 1 min Reaktionszeit wurde eine Probe von 200  $\mu$ L entnommen, 3.2  $\mu$ L 6 M HCl (resultiert in pH 2 der Probenlösung) zugegeben und die Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Messung der Probe erfolgte unmittelbar nach dem Auftauen. Das Chromatogramm in Abbildung E 71 zeigt, dass die Oxidation von U<sub>1</sub><sup>S</sup> zu mehreren Peaks mit unterschiedlicher Retention führt. Die zugehörigen ESI-MS-Spektren (Abbildung E 72) zeigen jedoch, dass in allen Fällen eine Masse des oxidierten U<sub>1</sub><sup>S</sup><sub>OX</sub> im Oxidationszustand vom Dopachinon oder  $\Delta$ Dopachinon vorliegt.



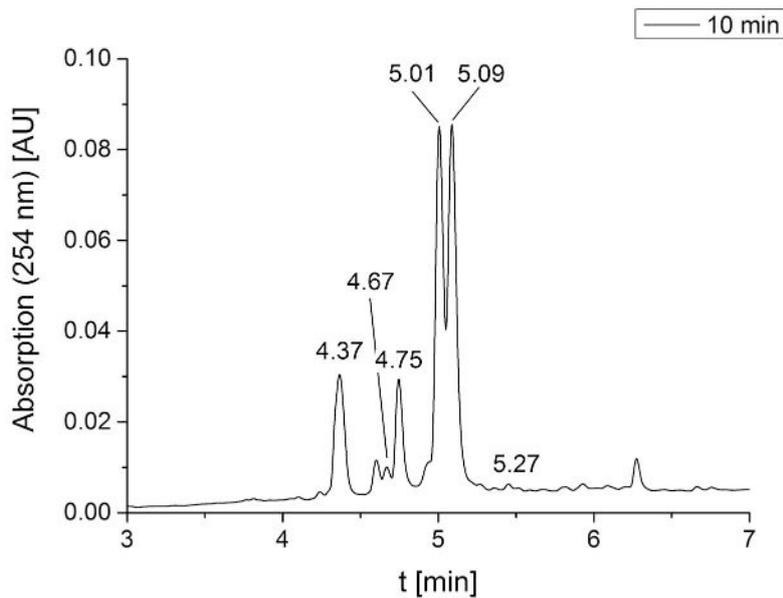
**Abbildung E 71.** Kinetische HPLC-Messungen der Oxidation von U<sub>1</sub><sup>S</sup>. Chromatogramme vor Oxidation (a) und 1 min nach Oxidation (b) mit NaIO<sub>4</sub>. (Laufmittelgradient 3-25 % B (30 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).

a)  $t_R = 11.3$  minb)  $t_R = 12.5$  minc)  $t_R = 13.3$  mind)  $t_R = 13.9$  mine)  $t_R = 15.8$  minf)  $t_R = 17.1$  min

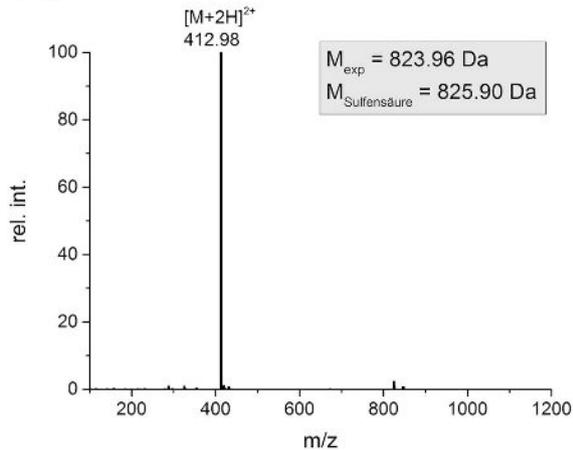
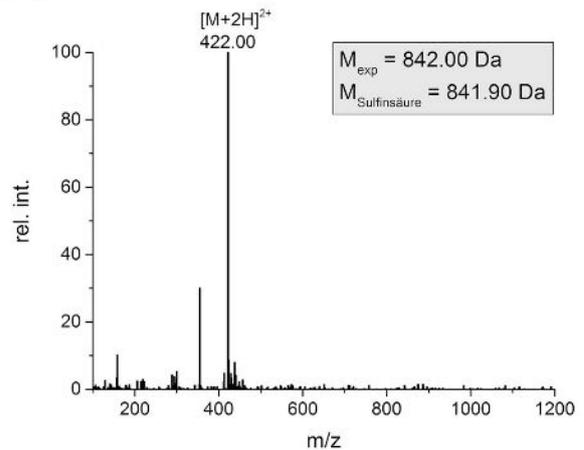
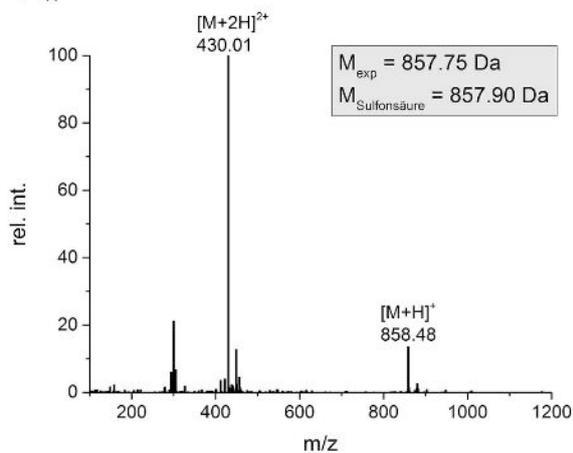
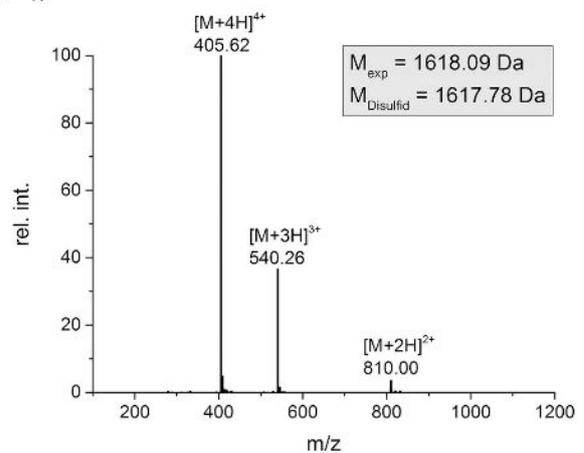
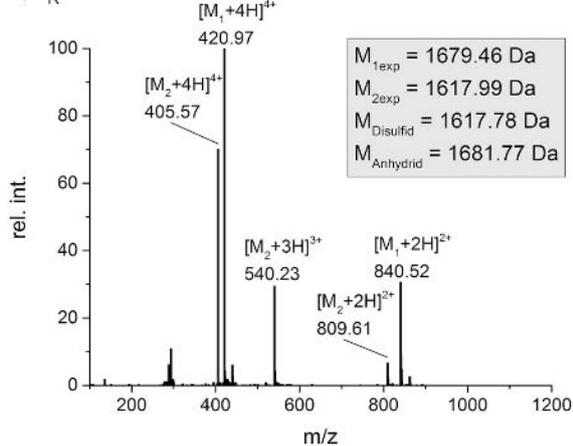
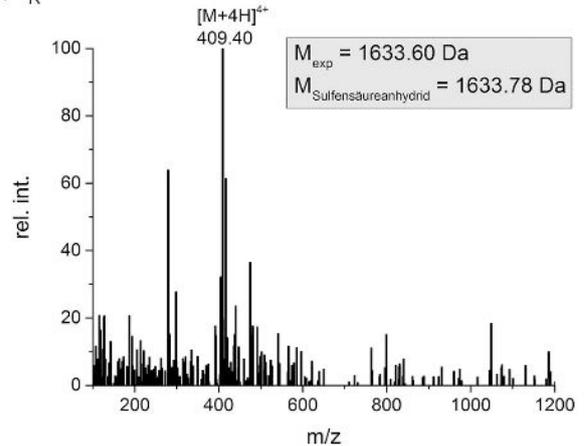
**Abbildung E 72.** Oxidation von  $U_1^{*S}$  mit 1 Äq.  $NaIO_4$ . ESI-MS-Spektren der verschiedenen Signale aus dem Chromatogramm nach 1 min Reaktionszeit. a), c) und d) Die gemessenen Massen entsprechen dem Aktivierten  $U_1^{*S_{ox}}$  im Oxidationszustand des Dopachinon. b), e) und f) Die Spektren dieser Signale weisen Massen auf, die dem aktivierten  $U_1^{*S_{ox}}$  im Oxidationszustand von  $\Delta$ Dopachinon entsprechen.

### 6.6.15 UPLC-ESI-MS-Messung der $\text{NaIO}_4$ -Oxidation von $\text{U}_{1\text{N}}^{\text{C}}$

Es wurde eine  $0.25 \mu\text{M}$  Lösung von  $\text{U}_{1\text{N}}^{\text{C}}$  in Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 8.0) für 10 min mit 1 Äq.  $\text{NaIO}_4$  umgesetzt. Anschließend wurde die Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren und unmittelbar vor der Messung aufgetaut. Es werden unterschiedliche Signale im UPLC-Chromatogramm sichtbar (Abbildung E 73), die verschiedenen Oxidationsprodukten von  $\text{U}_{1\text{N}}^{\text{C}}$  entsprechen (Abbildung E 74).



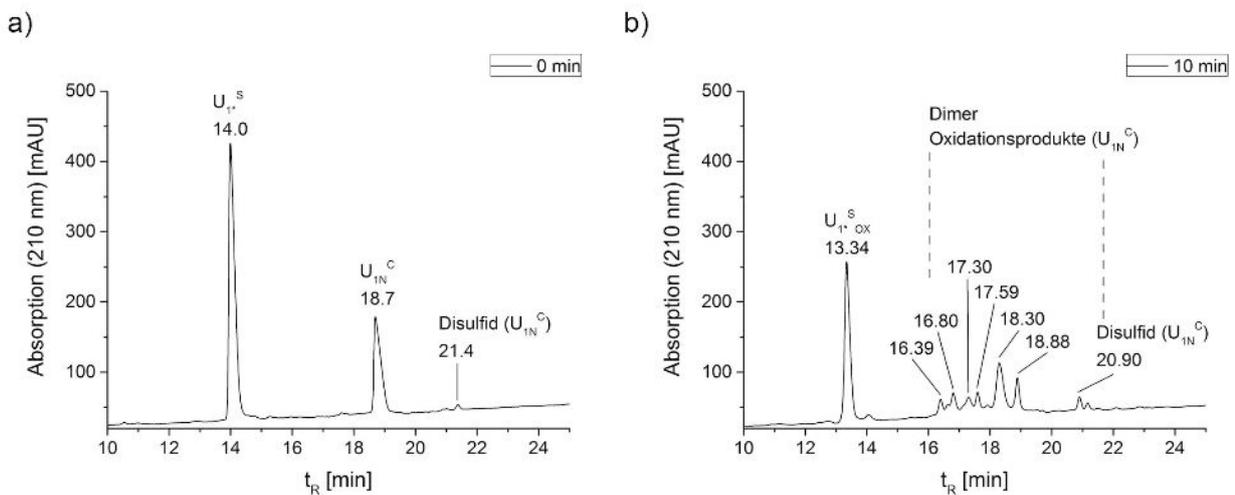
**Abbildung E 73.** UPLC-Messung der Oxidation von  $\text{U}_{1\text{N}}^{\text{C}}$  mit 1 Äq.  $\text{NaIO}_4$ . Chromatogramm nach 10 min Reaktionszeit. (Laufmittelgradient 3-25 % B (7 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).

a)  $t_R = 4.37$  minb)  $t_R = 4.67$  minc)  $t_R = 4.75$  mind)  $t_R = 5.01$  mine)  $t_R = 5.09$  minf)  $t_R = 5.27$  min

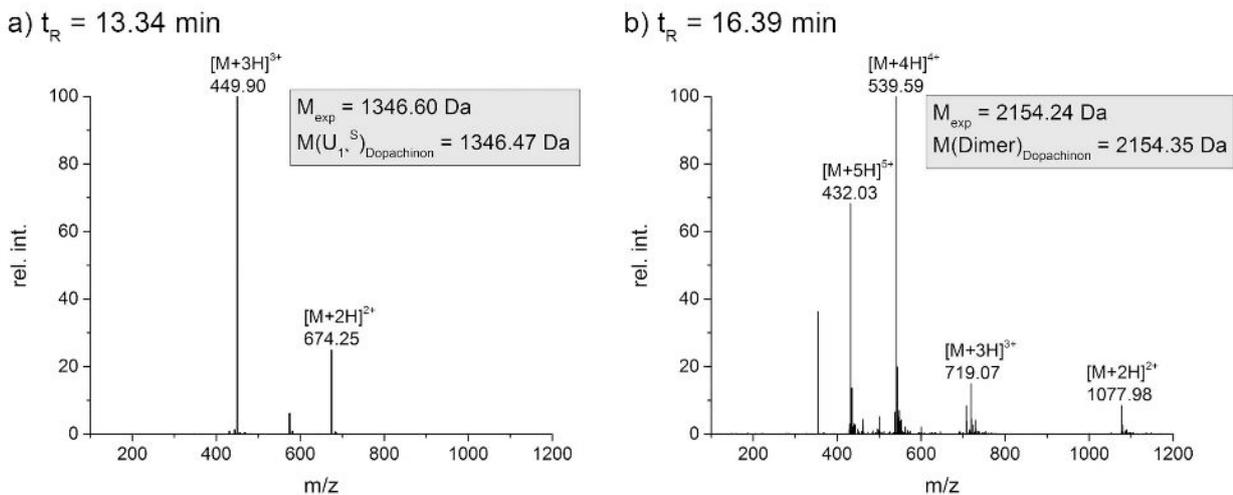
**Abbildung E 74.** Oxidation von  $U_{1N}^C$  mit 1 Äq.  $NaIO_4$ . ESI-MS-Spektren der verschiedenen Signale aus dem Chromatogramm nach 10 min. a) Die gemessene Masse entspricht der Oxidation zur Sulfensäure -2 Da. b) Das Spektrum weist eine Masse auf, die der Oxidation zur Sulfinsäure entspricht. c) Die gemessene Masse entspricht der Oxidation zur Sulfonsäure. d) Es wird eine Masse beobachtet, die der Oxidation zum Disulfid entspricht. e) Das Spektrum weist zwei Analytmassen auf, die der Oxidation zum Disulfid ( $M_2$ ) und zum Anhydrid von Sulfinsäure und Sulfonsäure -2 Da ( $M_1$ ) entsprechen. f) Die gemessene Masse entspricht der Oxidation zum Sulfensäureanhydrid.

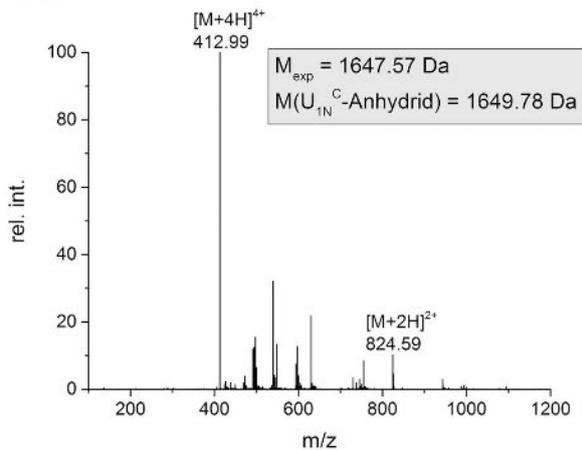
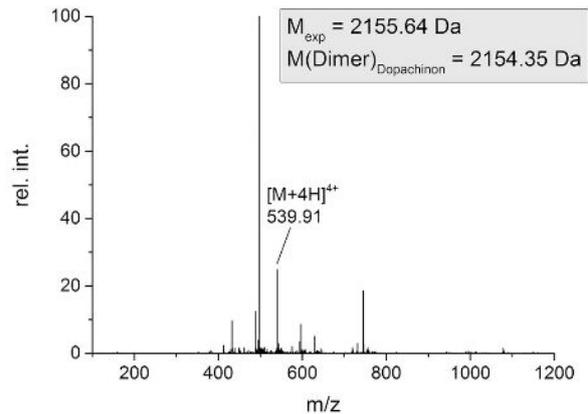
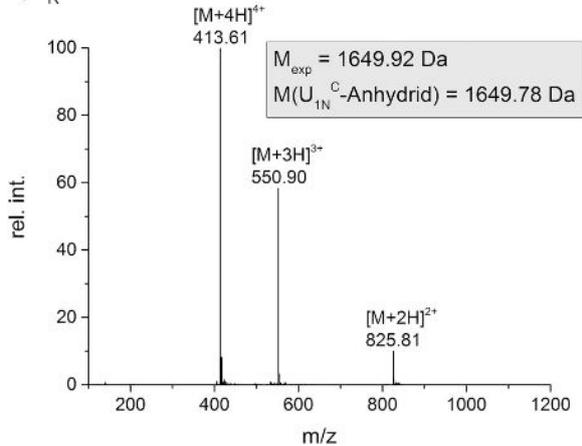
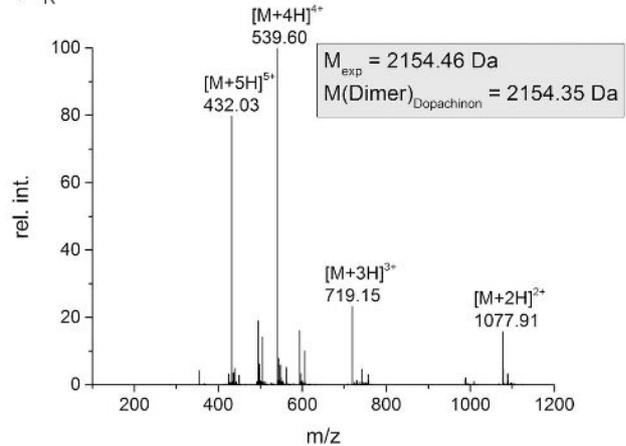
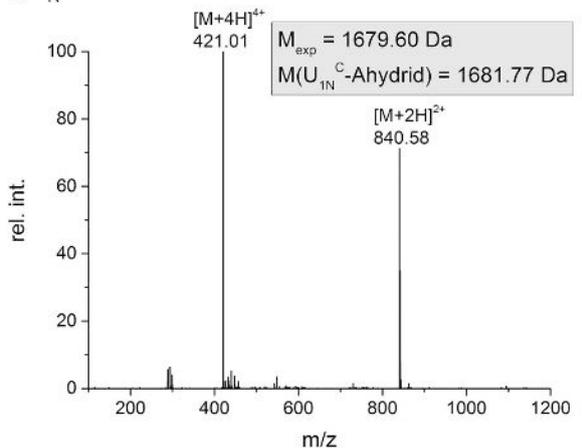
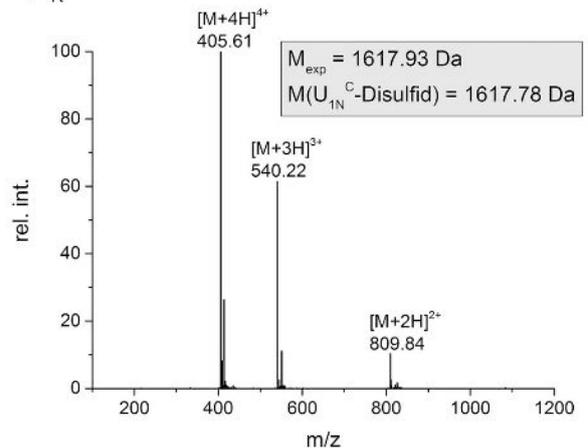
### 6.6.16 Kinetische HPLC-Messungen der Dimerisierungsreaktion von $U_{1^*}^S$ und $U_{1N}^C$

Eine Lösung aus  $0.25 \mu\text{M } U_{1^*}^S$  und  $0.25 \mu\text{M } U_{1N}^C$  in Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 8.0) wurde für 10 min mit 1 Äq.  $\text{NaIO}_4$  umgesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben von 200  $\mu\text{L}$  entnommen, mit 3.2  $\mu\text{L}$  6 M HCl versetzt (resultiert in pH 2 der Probenlösung) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Messung der Proben erfolgte unmittelbar nach dem Auftauen. Die HPLC-Chromatogramme (Abbildung E 75) zeigen, dass sich nach Zugabe von  $\text{NaIO}_4$  verschiedene Produkte gebildet haben, die aus  $U_{1^*}^S$ - $U_{1N}^C$ -Dimeren und Oxidationsprodukten von  $U_{1N}^C$  bestehen (Abbildung E 76).



**Abbildung E 75.** HPLC-Messung der Dimerisierungsreaktion von  $U_{1^*}^S$  und  $U_{1N}^C$ . Chromatogramme vor Zugabe von 1 Äq.  $\text{NaIO}_4$  (a) und nach 10 min Reaktionszeit (b). (Laufmittelgradient 3-25 % B (30 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).

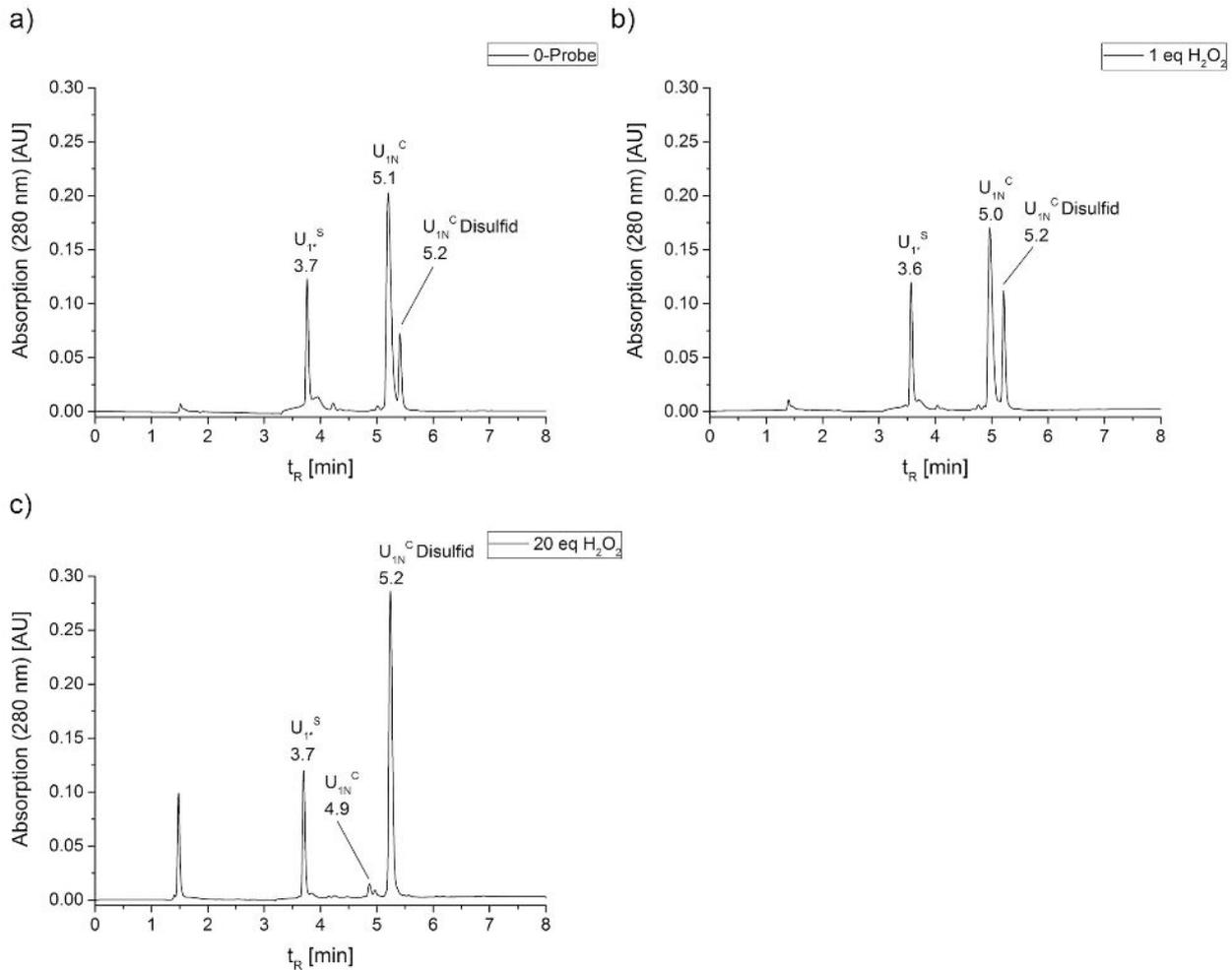


c)  $t_R = 16.80$  mind)  $t_R = 17.30$  mine)  $t_R = 17.59$  minf)  $t_R = 18.30$  ming)  $t_R = 18.88$  minh)  $t_R = 20.90$  min

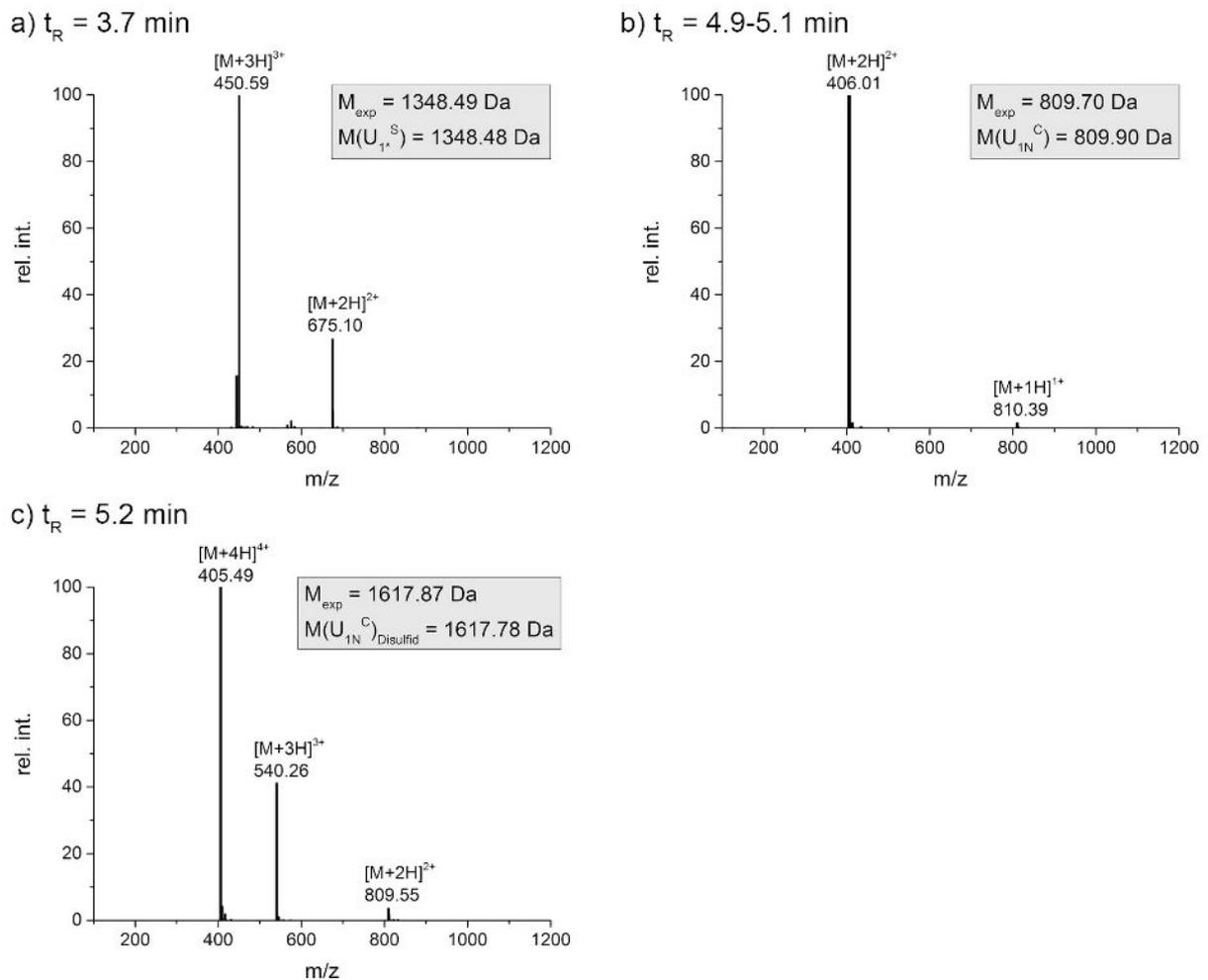
**Abbildung E 76.** Dimerisierungsreaktion von  $\text{U}_{1^{\text{S}}}$  und  $\text{U}_{1\text{N}}^{\text{C}}$ . ESI-MS-Spektren der verschiedenen Peaks aus dem Chromatogramm nach 10 min Reaktionszeit. Die gemessenen Massen entsprechen der Oxidation von Dopa in  $\text{U}_{1^{\text{S}}}$  zu Dopachinon (a), dem  $\text{U}_{1^{\text{S}}}\text{-U}_{1\text{N}}^{\text{C}}$ -Dimer im Oxidationszustand vom Dopachinon (b, d und f), der Oxidation von  $\text{U}_{1\text{N}}^{\text{C}}$  zum Anhydrid von Sulfensäure und Sulfinsäure -2 Da (c), der Oxidation von  $\text{U}_{1\text{N}}^{\text{C}}$  zum Anhydrid von Sulfensäure und Sulfinsäure (e), der Oxidation von  $\text{U}_{1\text{N}}^{\text{C}}$  zum Anhydrid von Sulfinsäure und Sulfensäure -2 Da (g) und der Oxidation von  $\text{U}_{1\text{N}}^{\text{C}}$  zum Disulfid (h).

### 6.6.17 UPLC-ESI-MS-Messungen der Dimerisierungsreaktion von $U_{1^*}^S$ und $U_{1N}^C$

Eine Lösung aus  $0.25 \mu\text{M } U_{1^*}^S$  und  $0.25 \mu\text{M } U_{1N}^C$  in Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 8.0) wurde für 1 min mit 1 Äq. und mit 20 Äq.  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgesetzt. Die Chromatogramme der Reaktionsprodukte sind in Abbildung E 77 dargestellt und die entsprechenden ESI-MS-Spektren (Abbildung E 78) zeigen, dass keine  $U_{1^*}^S$ - $U_{1N}^C$  Dimer-Bildung, sondern nur eine Disulfid-Bildung von  $U_{1N}^C$  stattfindet.



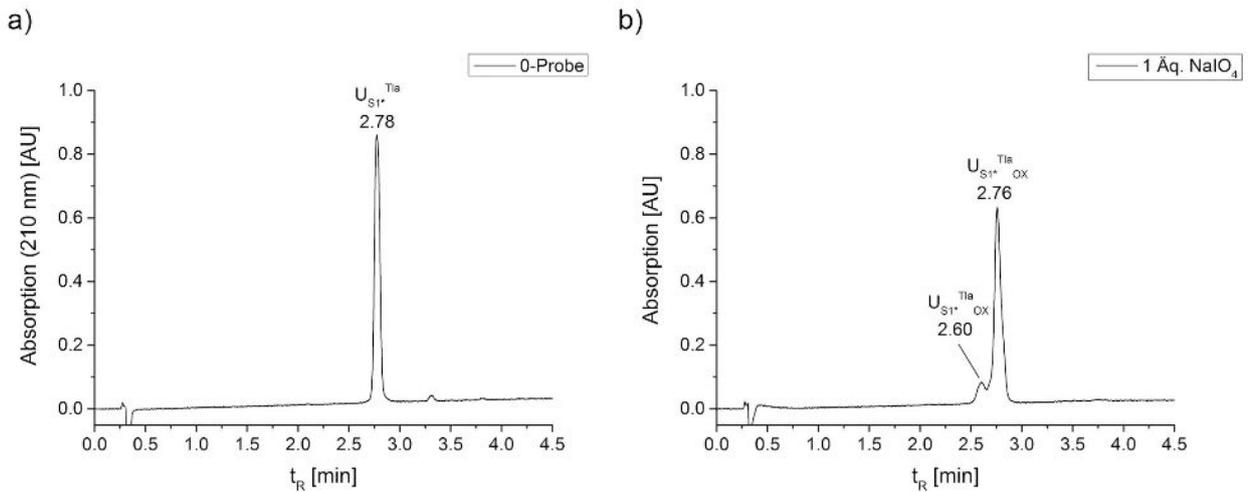
**Abbildung E 77.** UPLC-Messung der Dimerisierungsreaktion von  $U_{1^*}^S$  und  $U_{1N}^C$ . Chromatogramme vor Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (a) und nach Zugabe von 1 Äq.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (b) und 20 Äq.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (c). (Laufmittelgradient 3-25 % B (7 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).



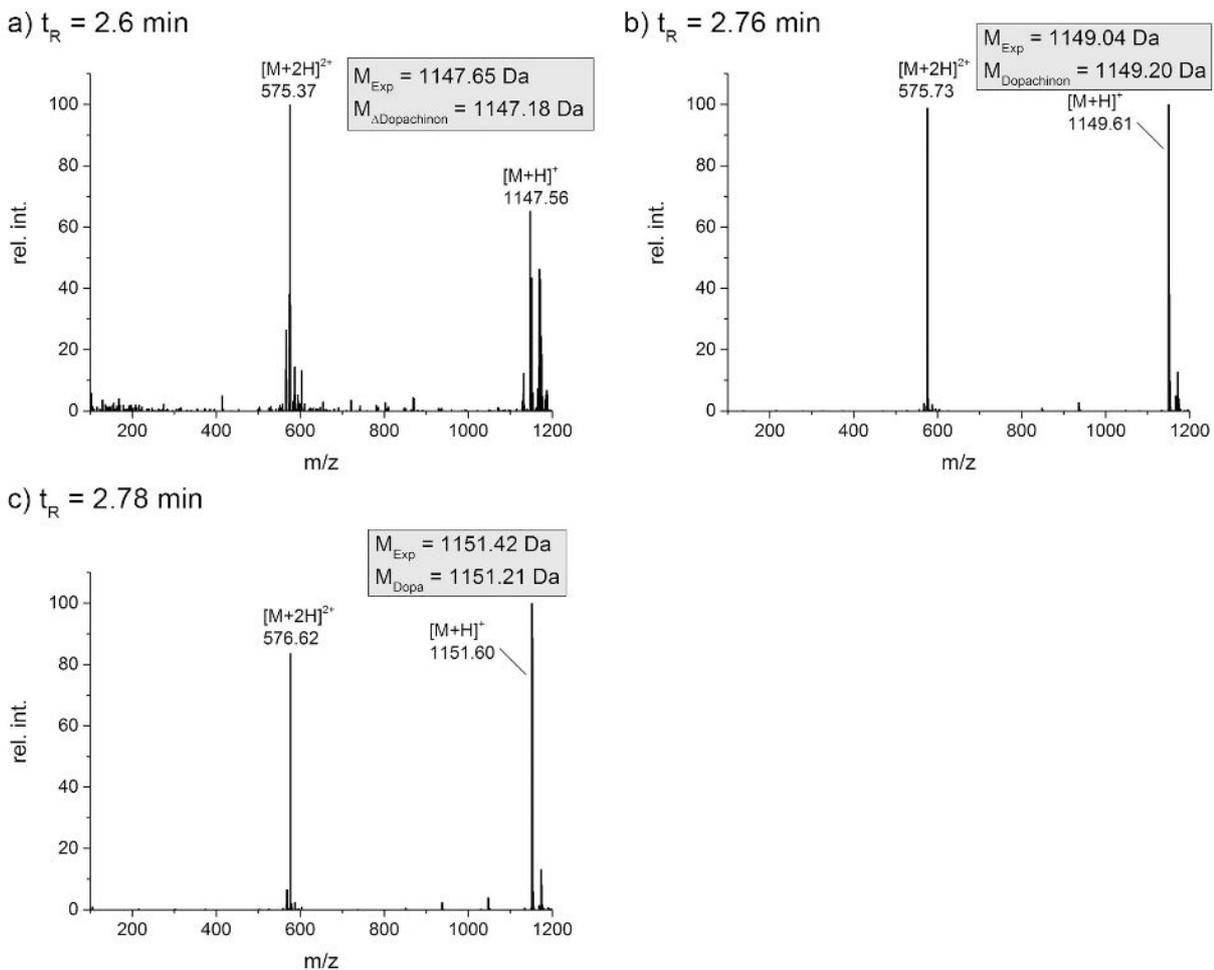
**Abbildung E 78.** Dimerisierungsreaktion von  $U_{1^S}$  und  $U_{1N}^C$ . ESI-MS-Spektren der verschiedenen Peaks aus den Chromatogrammen. a) Die Masse entspricht dem nicht-oxidierten Unimer  $U_{1^S}$ . b) Das Spektrum ist repräsentativ für die Signale im Bereich von 4.9-5.1 min Retentionszeit, die alle eine Masse aufweisen, die dem Unimer  $U_{1N}^C$  entspricht. c) Die beobachtete Masse entspricht der Oxidation von  $U_{1N}^C$  zum Disulfid.

### 6.6.18 UPLC-ESI-MS-Messungen der Oxidation von $U_{S1^Tla}$ und $U_{R1^Tla}$

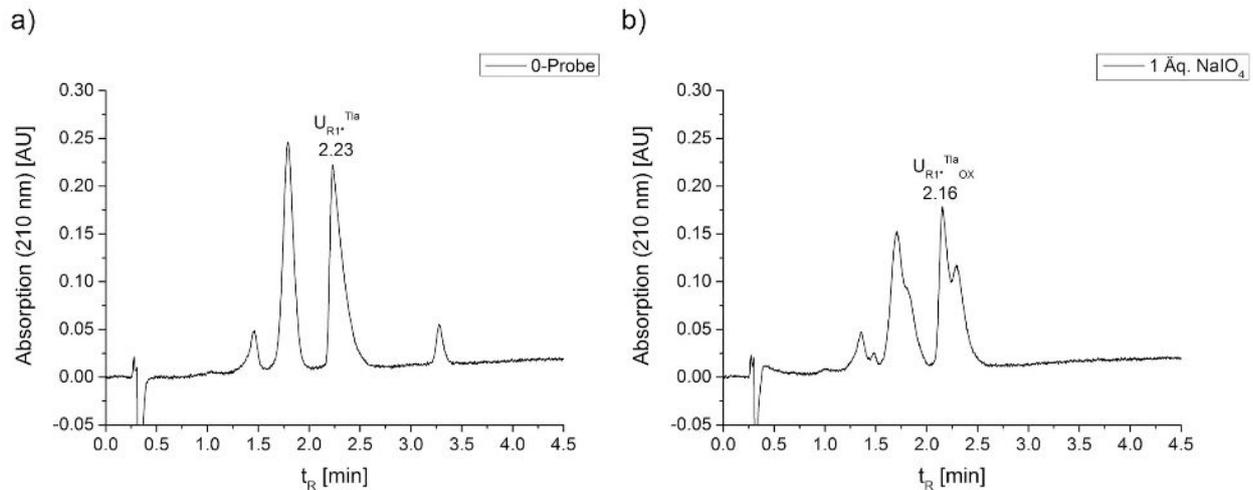
Es wurde jeweils eine 2 mM Lösung des Unimers  $U_{S1^Tla}$  und  $U_{R1^Tla}$  in Reinstwasser mit 1 Äq.  $NaIO_4$  umgesetzt. Es wurden vor Oxidation und nach 1 min Reaktionszeit Proben mittels UPLC-ESI-MS gemessen. Die Chromatogramme der Proben sind in Abbildung E 79 ( $U_{S1^Tla}$ ) und Abbildung E 81 ( $U_{R1^Tla}$ ) dargestellt. Die zu den jeweiligen Peaks zugehörigen ESI-MS-Spektren sind in Abbildung E 80 ( $U_{S1^Tla}$ ) und Abbildung E 82 ( $U_{R1^Tla}$ ) zu finden und zeigen, dass eine quantitative Oxidation zu den Dopachinon und  $\Delta$ Dopachinon tragenden Unimeren erfolgt.



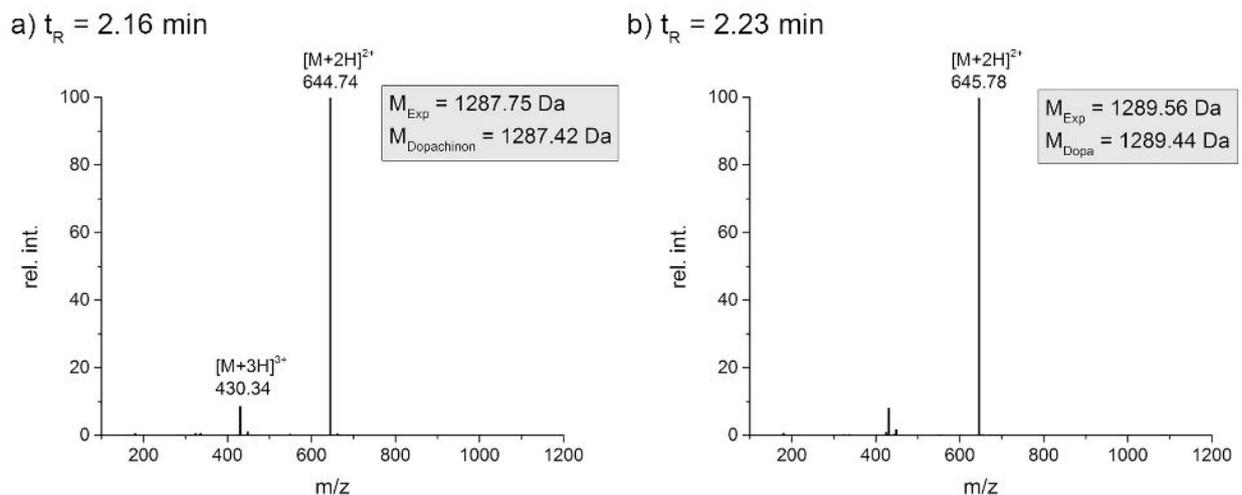
**Abbildung E 79.** UPLC-Messung der Oxidation von  $U_{S1}^{Tia}$  mit 1 Äq.  $NaO_4$ . Chromatogramme vor Oxidation (a) und nach der Oxidation (b). (Laufmittelgradient 10-25 % B (4.5 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).



**Abbildung E 80.** Oxidation von  $U_{S1}^{Tia}$  mit 1 Äq.  $NaO_4$ . ESI-MS-Spektren der verschiedenen Peaks aus den Chromatogrammen. a) Die Masse entspricht der Oxidation zu  $\Delta$ Dopachinon. b) Das Spektrum weist eine Masse auf, die der Oxidation zu Dopachinon entspricht. c) Nicht-oxidiertes Unimersignal.



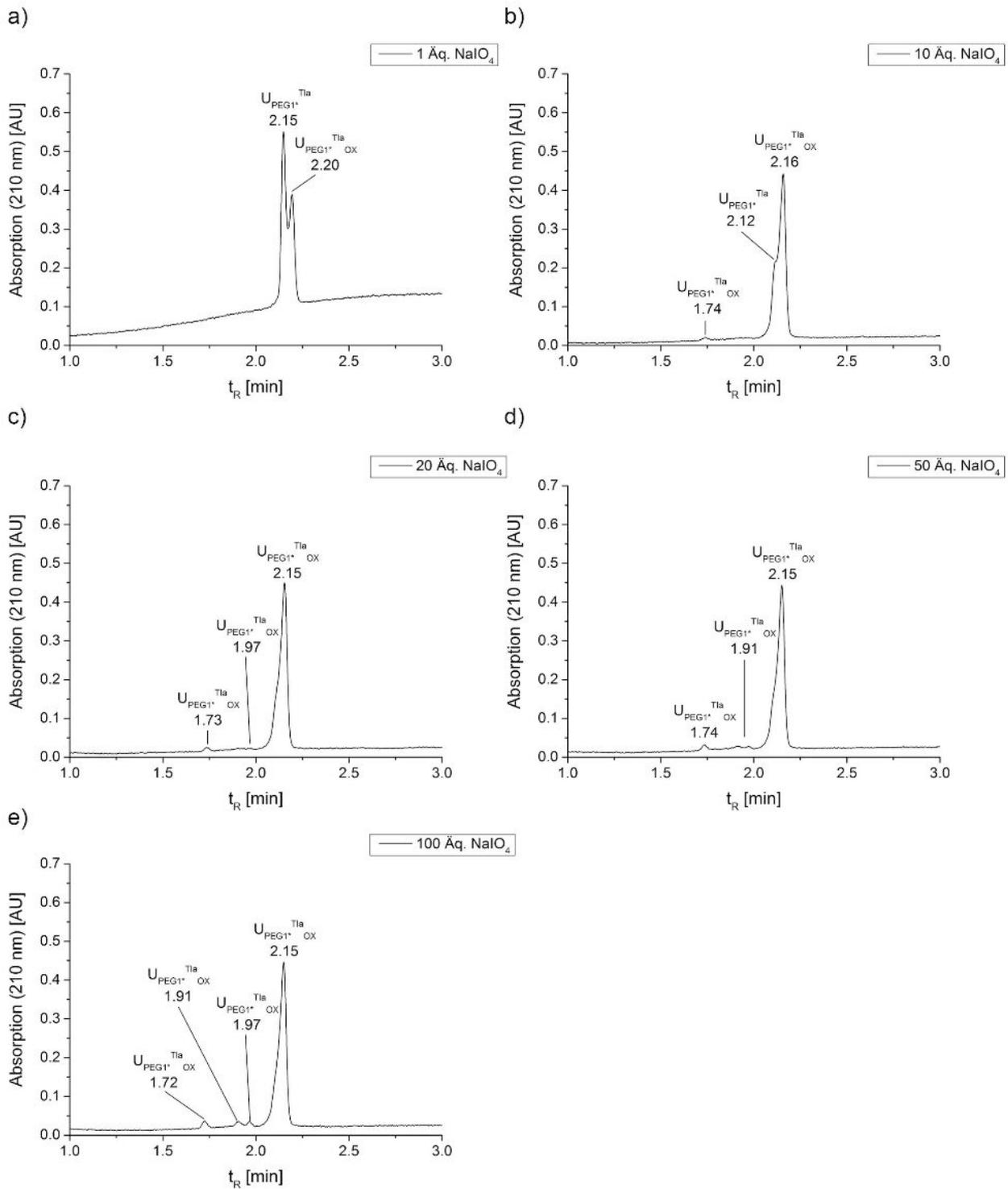
**Abbildung E 81.** UPLC-Messung der Oxidation von  $U_{R1}^{Tla}$  mit 1 Äq.  $NaIO_4$ . Chromatogramme vor Oxidation (a) und nach der Oxidation (b). (Laufmittelgradient 10-25 % B (4.5 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).



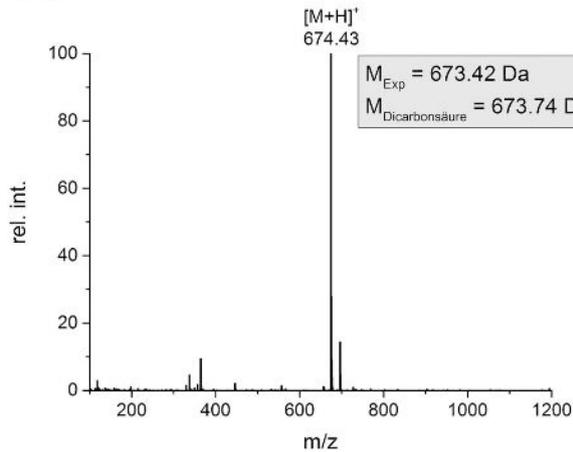
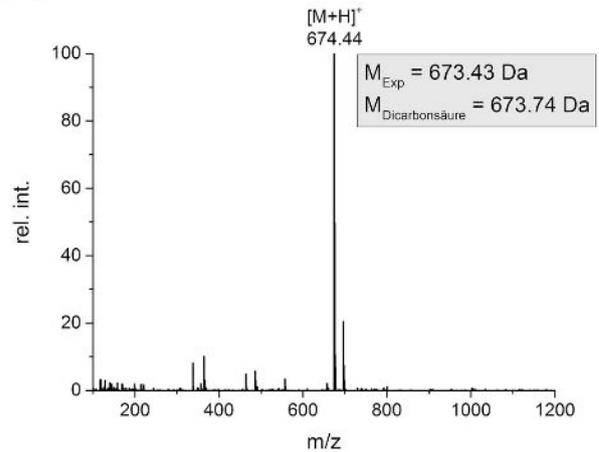
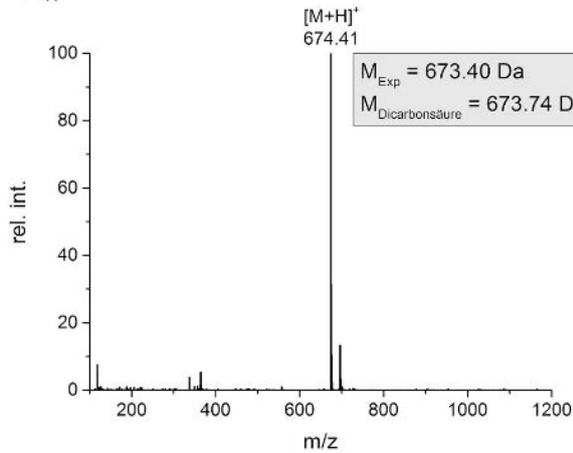
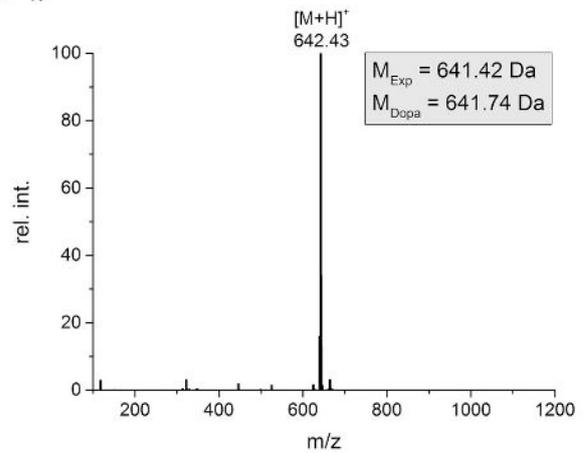
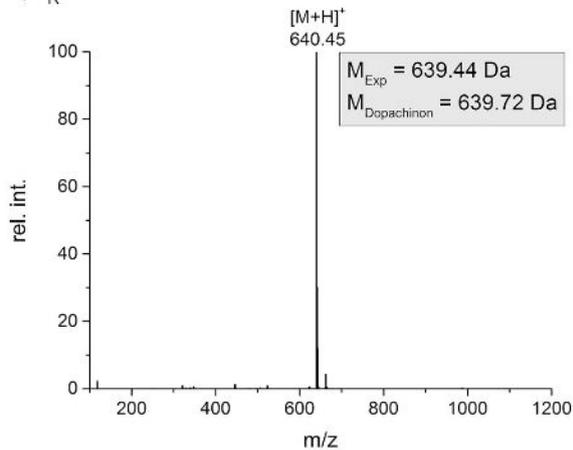
**Abbildung E 82.** Oxidation von  $U_{R1}^{Tla}$  mit 1 Äq.  $NaIO_4$ . ESI-MS-Spektren der verschiedenen Peaks aus den Chromatogrammen. a) Die Masse entspricht der Oxidation zu Dopachinon. b) Nicht-oxidiertes Unimersignal.

### 6.6.19 UPLC-ESI-MS-Messungen der Oxidation von $U_{PEG1}^{Tla}$

Eine 2 mM Lösung aus  $U_{PEG1}^{Tla}$  in Reinstwasser wurde mit verschiedenen Äquivalenten  $NaIO_4$  für jeweils eine Minute umgesetzt und direkt im Anschluss mittels UPLC-ESI-MS gemessen. Die Chromatogramme der Reaktionslösungen (Abbildung E 83) zeigen, dass bei steigender Menge Oxidationsmittel bis 20 Äq.  $NaIO_4$  eine erhöhte Ausbeute an  $U_{PEG1}^{Tla}$  im Oxidationszustand von Dopachinon erhalten wird. Mit weiterer Erhöhung der Menge an Oxidationsmittel setzt eine Nebenreaktion ein, die vermehrt zur Bildung der Dicarbonsäure führt. Die korrespondierenden ESI-MS-Spektren zeigen die Massen zu den jeweiligen Peaks der Chromatogramme und sind in Abbildung E 84 dargestellt.



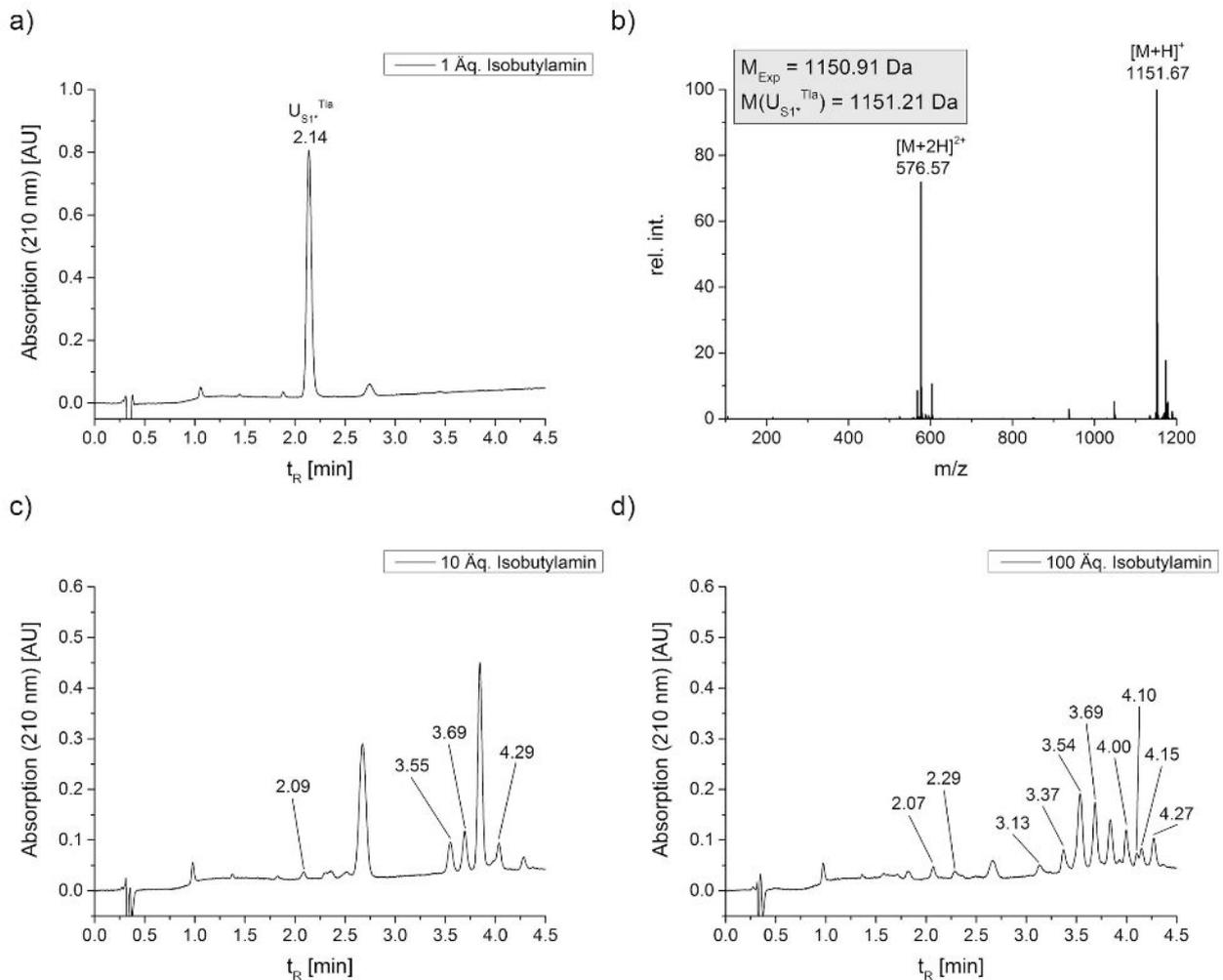
**Abbildung E 83.** UPLC-Messung der Oxidation von  $U_{\text{PEG1}^*}\text{TiLa}$ . Chromatogramme von der Oxidation mit 1 Äq.  $\text{NaIO}_4$  (a) 10 Äq.  $\text{NaIO}_4$  (b) 20 Äq.  $\text{NaIO}_4$  (c) 50 Äq.  $\text{NaIO}_4$  (d) 100 Äq.  $\text{NaIO}_4$  (e). (Laufmittelgradient 10-35 % B (4.5 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).

a)  $t_R = 1.72-1.74$  minb)  $t_R = 1.91$  minc)  $t_R = 1.97$  mind)  $t_R = 2.12-2.15$  mine)  $t_R = 2.15-2.20$  min

**Abbildung E 84.** Oxidation von  $U_{PEG1}^{Tla}$ . ESI-MS-Spektren der verschiedenen Peaks aus den Chromatogrammen. a), b) und c) Die Massen entsprechen der Oxidation zur Dicarbonsäure. d) Das Spektrum zeigt die Masse des nicht-oxidierten Unimers. e) Die gemessene Masse entspricht der Oxidation zu Dopachinon.

### 6.6.20 UPLC-ESI-MS-Messungen der Aminolyse von $U_{S1}^{*Tla}$

Eine 2 mM Lösung aus  $U_{S1}^{*Tla}$  in Reinstwasser wurde mit 1, 10 und 100 Äq. Isobutylamin umgesetzt. Nach 30 min Reaktionszeit wurden den Reaktionslösungen Proben entnommen und mittels UPLC-ESI-MS gemessen. Die Auswertung der Chromatogramme (Abbildung E 85) und ESI-MS Analytik (Tabelle E 6) zeigt, dass mit steigender Menge an Amin eine erhöhte Ausbeute an aminolysiertem und hydrolysiertem Produkt erhalten wird.



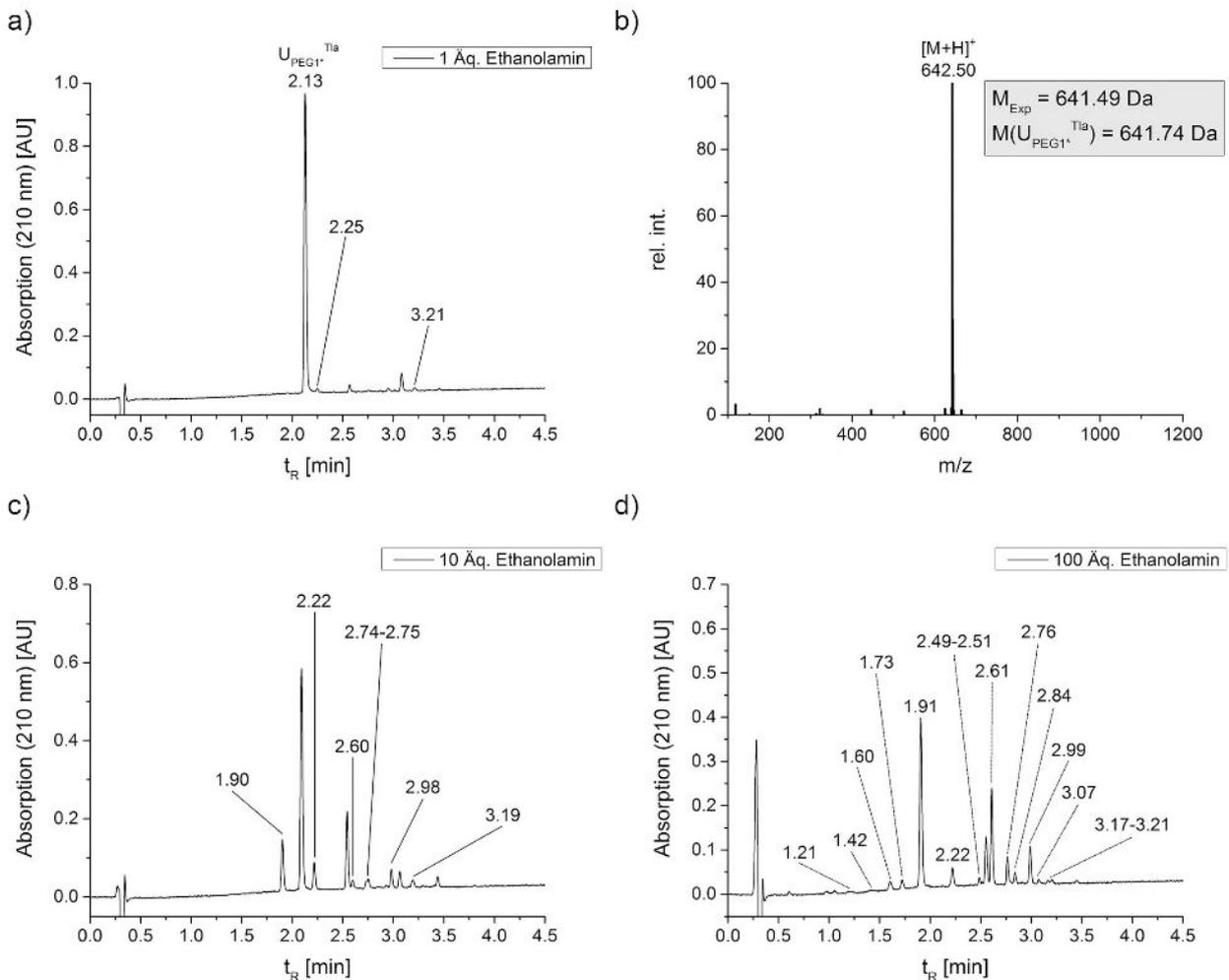
**Abbildung E 85.** UPLC-Messung der Aminolyse von  $U_{S1}^{*Tla}$  mit Isobutylamin. a) Chromatogramm der Reaktion mit 1 Äq. Isobutylamin. b) ESI-MS-Spektrum des Unimer-Signals aus dem Chromatogramm der Reaktion mit 1 Äq. Isobutylamin bei  $t_R = 2.14$  min. c) Chromatogramm der Reaktion mit 10 Äq. Isobutylamin, die Signale der gezeigten Retentionszeiten sind zu aminolysierten und hydrolysierten Reaktionsprodukten zugehörig. d) Chromatogramm der Reaktion mit 100 Äq. Isobutylamin, die Signale der gezeigten Retentionszeiten sind zu aminolysierten und hydrolysierten Reaktionsprodukten zugehörig. (Laufmittelgradient 5-25 % B (4.5 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).

**Tabelle E 6.** Aminolyse von  $U_{S1^*T1a}$ . Auflistung der verschiedenen Reaktionsprodukte aus der chromatografischen ESI-MS-Analyse der Reaktionen mit 10 und 100 Äq. Isobutylamin.

Verbindung	Reaktion	$t_R$ [min]	exp. Masse [g/mol]	ber. Masse (avg.) [g/mol]
$U_{S1^*T1a}$ (Dopa)	1xHydrolyse	2.09	1169.03	1169.23
$U_{S1^*T1a}$ (Dopachinon)	1xAminolyse	2.07	1221.32	1222.34
		2.29	1221.94	
		3.37	1221.46	
$U_{S1^*T1a}$ (Dopa)	1xAminolyse	3.69	1224.07	1224.35
$U_{S1^*T1a}$ (Dopa)- $U_{S1^*T1a}$ (Dopa)	1xHydrolyse	3.54	2318.68	2318.43
		3.55	2318.43	
		3.69	2318.07	
		3.69	2318.52	
$U_{S1^*T1a}$ (Dopa)- $U_{S1^*T1a}$ (Dopa)	2xHydrolyse	2.07	2337.51	2336.44
		2.29	2337.55	
$U_{S1^*T1a}$ (Dopa)- $U_{S1^*T1a}$ (Dopa)	1xAminolyse	4.27	2373.34	2373.55
		4.29	2373.35	
$U_{S1^*T1a}$ (Dopa)- $U_{S1^*T1a}$ (Dopa)	2xAminolyse	3.69	2447.74	2448.69
$U_{S1^*T1a}$ (Dopa)- $U_{S1^*T1a}$ (Dopa)	1xAminolyse 1xHydrolyse	4.00	2391.54	2391.56
		4.10	2391.42	
		4.15	2391.20	
$U_{S1^*T1a}$ (Dopachinon)- $U_{S1^*T1a}$ (Dopa)	2xHydrolyse	3.13	2334.87	2334.42
		3.37	2334.47	
$U_{S1^*T1a}$ (Dopachinon)- $U_{S1^*T1a}$ (Dopa)	1xAminolyse	3.69	2371.36	2371.53
$U_{S1^*T1a}$ (Dopachinon)- $U_{S1^*T1a}$ (Dopa)	2xAminolyse	2.09	2444.25	2444.67
		4.00	2444.32	
		4.10	2444.04	
		4.15	2445.32	
$U_{S1^*T1a}$ (Dopachinon)- $U_{S1^*T1a}$ (Dopa)	1xAminolyse 1xHydrolyse	3.37	2389.10	2389.55
$U_{S1^*T1a}$ (Dopachinon)- $U_{S1^*T1a}$ (Dopachinon)	1xAminolyse	3.55	2370.76	2369.52
		3.69	2370.90	
$U_{S1^*T1a}$ (Dopachinon)- $U_{S1^*T1a}$ (Dopachinon)	1xAminolyse 1xHydrolyse	3.13	2387.68	2387.53

### 6.6.21 UPLC-ESI-MS-Messungen der Aminolyse von $U_{\text{PEG1}^*}^{\text{Tla}}$

Eine 2 mM Lösung aus  $U_{\text{PEG1}^*}^{\text{Tla}}$  in Reinstwasser wurde mit 1, 10 und 100 Äq. Ethanolamin umgesetzt. Nach 30 min Reaktionszeit wurden den Reaktionslösungen Proben entnommen und mittels UPLC-ESI-MS gemessen. Die Auswertung der Chromatogramme (Abbildung E 86) und ESI-MS Analytik (Tabelle E 7) zeigt, dass mit steigender Menge an Amin eine erhöhte Ausbeute an aminolysiertem und hydrolysiertem Produkt erhalten wird.



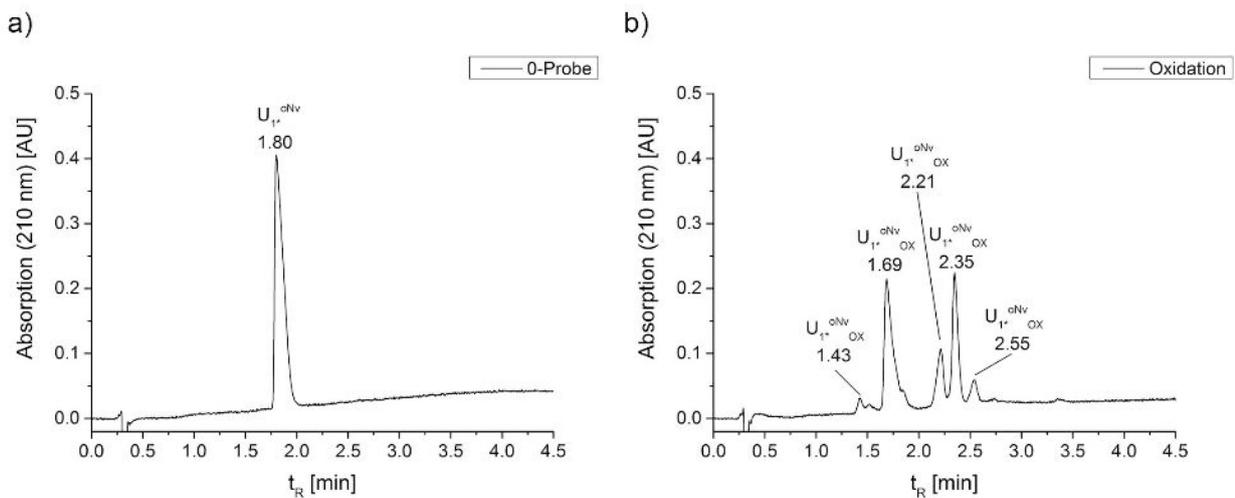
**Abbildung E 86.** UPLC-Messung der Aminolyse von  $U_{\text{PEG1}^*}^{\text{Tla}}$  mit Ethanolamin. a) Chromatogramm der Reaktion mit 1 Äq. Ethanolamin. b) ESI-MS-Spektrum des Unimer-Signals aus dem Chromatogramm der Reaktion mit 1 Äq. Ethanolamin bei  $t_R=2.13$  min. c) Chromatogramm der Reaktion mit 10 Äq. Ethanolamin, die Signale der gezeigten Retentionszeiten sind zu aminolysierten und hydrolysierten Reaktionsprodukten zugehörig. d) Chromatogramm der Reaktion mit 100 Äq. Ethanolamin, die Signale der gezeigten Retentionszeiten sind zu aminolysierten und hydrolysierten Reaktionsprodukten zugehörig. (Laufmittelgradient 10-35 % B (4.5 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).

**Tabelle E 7.** Aminolyse von U<sub>PEG1\*</sub><sup>Tla</sup>. Auflistung der verschiedenen Reaktionsprodukte aus der chromatografischen ESI-MS-Analyse der Reaktionen mit 1, 10 und 100 Äq. Ethanolamin.

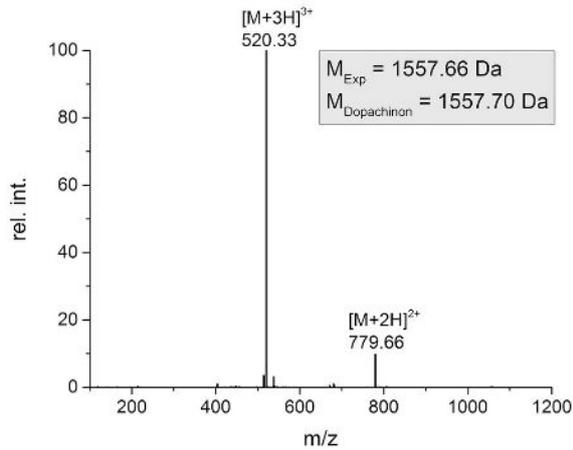
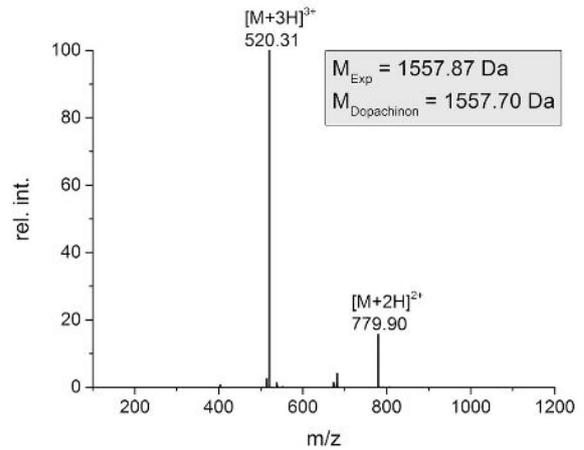
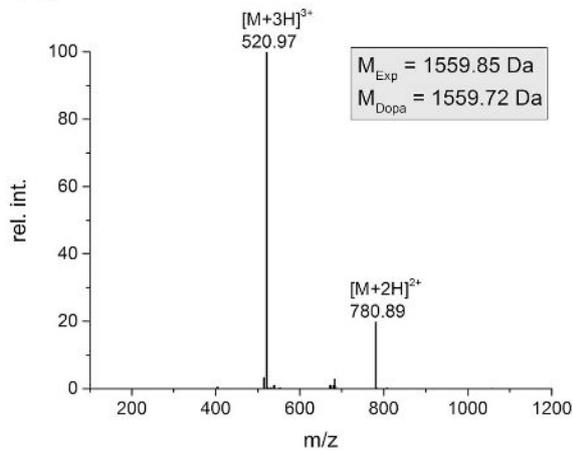
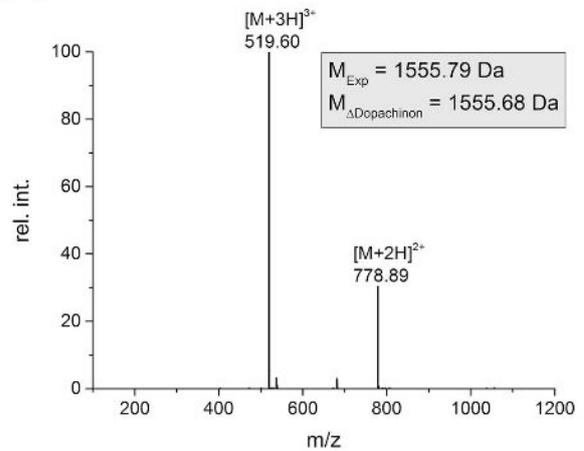
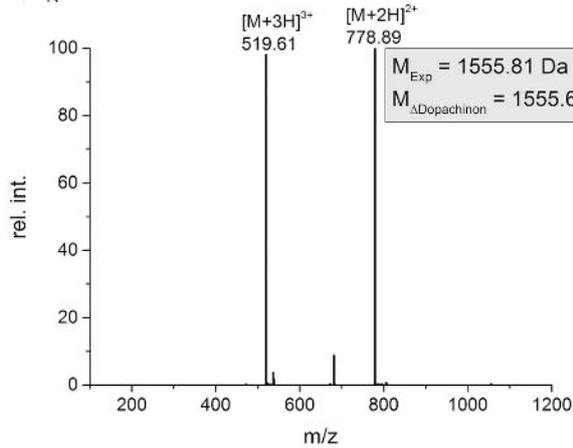
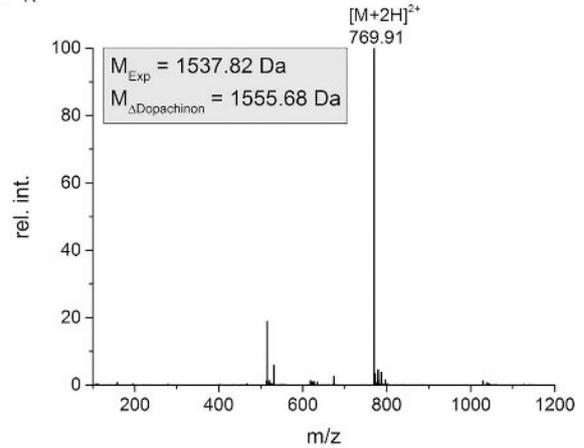
Verbindung	Reaktion	t <sub>R</sub> [min]	exp. Masse [g/mol]	ber. Masse (avg.) [g/mol]
U <sub>PEG1*</sub> <sup>Tla</sup> (Dopa)	1xHydrolyse	2.22	659.49	659.75
		2.22	659.50	
		2.25	659.43	
U <sub>PEG1*</sub> <sup>Tla</sup> (Dopa)	1xAminolyse	1.90	702.51	702.82
		1.91	702.53	
U <sub>PEG1*</sub> <sup>Tla</sup> (Dopachinon)	1xAminolyse	1.21	700.45	700.81
		1.42	700.56	
		1.60	700.49	
		1.73	700.45	
U <sub>PEG1*</sub> <sup>Tla</sup> (Dopa)-U <sub>PEG1*</sub> <sup>Tla</sup> (Dopa)	1xHydrolyse	2.74	1299.60	1299.47
		3.19	1299.50	
		3.21	1299.26	
		3.21	1298.94	
U <sub>PEG1*</sub> <sup>Tla</sup> (Dopa)-U <sub>PEG1*</sub> <sup>Tla</sup> (Dopa)	2xHydrolyse	3.07	1317.96	1317.49
		3.17	1318.36	
U <sub>PEG1*</sub> <sup>Tla</sup> (Dopa)-U <sub>PEG1*</sub> <sup>Tla</sup> (Dopa)	1xAminolyse	2.98	1342.64	1342.54
		2.99	1342.58	
U <sub>PEG1*</sub> <sup>Tla</sup> (Dopa)-U <sub>PEG1*</sub> <sup>Tla</sup> (Dopa)	2xAminolyse	2.49	1403.54	1403.63
		2.51	1403.16	
		2.60	1403.60	
		2.61	1403.68	
		2.84	1403.14	
U <sub>PEG1*</sub> <sup>Tla</sup> (Dopa)-U <sub>PEG1*</sub> <sup>Tla</sup> (Dopa)	1xHydrolyse	2.75	1360.60	1360.56
	1xAminolyse	2.76	1360.44	

### 6.6.22 UPLC-ESI-MS-Messung der Oxidation von $U_{1^*}^{oNv}$

Eine Lösung aus 0.32 mM  $U_{1^*}^{oNv}$  in Reinstwasser/Acetonitril (1:1, v/v) + 0.1 % Essigsäure wurde für 5 min mit 1 Äq.  $NaIO_4$  umgesetzt und im Anschluss mittels UPLC-ESI-MS gemessen. Der Vergleich der Chromatogramme vor und nach der Oxidation (Abbildung E 87) zeigt, dass verschiedene Oxidationsprodukte gebildet werden. Durch Analyse mittels ESI-MS (Abbildung E 88) können den Signalen oxidierte  $U_{1^*}^{oNv}$  Unimere, die Dopachinon und  $\Delta$ Dopachinon zugeordnet werden, was einen quantitativen Umsatz belegt.



**Abbildung E 87.** UPLC-Messung der Oxidation von  $U_{1^*}^{oNv}$  mit 1 Äq.  $NaIO_4$ . Chromatogramme vor Oxidation (a) und nach der Oxidation (b). (Laufmittelgradient 10-35 % B (4.5 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).

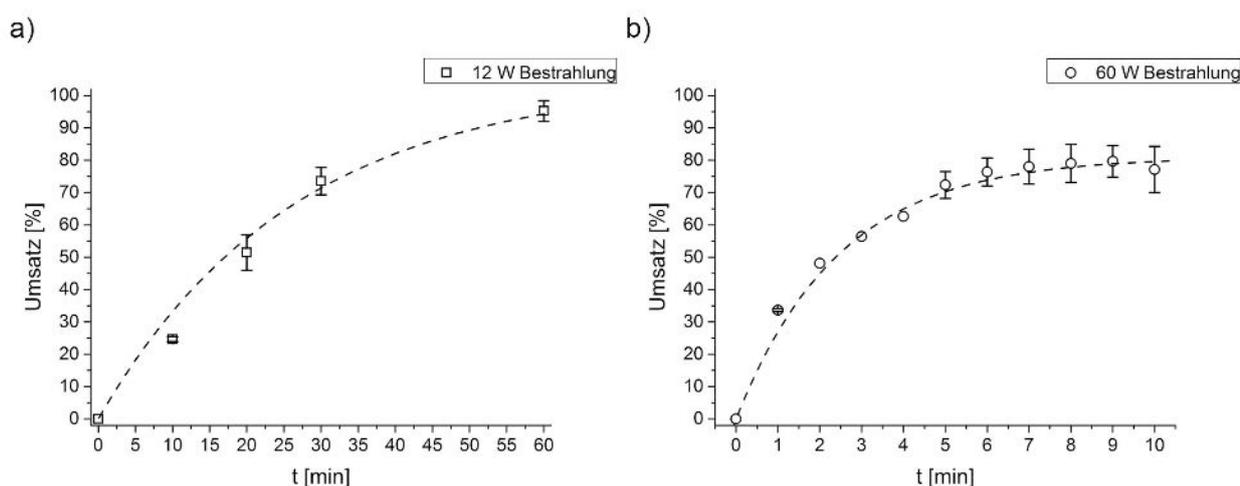
a)  $t_R = 1.43$  minb)  $t_R = 1.69$  minc)  $t_R = 1.80$  mind)  $t_R = 2.21$  mine)  $t_R = 2.35$  minf)  $t_R = 2.55$  min

**Abbildung E 88.** Oxidation von  $U_1^{*ONv}$ . ESI-MS-Spektren der verschiedenen Peaks aus den Chromatogrammen. a) und b) Die Massen entsprechen der Oxidation zu Dopachinon. c) Das Spektrum zeigt die Masse des nicht-oxidierten Unimers. d), e) und f) Die gemessenen Massen entsprechen der Oxidation zu  $\Delta$ Dopachinon.

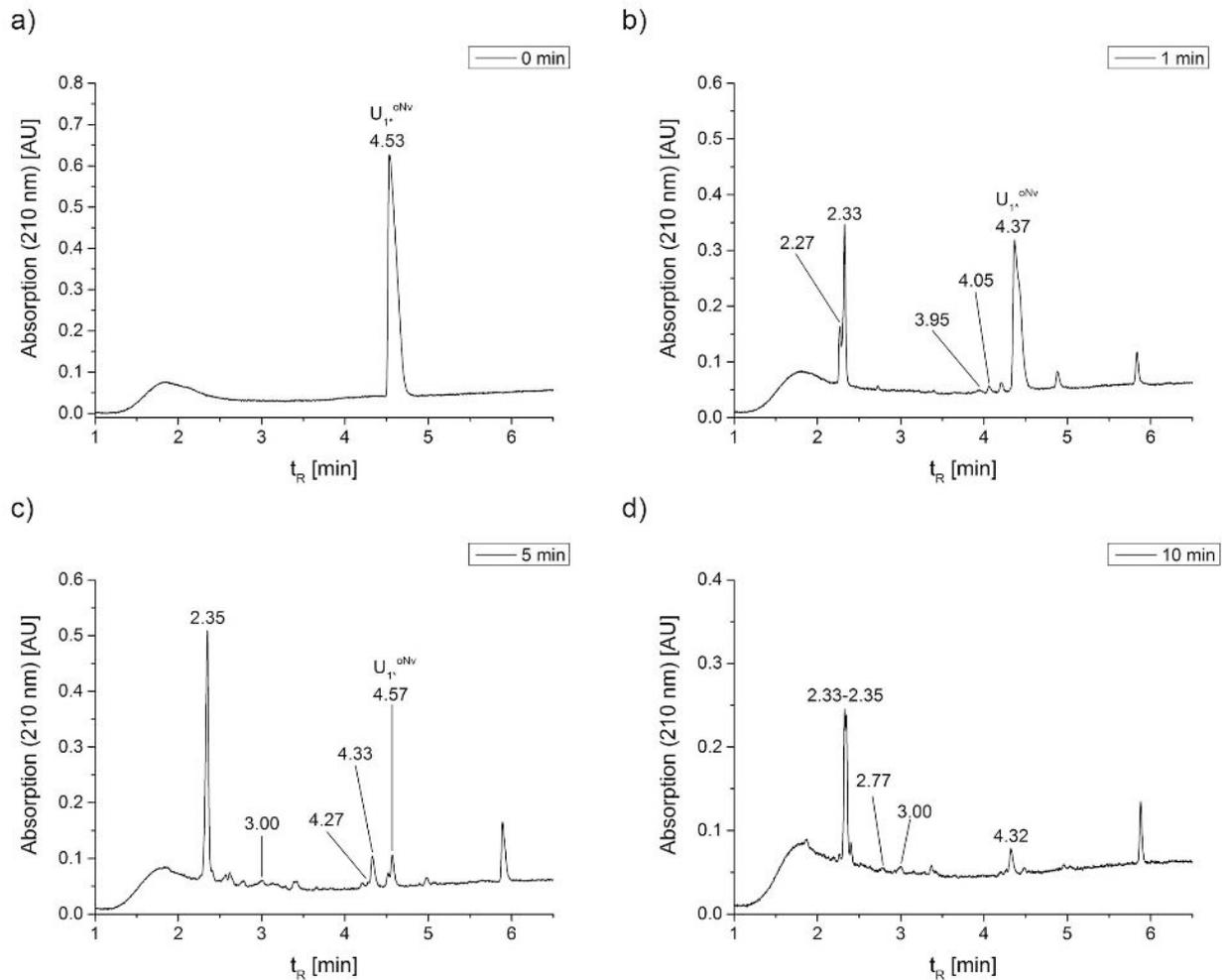
### 6.6.23 Kinetische UPLC-ESI-MS-Messungen der Photolyse von $U_1^{*oNv}$ in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch

Lösungen aus 0.32 mM  $U_1^{*oNv}$  in Reinstwasser/Acetonitril (1:1, v/v) + 0.1 % Essigsäure wurden jeweils mit einer Leuchtquelle, mit einer Leistung von 12 W und 60 W, bei  $\sim 350$  nm bestrahlt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels UPLC-ESI-MS gemessen. Die Kinetik der photolytischen Abspaltung der Nitroveratryl-Schutzgruppe (Abbildung E 89) verläuft in beiden Fällen nach einem exponentiellen Prozess und erreicht maximale Umsätze von 95 % und 80 %.

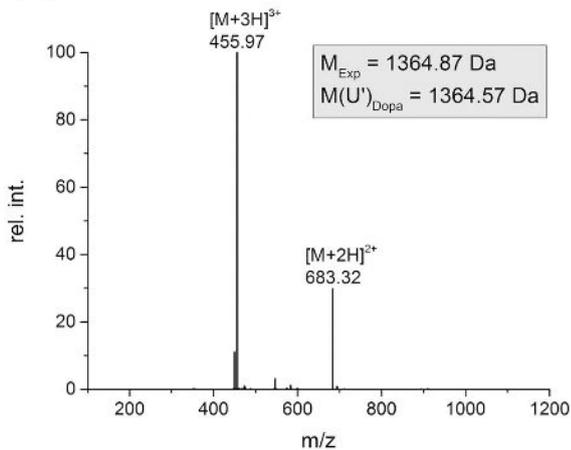
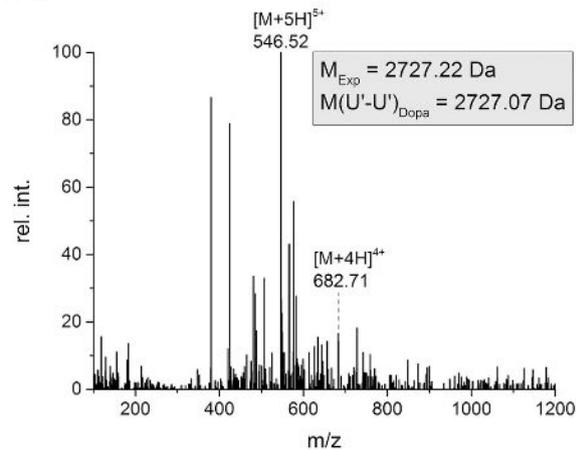
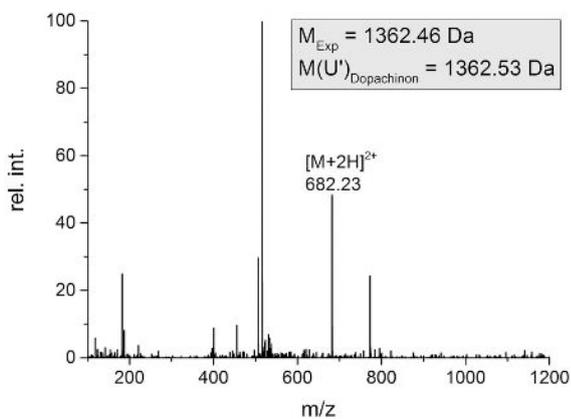
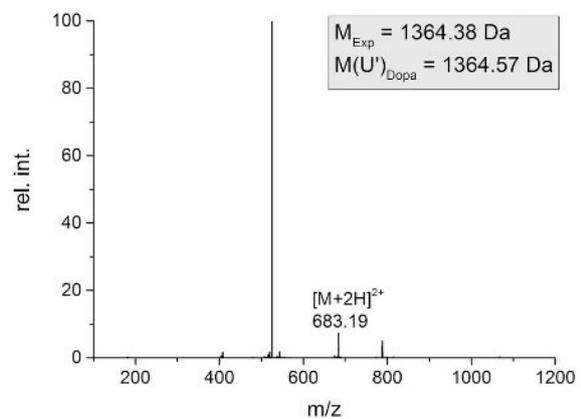
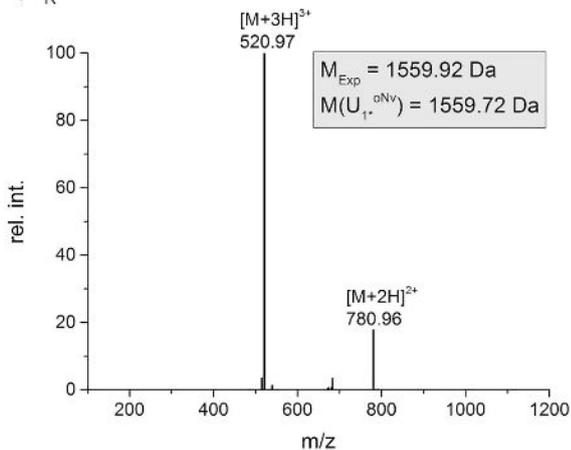
Die in Abbildung E 90 dargestellten Chromatogramme zeigen neben den verschiedenen Reaktionsprodukten der Photolyse ( $U'$ ) auch Nebenprodukte durch Addition von Abspaltprodukten der Nitroveratryl-Gruppe. Die durch ESI-MS-Messungen charakterisierten Signale zeigen Massen des Unimers mit abgespaltener oNv-Gruppe ( $U'$ ) in verschiedenen Oxidationszuständen sowie Dimere bestehend aus  $U'-U'$  (Abbildung E 91).



**Abbildung E 89.** Zeitabhängiger Umsatz der Photolyse von  $U_1^{*oNv}$  bestimmt durch kinetische UPLC-ESI-MS-Messungen. a) Bestrahlung bei  $\sim 350$  nm mit einer 12 W Leuchtquelle. b) Bestrahlung bei  $\sim 350$  nm mit einer 60 W Leuchtquelle. (Bedingungen: 0.32 mM  $U_1^{*oNv}$  in Reinstwasser/ACN, 1:1 (v/v) + 0.1 % Essigsäure; gestrichelte Linien dienen zur Orientierung).



**Abbildung E 90.** Kinetische UPLC-Messungen der Photolyse von  $U_{1^*}^{oNv}$  durch Bestrahlung mit einer 60 W Leuchtquelle. Chromatogramme zu Beginn (a) sowie nach 1 min (b), 5 min (c) und 10 min Reaktionszeit (d). Aufgeführte Retentionszeiten ohne weitere Beschriftung geben Peaks an, die zu photolysierten Reaktionsprodukten gehören. (Laufmittelgradient 3-25 % B (7 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).

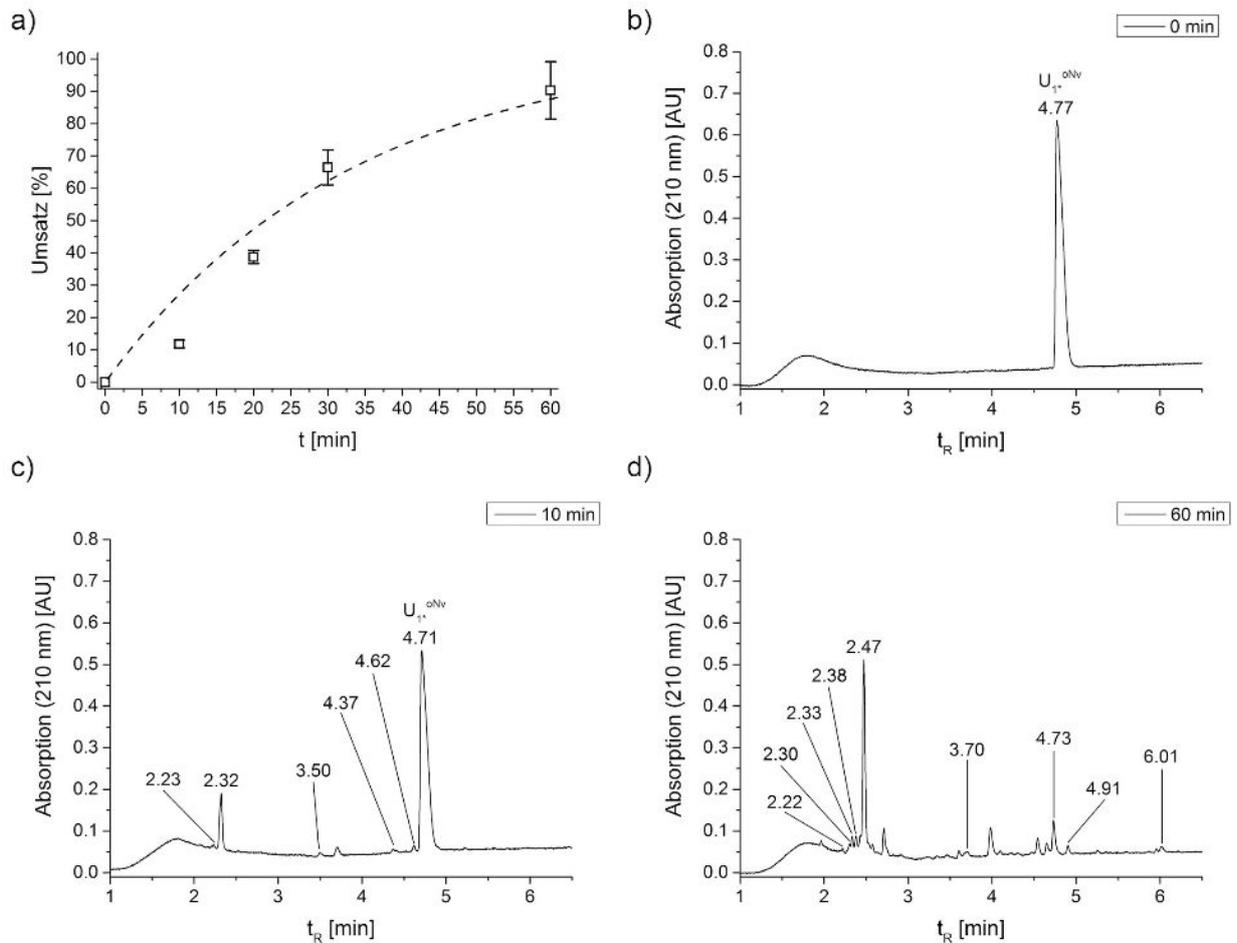
a)  $t_R = 2.27-2.35$  minb)  $t_R = 2.77-3.00$  minc)  $t_R = 3.95-4.27$  mind)  $t_R = 4.32$  mine)  $t_R = 4.37-4.57$  min

**Abbildung E 91.** Photolyse von  $U_{1*}^{oNv}$ . ESI-MS-Spektren der in den Chromatogrammen angegebenen Peaks. a) und d) Die Massen entsprechen dem Unimer nach Abspaltung der  $oNv$ -Gruppe ( $U'$ ) im Oxidationszustand von Dopa. b) Das Spektrum zeigt die Masse des  $U'-U'$  Dimers aus photolysiertem  $U'$  im Oxidationszustand von Dopa. c) Die Masse entspricht dem Unimer nach Abspaltung der  $oNv$ -Gruppe ( $U'$ ) im Oxidationszustand von Dopachinon. e) Die gemessene Masse entspricht dem Edukt  $U_{1*}^{oNv}$ .

#### 6.6.24 Kinetische UPLC-ESI-MS-Messungen der Photolyse von $U_{1*}^{oNv}$ in Wasser

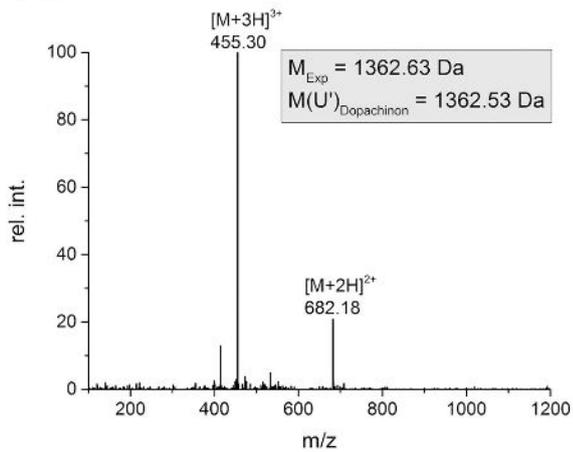
Eine Lösung aus 0.32 mM  $U_{1*}^{oNv}$  in Reinstwasser wurde mit einer Leuchtquelle, mit einer Leistung von 12 W, bei  $\sim 350$  nm bestrahlt. Vor Beginn sowie nach 10, 20, 30 und 60 min der Reaktion wurden

Proben entnommen und mittels UPLC-ESI-MS gemessen. Die Kinetik und die einzelnen Chromatogramme (Abbildung E 92) zeigen eine mit der Zeit zunehmende Abspaltung der Nitroveraryl-Gruppe und die Bildung verschiedener Reaktionsprodukte. Die durch ESI-MS-Messungen charakterisierten  $S$  zeigen Massen des Unimers mit abgespaltener  $oNv$ -Gruppe ( $U'$ ) in verschiedenen Oxidationszuständen sowie Dimere bestehend aus  $U'-U'$  und  $U_1^{oNv}-U'$ . Zusätzlich sind auch Nebenprodukte durch Addition von Abspaltprodukten der Nitroveraryl-Gruppe zu erkennen.

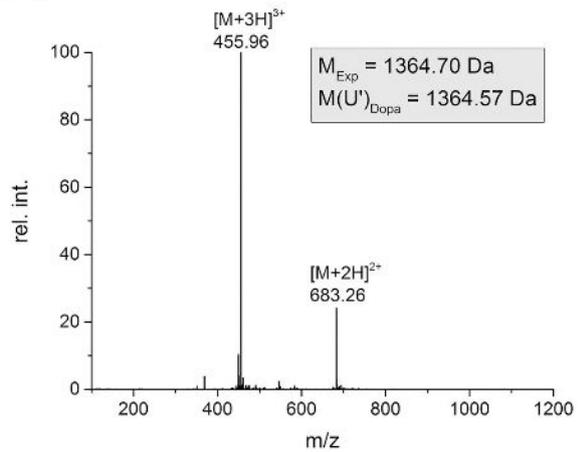


**Abbildung E 92.** Kinetische UPLC-Messungen der Photolyse von  $U_1^{oNv}$ . a) Kinetik der  $oNv$ -Abspaltung durch Bestrahlung bei  $\sim 350$  nm mit einer 12 W Leuchtquelle. Chromatogramme zu Beginn (b) sowie nach 10 min (c) und 60 min Reaktionszeit (d). Aufgeführte Retentionszeiten ohne weitere Beschriftung geben Peaks an, die zu photolysierten Reaktionsprodukten gehören. (Laufmittelgradient 3-25 % B (7 min); Laufmittel A: Reinstwasser, 0.1 % FA, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % FA).

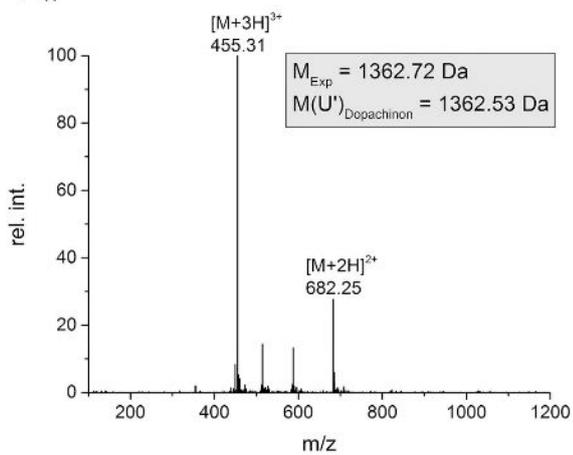
a)  $t_R = 2.22-2.30$  min



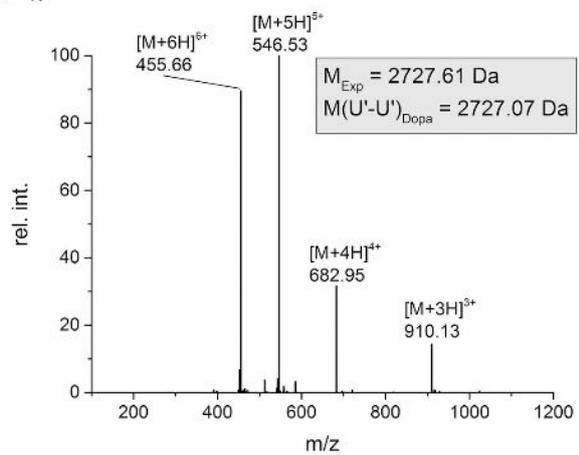
b)  $t_R = 2.32-2.33$  min



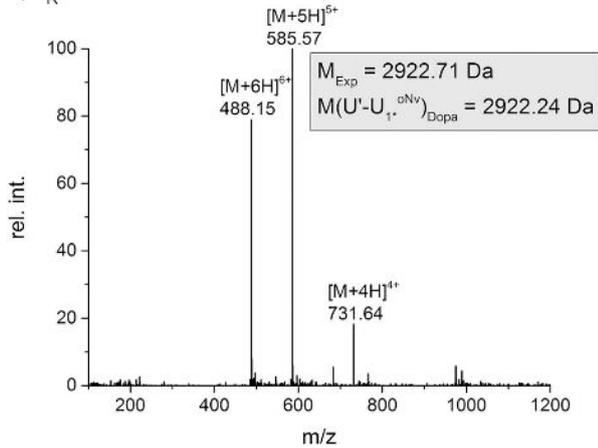
c)  $t_R = 2.38$  min



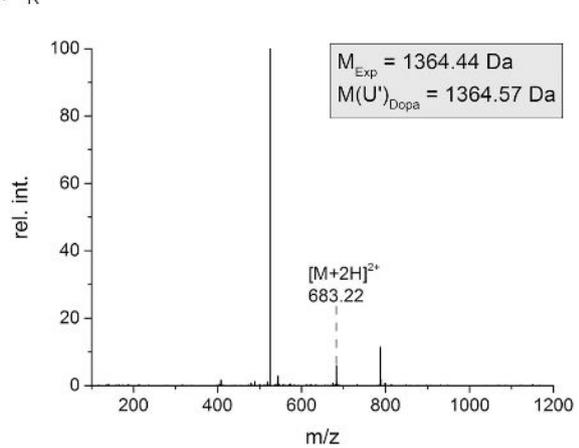
d)  $t_R = 2.47$  min

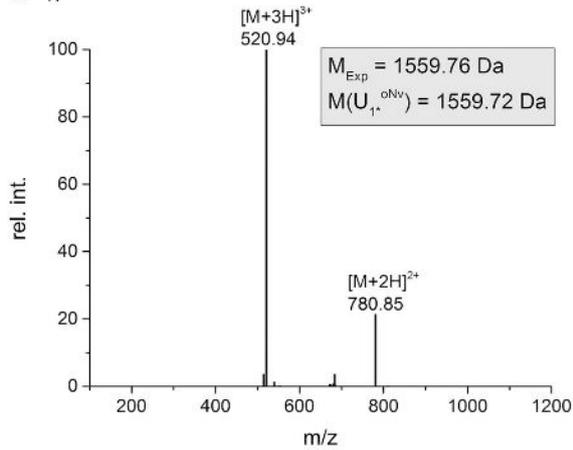
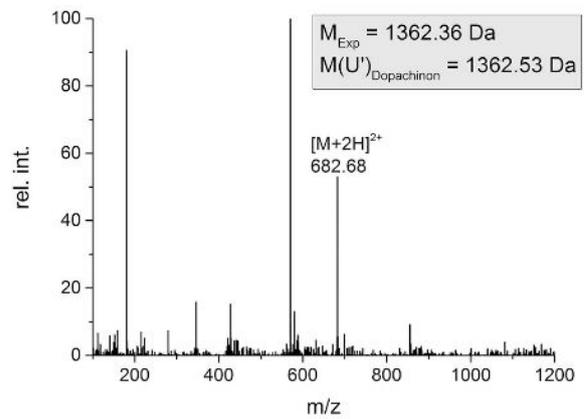


e)  $t_R = 3.50-3.70$  min



f)  $t_R = 4.37-4.73$  min



g)  $t_R = 4.71-4.91$  minh)  $t_R = 6.01$  min

**Abbildung E 93.** Photolyse von  $U_1^{*oNv}$ . ESI-MS-Spektren der in den Chromatogrammen angegebenen Peaks. a), c) und h) Die Massen entsprechen dem Unimer nach Abspaltung der  $oNv$ -Gruppe ( $U'$ ) im Oxidationszustand von Dopachinon. b) und f) Die Spektren zeigen die Masse des Unimers nach Abspaltung der  $oNv$ -Gruppe ( $U'$ ) im Oxidationszustand von Dopa. d) Die gemessene Masse entspricht dem  $U'-U'$  Dimer aus photolysiertem  $U'$  im Oxidationszustand von Dopa. e) Die Masse entspricht dem  $U'-U_1^{*oNv}$  Dimer aus einem photolysierten und nicht-reagierten Unimer im Oxidationszustand von Dopa. g) Das Spektrum zeigt eine Masse, die dem Edukt  $U_1^{*oNv}$  entspricht.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden gemäß des Ein- und Dreibuchstabencodes der Joint Commission of Biochemical Nomenclature aus der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) und der International Union of Biochemistry (IUB) abgekürzt.<sup>305</sup>

<i>Ab</i> PPO4	- <i>Agaricus bisporus</i> Polyphenoloxidase Isoform 4
Acm	- Acetamidomethyl
AAV	- allgemeine Arbeitsvorschrift
ATRP	- <i>atom transfer radical polymerization</i> (Atomtransferpolymerisation)
Äq.	- Äquivalent
avg.	- <i>average</i> (Mittel)
ber.	- berechnet
Boc	- <i>tert</i> -Butoxycarbonyl
cDNA	- <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
$\alpha$ -CHCA	- $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
CFK	- Carbonfaserverstärkter Kunststoff
CID	- <i>collision induced dissociation</i> (Kollisionsinduzierte Dissoziation)
CP-AFM	- <i>colloidal probe atomic force microscopy</i> (Kolloidalrastersondenmikroskopie)
DCM	- Dichlormethan
DFT	- <i>density functional theory</i> (Dichtefunktionaltheorie)
DHB	- 2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	- <i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMA	- Dopaminmethacrylamid
DMAc	- <i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMF	- <i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMT	- DERJAGUIN-MULLER-TOPOROV-Modell
Dopa	- L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
$\Delta$ Dopa	- $\alpha,\beta$ -Dehydrodopa
$\Delta$ Dopachinon	- $\alpha,\beta$ -Dehydrodopachinon
DP	- <i>degree of polymerization</i> (Polymerisationsgrad)
DTNB	- 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
<i>E. coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
ESI	- Elektrosprayionisation

<i>et al.</i>	- <i>et alii</i> (und andere)
EThcD	- <i>electron-transfer and higher-energy collisional dissociation</i> (Elektronentransfer- und Kollisionsdissoziation mit höherer Energie)
exp.	- experimentell
FA	- <i>formic acid</i> (Ameisensäure)
Fmoc	- 9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GST	- Glutathion-S-Transferase
HBTU	- 2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOBT	- 1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	- <i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie)
JKR	- JOHNSON-KENDALL-ROBERTS-Modell
LB-Medium	- <i>lysogeny broth</i> (Nährmedium)
MALDI	- <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
<i>Mcfp</i>	- <i>Mytilus californianus foot protein</i> ( <i>Mytilus californianus</i> Fußprotein)
MD	- MAUGIS-DUGDALE-Modell
<i>Mefp</i>	- <i>Mytilus edulis foot protein</i> ( <i>Mytilus edulis</i> Fußprotein)
MeOH	- Methanol
mfp	- <i>mussel foot protein</i> (Muschelfußprotein)
<i>Mgfp</i>	- <i>Mytilus galloprovincialis foot protein</i> ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> Fußprotein)
MS	- Massenspektrometrie
NCA	- <i>N</i> -Carboxyanhydrid
NMP	- <i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	- <i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
oNv	- 2-Nitroveratryl
<i>Pcfp</i>	- <i>Perna canaliculus foot protein</i> ( <i>Perna canaliculus</i> Fußprotein)
PCR	- <i>polymerase chain reaction</i> (Polymersae-Kettenreaktion)
PEG	- Polyethylenglykol
PhAcm	- Phenylacetamidomethyl
PMMA	- Polymethylmethacrylat
PPO	- Polyphenoxidase
preCOL	- <i>prepolymerized collagen</i> (präpolymerisiertes Kollagen)
PyBOP	- Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
QCM-D	- <i>quartz crystal microbalance with dissipation</i> (Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipation)

RAFT	- <i>reversible addition-fragmentation chain transfer</i> (Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragung)
ROMP	- <i>ring-opening metathesis polymerization</i> (Ringöffnungsmethathese-polymerisation)
SDS	- <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SFA	- <i>surface forces apparatus</i> (Oberflächenkraft-Apparatur)
SPPS	- <i>solid phase peptide synthesis</i> (Festphasenpeptidsynthese)
S <sup>t</sup> Bu	- <i>tert</i> -Butylmercapto
tBu	- <i>tert</i> -Butyl
TES	- Triethylsilan
TFA	- Trifluoressigsäure
THF	- Tetrahydrofuran
Tla	- Thiolacton
TMP	- <i>thread matrix protein</i> (Fadenmatrixprotein)
TNB	- 2-Nitro-5-thiobenzoat
TOF	- <i>time of flight</i> (Flugzeitanalyse)
Trt	- Triphenylmethyl
Tris	- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPLC	- <i>ultra performance liquid chromatography</i> (Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatografie)
UV/VIS	- <i>ultraviolet-visible</i> (ultraviolett-sichtbar)
XIC	- <i>extracted-ion chromatogram</i> (Extrahiertes Ionenchromatogramm)

## 8 Literaturverzeichnis

1. Comyn J. Environmental (durability) effects. In: *Adhesive Bonding*. Woodhead Publishing (2005).
2. Walker G. Marine organisms and their adhesion. In: *Synthetic Adhesives and Sealants*. John Wiley & Sons (1987).
3. Waite JH. Mussel adhesion – essential footwork. *J. Exp. Biol.* **220** (4), 517-530 (2017).
4. Stewart RJ, Ransom TC, Hlady V. Natural underwater adhesives. *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* **49** (11), 757-771 (2011).
5. Silverman HG, Roberto FF. Understanding Marine Mussel Adhesion. *Mar. Biotechnol.* **9** (6), 661-681 (2007).
6. Arora A, Arora T. Materials For Innovative Eco Products. *Mater. Technol.* **19** (3), 154-158 (2004).
7. Waite JH. Evidence for a repeating 3,4-dihydroxyphenylalanine- and hydroxyproline-containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel, *Mytilus edulis* L. *J. Biol. Chem.* **258** (5), 2911-2915 (1983).
8. North MA, Del Grosso CA, Wilker JJ. High Strength Underwater Bonding with Polymer Mimics of Mussel Adhesive Proteins. *ACS Appl. Mater. Inter.* **9** (8), 7866-7872 (2017).
9. Wei Q, Achazi K, Liebe H, Schulz A, Noeske P-LM, Grunwald I, Haag R. Mussel-Inspired Dendritic Polymers as Universal Multifunctional Coatings. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53** (43), 11650-11655 (2014).
10. Ahn BK, Das S, Linstadt R, *et al.* High-performance mussel-inspired adhesives of reduced complexity. *Nat. Commun.* **6** (2015).
11. Ko R, Cadieux PA, Dalsin JL, Lee BP, Elwood CN, Razvi H. First Prize: Novel Uropathogen-Resistant Coatings Inspired by Marine Mussels. *J. Endourol.* **22** (6), 1153-1160 (2008).
12. Gunawan RC, King JA, Lee BP, Messersmith PB, Miller WM. Surface Presentation of Bioactive Ligands in a Nonadhesive Background Using DOPA-Tethered Biotinylated Poly(ethylene glycol). *Langmuir* **23** (21), 10635-10643 (2007).
13. Huang K, Lee BP, Ingram DR, Messersmith PB. Synthesis and Characterization of Self-Assembling Block Copolymers Containing Bioadhesive End Groups. *Biomacromolecules* **3** (2), 397-406 (2002).
14. Dalsin JL, Hu B-H, Lee BP, Messersmith PB. Mussel Adhesive Protein Mimetic Polymers for the Preparation of Nonfouling Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **125** (14), 4253-4258 (2003).
15. Dalsin JL, Lin L, Tosatti S, Vörös J, Textor M, Messersmith PB. Protein Resistance of Titanium Oxide Surfaces Modified by Biologically Inspired mPEG-DOPA. *Langmuir* **21** (2), 640-646 (2005).
16. Lee BP, Dalsin JL, Messersmith PB. Synthesis and Gelation of DOPA-Modified Poly(ethylene glycol) Hydrogels. *Biomacromolecules* **3** (5), 1038-1047 (2002).
17. Burke SA, Ritter-Jones M, Lee BP, Messersmith PB. Thermal gelation and tissue adhesion of biomimetic hydrogels. *Biomed. Mater.* **2** (4), 203 (2007).
18. Brubaker CE, Kissler H, Wang L-J, Kaufman DB, Messersmith PB. Biological performance of mussel-inspired adhesive in extrahepatic islet transplantation. *Biomaterials* **31** (3), 420-427 (2010).
19. Bilic G, Brubaker C, Messersmith PB, *et al.* Injectable candidate sealants for fetal membrane repair: bonding and toxicity in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **202** (1), 85.e81-85.e89 (2010).
20. Perrini M, Barrett D, Ochsenbein-Koelble N, Zimmermann R, Messersmith P, Ehrbar M. A comparative investigation of mussel-mimetic sealants for fetal membrane repair. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **58** 57-64 (2016).
21. Barrett DG, Bushnell GG, Messersmith PB. Mechanically Robust, Negative-Swelling, Mussel-Inspired Tissue Adhesives. *Adv. Healthc. Mater.* **2** (5), 745-755 (2013).

22. Glass P, Chung H, Washburn NR, Sitti M. Enhanced Reversible Adhesion of Dopamine Methacrylamide-Coated Elastomer Microfibrillar Structures under Wet Conditions. *Langmuir* **25** (12), 6607-6612 (2009).
23. Lee H, Lee BP, Messersmith PB. A reversible wet/dry adhesive inspired by mussels and geckos. *Nature* **448** (7151), 338-341 (2007).
24. Krogsgaard M, Behrens MA, Pedersen JS, Birkedal H. Self-Healing Mussel-Inspired Multi-pH-Responsive Hydrogels. *Biomacromolecules* **14** (2), 297-301 (2013).
25. He L, Fullenkamp DE, Rivera JG, Messersmith PB. pH responsive self-healing hydrogels formed by boronate-catechol complexation. *Chem. Commun.* **47** (26), 7497-7499 (2011).
26. Paunesku T, Rajh T, Wiederrecht G, et al. Biology of TiO<sub>2</sub>-oligonucleotide nanocomposites. *Nat. Mater.* **2** (5), 343-346 (2003).
27. Xu C, Xu K, Gu H, et al. Dopamine as A Robust Anchor to Immobilize Functional Molecules on the Iron Oxide Shell of Magnetic Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126** (32), 9938-9939 (2004).
28. Lee Y, Lee H, Kim YB, et al. Bioinspired Surface Immobilization of Hyaluronic Acid on Monodisperse Magnetite Nanocrystals for Targeted Cancer Imaging. *Adv. Mater.* **20** (21), 4154-4157 (2008).
29. Sun I-C, Eun D-K, Na JH, et al. Heparin-Coated Gold Nanoparticles for Liver-Specific CT Imaging. *Chem. Eur. J.* **15** (48), 13341-13347 (2009).
30. Yang C, Yang Z, Gu H, Chang CK, Gao P, Xu B. Facet-Selective 2D Self-Assembly of TiO<sub>2</sub> Nanoleaves via Supramolecular Interactions. *Chem. Mater.* **20** (24), 7514-7520 (2008).
31. Ahn BK. Perspectives on Mussel-Inspired Wet Adhesion. *J. Am. Chem. Soc.* **139** (30), 10166-10171 (2017).
32. Yu J, Kan Y, Rapp M, et al. Adaptive hydrophobic and hydrophilic interactions of mussel foot proteins with organic thin films. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110** (39), 15680-15685 (2013).
33. Wei W, Yu J, Broomell C, Israelachvili JN, Waite JH. Hydrophobic Enhancement of Dopa-Mediated Adhesion in a Mussel Foot Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **135** (1), 377-383 (2013).
34. Wei W, Tan Y, Martinez Rodriguez NR, Yu J, Israelachvili JN, Waite JH. A mussel-derived one component adhesive coacervate. *Acta Biomater.* **10** (4), 1663-1670 (2014).
35. Rapp MV, Maier GP, Dobbs HA, Higdon NJ, Waite JH, Butler A, Israelachvili JN. Defining the Catechol-Cation Synergy for Enhanced Wet Adhesion to Mineral Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **138** (29), 9013-9016 (2016).
36. Hwang DS, Zeng H, Lu Q, Israelachvili J, Waite JH. Adhesion mechanism in a DOPA-deficient foot protein from green mussels. *Soft Matter* **8** (20), 5640-5648 (2012).
37. Waite JH, Andersen NH, Jewhurst S, Sun C. Mussel Adhesion: Finding the Tricks Worth Mimicking. *J. Adhes.* **81** (3-4), 297-317 (2005).
38. Wang J, Scheibel T. Recombinant Production of Mussel Byssus Inspired Proteins. *Biotechnol. J.* **13** (12), 1800146 (2018).
39. Yamamoto H. Synthesis and adhesive studies of marine polypeptides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (0), 613-618 (1987).
40. Taylor CM, Weir CA. Synthesis of the Repeating Decapeptide Unit of Mefp1 in Orthogonally Protected Form. *J. Org. Chem.* **65** (5), 1414-1421 (2000).
41. Boëda E, Connan J, Dessort D, Muhesen S, Mercier N, Valladas H, Tisnérat N. Bitumen as a hafting material on Middle Palaeolithic artefacts. *Nature* **380** (6572), 336-338 (1996).
42. Grünberg JM. Middle Palaeolithic birch-bark pitch. *Antiquity* **76** (291), 15-16 (2002).
43. Mazza PPA, Martini F, Sala B, et al. A new Palaeolithic discovery: tar-hafted stone tools in a European Mid-Pleistocene bone-bearing bed. *J. Archaeol. Sci.* **33** (9), 1310-1318 (2006).
44. Baekeland LH. The Synthesis, Constitution, and Uses of Bakelite. *J. Ind. Eng. Chem.* **1** (3), 149-161 (1909).

45. Keim W. *Kunststoffe : Synthese, Herstellungsverfahren, Apparaturen*, 1. edn. WILEY-VCH (2006).
46. da Silva LFM, Öchsner A, Adams RD. *Handbook of Adhesion Technology*. Springer (2011).
47. Fritz AH. Fügen. In: *Fertigungstechnik*. 12. edn. Springer (2018).
48. Habenicht G. *Kleben: Grundlagen, Technologien, Anwendungen*, 6. edn. Springer (2009).
49. McBain JW, Hopkins DG. On Adhesives and Adhesive Action. *J. Phys. Chem.* **29** (2), 188-204 (1924).
50. Fowkes FM. Role of acid-base interfacial bonding in adhesion. *J. Adhesion Sci. Tech.* **1** (1), 7-27 (1987).
51. Leadley SR, Watts JF. The Use of Monochromated XPS to Evaluate Acid-Base Interactions at the PMMA/Oxidised Metal Interface. *J. Adhesion* **60** (1-4), 175-196 (1997).
52. Kollek H. Some aspects of chemistry in adhesion on anodized aluminium. *Int. J. Adhes. Adhes.* **5** (2), 75-80 (1985).
53. Packham DE. Surface energy, surface topography and adhesion. *Int. J. Adhes. Adhes.* **23** (6), 437-448 (2003).
54. Fuller KNG, Tabor D. The Effect of Surface Roughness on the Adhesion of Elastic Solids. *Proc. R. Soc. Lon. Ser. A* **345** (1642), 327-342 (1975).
55. Gent AN, Lai S-M. Adhesion and Autohesion of Rubber Compounds: Effect of Surface Roughness. *Rubber Chem. Technol.* **68** (1), 13-25 (1995).
56. Evans JRG, Packham DE. Adhesion of Polyethylene to Metals: The Role of Surface Topography. *J. Adhesion* **10** (3), 177-191 (1979).
57. Hine PJ, Muddarris SE, Packha DE. Surface Pretreatment of Zinc and its Adhesion to Epoxy Resins. *J. Adhesion* **17** (3), 207-229 (1984).
58. Gay C, Leibler L. Theory of Tackiness. *Phys. Rev. Lett.* **82** (5), 936-939 (1999).
59. Derjaguin BV, Krotova NA. *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.* **61** 849 (1948).
60. Possart W. Experimental and theoretical description of the electrostatic component of adhesion at polymer/metal contacts. *Int. J. Adhes. Adhes.* **8** (2), 77-83 (1988).
61. Bauer A, Bischof C. Adhäsionsprobleme und die elektrochemische Spannungsreihe. *Adhäsion: Kleben & Dichten* **37** (10), 32-34 (1993).
62. Bischof C, Bauer A, Possart W, Kapelle R, Schulze RD. Zur Adhäsion in Metall-Polymer-Grenzschichten und ihrer praktischen Nutzung. *Acta Polym.* **40** (3), 214-221 (1989).
63. Voyutskii SS, Vakula VL. The role of diffusion phenomena in polymer-to-polymer adhesion. *J. Appl. Polym. Sci.* **7** (2), 475-491 (1963).
64. Voyutskii SS. The Diffusion Theory of Adhesion. *Rubber Chem. Technol.* **33** (3), 748-756 (1960).
65. Packham DE. *Handbook of Adhesion*, 2nd edn. John Wiley & Sons Ltd (2005).
66. Mubashar A, Ashcroft IA, Critchlow GW, Crocombe AD. Moisture absorption-desorption effects in adhesive joints. *Int. J. Adhes. Adhes.* **29** (8), 751-760 (2009).
67. Comyn J, Brewis DM, Tredwell ST. Bonding of Aluminium Alloy with some Phenolic Adhesives and a Modified Epoxide Adhesive, and Strength Changes on Exposure to Moist Air at 50°C. *J. Adhes.* **21** (1), 59-78 (1987).
68. Gledhill RA, Kinloch AJ, Shaw SJ. A Model for Predicting Joint Durability. *J. Adhes.* **11** (1), 3-15 (1980).
69. Brewis DM, Comyn J, Raval AK, Kinloch AJ. The effect of humidity on the durability of aluminium-epoxide joints. *Int. J. Adhes. Adhes.* **10** (4), 247-253 (1990).
70. Comyn J, Groves CL, Saville RW. Durability in high humidity of glass-to-lead alloy joints bonded with an epoxide adhesive. *Int. J. Adhes. Adhes.* **14** (1), 15-20 (1994).
71. Butt RI, Cotter JL. The Effect of High Humidity on the Dynamic Mechanical Properties and Thermal Transitions of an Epoxy-polyamide Adhesive. *J. Adhes.* **8** (1), 11-19 (1976).
72. Comrie R, Affrossman S, Pethrick RA. Ageing of Adhesive Bonds with Various Surface Treatments, Part 2: Acrylic Modified Amine-Cured Epoxy Resin. *J. Adhes.* **81** (12), 1183-1197 (2005).

73. Parker BM. On the Environmental Durability of Adhesive Bonded Titanium Joints. *J. Adhes.* **26** (2-3), 131-154 (1988).
74. Tan KT, Vogt BD, White CC, *et al.* On the Origins of Sudden Adhesion Loss at a Critical Relative Humidity: Examination of Bulk and Interfacial Contributions. *Langmuir* **24** (17), 9189-9193 (2008).
75. Gledhill RA, Kinloch AJ. Environmental Failure of Structural Adhesive Joints. *J. Adhes.* **6** (4), 315-330 (1974).
76. Goglio L, Rezaei M. Degradation of Epoxy-Steel Single Lap Joints Immersed in Water. *J. Adhes.* **91** (8), 621-636 (2015).
77. Comyn J. *Durability of Structural Adhesives*. Applied Science Publishers (1983).
78. Israelachvili JN. *Intermolecular and surface forces*, 3rd edn. Academic Press Ltd. (2011).
79. Brewis DM, Comyn J, Tegg JL. The uptake of water vapour by an epoxide adhesive formed from the diglycidyl ether of bisphenol-A and di-(1-aminopropyl-3-ethoxy) ether. *Polymer* **21** (2), 134-138 (1980).
80. Ashcroft IA, Digby RP, Shaw SJ. A Comparison of Laboratory-conditioned and Naturally-weathered Bonded Joints. *J. Adhes.* **75** (2), 175-201 (2001).
81. Brewis DM, Comyn J, Cope BC, Moloney AC. Effect of carriers on the performance of aluminum alloy joints bonded with a structural film adhesive. *Polym. Eng. Sci* **21** (12), 797-803 (1981).
82. Brewis DM, Comyn J, Tegg JL. The durability of some epoxide adhesive-bonded joints on exposure to moist warm air. *Int. J. Adhes. Adhes.* **1** (1), 35-39 (1980).
83. Stumm W. *Aquatic chemistry : chemical equilibria and rates in natural waters*, 3rd edn. Wiley (1996).
84. Akdogan Y, Wei W, Huang K-Y, *et al.* Intrinsic Surface-Drying Properties of Bioadhesive Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53** (42), 11253-11256 (2014).
85. Thomas LA, Hermans CO. Adhesive Interactions Between the Tube Feet of a Starfish, *Leptasterias Hexactis*, and Substrata. *Biol. Bull.* **169** (3), 675-688 (1985).
86. Grenon JF, Walker G. The histology and histochemistry of the pedal glandular system of two limpets, *Patella vulgata* and *Acmaea tessulata* (Gastropoda: Prosobranchia). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **58** (4), 803-816 (1978).
87. Flammang P. Adhesion in echinoderms. In: *Echinoderm studies*. Balkema (1996).
88. Hamwood ET, Cribb WB, Halliday AJ, Kearn CG, Whittington DI. Preliminary characterisation and extraction of anterior adhesive secretion in monogenean (platyhelminth) parasites. *Folia Parasit.* **49** (1), 39-49 (2002).
89. Tyler S, Rieger GE. Adhesive organs of the gastrotricha. *Zoomorphologie* **95** (1), 1-15 (1980).
90. Waite JH, Tanzer ML. The bioadhesive of *Mytilus byssus*: A protein containing L-DOPA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **96** (4), 1554-1561 (1980).
91. Jensen RA, Morse DE. The bioadhesive of *Phragmatopoma californica* tubes: a silk-like cement containing L-DOPA. *J. Comp. Physiol.* **158** (3), 317-324 (1988).
92. Kamino K, Inoue K, Maruyama T, Takamatsu N, Harayama S, Shizuri Y. Barnacle Cement Proteins: Importance of Disulfide Bonds in Their Insolubility. *J. Biol. Chem.* **275** (35), 27360-27365 (2000).
93. Whittington ID, Cribb BW. Adhesive secretions in the platyhelminthes. In: *Advances in Parasitology*. Academic Press (2001).
94. Merker RI, Smit J. Characterization of the Adhesive Holdfast of Marine and Freshwater Caulobacters. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** (8), 2078-2085 (1988).
95. Poindexter JS. The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiol. Rev.* **45** (1), 123-179 (1981).
96. Petrone L, Easingwood R, Barker MF, McQuillan AJ. In situ ATR-IR spectroscopic and electron microscopic analyses of settlement secretions of *Undaria pinnatifida* kelp spores. *J. R. Soc. Interface* **8** (56), 410-422 (2011).

97. Hamel JF, Mercier A. Cuvierian tubules in tropical holothurians: Usefulness and efficiency as a defence mechanism. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* **33** (2), 115-139 (2000).
98. DeMoor S, Waite HJ, Jangoux MJ, Flammang PJ. Characterization of the Adhesive from Cuvierian Tubules of the Sea Cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea). *Mar. Biotechnol.* **5** (1), 45-57 (2003).
99. Tatham AS, Shewry PR. Elastomeric proteins: biological roles, structures and mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* **25** (11), 567-571 (2000).
100. Abbott A. Bioadhesives: potential for exploitation. *Sci. Prog.* **74** (1 (293)), 131-146 (1990).
101. Wiegemann M. Adhesion in blue mussels (*Mytilus edulis*) and barnacles (genus *Balanus*): Mechanisms and technical applications. *Aquat. Sci.* **67** (2), 166-176 (2005).
102. Kamino K. Novel barnacle underwater adhesive protein is a charged amino acid-rich protein constituted by a Cys-rich repetitive sequence. *Biochem. J.* **356** (Pt 2), 503-507 (2001).
103. Zhao H, Sun C, Stewart RJ, Waite JH. Cement Proteins of the Tube-building Polychaete *Phragmatopoma californica*. *J. Biol. Chem.* **280** (52), 42938-42944 (2005).
104. Stewart RJ, Weaver JC, Morse DE, Waite JH. The tube cement of *Phragmatopoma californica*: a solid foam. *J. Exp. Biol.* **207** (26), 4727-4734 (2004).
105. Waite JH, Jensen RA, Morse DE. Cement precursor proteins of the reef-building polychaete *Phragmatopoma californica* (Fewkes). *Biochemistry* **31** (25), 5733-5738 (1992).
106. Lee BP, Messersmith PB, Israelachvili JN, Waite JH. Mussel-Inspired Adhesives and Coatings. *Annu. Rev. Mater. Res.* **41** (1), 99-132 (2011).
107. Waite JH. The Formation of Mussel Byssus: Anatomy of a Natural Manufacturing Process. In: *Structure, Cellular Synthesis and Assembly of Biopolymers*. Springer Berlin Heidelberg (1992).
108. Tamarin A, Keller PJ. An ultrastructural study of the byssal thread forming system in *Mytilus*. *J. Ultrastr. Res.* **40** (3), 401-416 (1972).
109. Zuccarello LV. The collagen gland of *Mytilus galloprovincialis*: An ultrastructural and cytochemical study on secretory granules. *J. Ultrastr. Res.* **73** (2), 135-147 (1980).
110. Yu J, Wei W, Danner E, Ashley RK, Israelachvili JN, Waite JH. Mussel protein adhesion depends on interprotein thiol-mediated redox modulation. *Nat. Chem. Biol.* **7** (9), 588-590 (2011).
111. Petrone L, Kumar A, Sutanto CN, *et al.* Mussel adhesion is dictated by time-regulated secretion and molecular conformation of mussel adhesive proteins. *Nat. Commun.* **6** 8737 (2015).
112. Arnold AA, Byette F, Séguin-Heine M-O, *et al.* Solid-State NMR Structure Determination of Whole Anchoring Threads from the Blue Mussel *Mytilus edulis*. *Biomacromolecules* **14** (1), 132-141 (2013).
113. Sagert J, Waite JH. Hyperunstable matrix proteins in the byssus of *Mytilus galloprovincialis*. *J. Exp. Biol.* **212** (14), 2224-2236 (2009).
114. Danner EW, Kan Y, Hammer MU, Israelachvili JN, Waite JH. Adhesion of Mussel Foot Protein Mefp-5 to Mica: An Underwater Superglue. *Biochemistry* **51** (33), 6511-6518 (2012).
115. Waite JH. Adhesion à la Moule. *Integr. Comp. Biol.* **42** (6), 1172-1180 (2002).
116. Yu J, Wei W, Danner E, Israelachvili JN, Waite JH. Effects of Interfacial Redox in Mussel Adhesive Protein Films on Mica. *Adv. Mater.* **23** (20), 2362-2366 (2011).
117. Nicklisch SCT, Spahn JE, Zhou H, Gruian CM, Waite JH. Redox Capacity of an Extracellular Matrix Protein Associated with Adhesion in *Mytilus californianus*. *Biochemistry* **55** (13), 2022-2030 (2016).
118. Vreeland V, Waite JH, Epstein L. Minireview—Polyphenols and Oxidases in Substratum Adhesion by Marine Algae and Mussels. *J. Phycol.* **34** (1), 1-8 (1998).
119. Zhao H, Waite JH. Proteins in Load-Bearing Junctions: The Histidine-Rich Metal-Binding Protein of Mussel Byssus. *Biochemistry* **45** (47), 14223-14231 (2006).
120. Taylor SW, Waite JH, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF. trans-2,3-cis-3,4-Dihydroxyproline, a New Naturally Occurring Amino Acid, Is the Sixth Residue in the Tandemly Repeated Consensus

- Decapeptides of an Adhesive Protein from *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* **116** (23), 10803-10804 (1994).
121. Holten-Andersen N, Zhao H, Waite JH. Stiff Coatings on Compliant Biofibers: The Cuticle of *Mytilus californianus* Byssal Threads. *Biochemistry* **48** (12), 2752-2759 (2009).
  122. Rzepecki LM, Hansen KM, Waite JH. Characterization of a Cystine-Rich Polyphenolic Protein Family from the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. *Biol. Bull.* **183** (1), 123-137 (1992).
  123. Inoue K, Takeuchi Y, Miki D, Odo S. Mussel Adhesive Plaque Protein Gene Is a Novel Member of Epidermal Growth Factor-like Gene Family. *J. Biol. Chem.* **270** (12), 6698-6701 (1995).
  124. Papov VV, Diamond TV, Biemann K, Waite JH. Hydroxyarginine-containing Polyphenolic Proteins in the Adhesive Plaques of the Marine Mussel *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **270** (34), 20183-20192 (1995).
  125. Zhao H, Robertson NB, Jewhurst SA, Waite JH. Probing the Adhesive Footprints of *Mytilus californianus* Byssus. *J. Biol. Chem.* **281** (16), 11090-11096 (2006).
  126. Waite JH, Qin X. Polyphosphoprotein from the Adhesive Pads of *Mytilus edulis*. *Biochemistry* **40** (9), 2887-2893 (2001).
  127. Zhao H, Waite JH. Linking Adhesive and Structural Proteins in the Attachment Plaque of *Mytilus californianus*. *J. Biol. Chem.* **281** (36), 26150-26158 (2006).
  128. Waite JH, Housley TJ, Tanzer ML. Peptide repeats in a mussel glue protein: theme and variations. *Biochemistry* **24** (19), 5010-5014 (1985).
  129. Lin Q, Gourdon D, Sun C, Holten-Andersen N, Anderson TH, Waite JH, Israelachvili JN. Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp-1 and mfp-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (10), 3782-3786 (2007).
  130. Hwang DS, Harrington MJ, Lu Q, Masic A, Zeng H, Waite JH. Mussel foot protein-1 (mcfp-1) interaction with titania surfaces. *J. Mater. Chem.* **22** (31), 15530-15533 (2012).
  131. Lu Q, Hwang DS, Liu Y, Zeng H. Molecular interactions of mussel protective coating protein, mcfp-1, from *Mytilus californianus*. *Biomaterials* **33** (6), 1903-1911 (2012).
  132. Frank BP, Belfort G. Adhesion of *Mytilus edulis* Foot Protein 1 on Silica: Ionic Effects on Biofouling. *Biotechnol. Prog.* **18** (3), 580-586 (2002).
  133. Lu Q, Danner E, Waite JH, Israelachvili JN, Zeng H, Hwang DS. Adhesion of mussel foot proteins to different substrate surfaces. *J. R. Soc. Interface* **10** (79), (2013).
  134. Lee H, Scherer NF, Messersmith PB. Single-molecule mechanics of mussel adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** (35), 12999-13003 (2006).
  135. Mian SA, Gao X, Nagase S, Jang J. Adsorption of catechol on a wet silica surface: density functional theory study. *Theor. Chem. Acc.* **130** (2), 333-339 (2011).
  136. Mian SA, Saha LC, Jang J, Wang L, Gao X, Nagase S. Density Functional Theory Study of Catechol Adhesion on Silica Surfaces. *J. Phys. Chem. C* **114** (48), 20793-20800 (2010).
  137. Crisp DJ, Walker G, Young GA, Yule AB. Adhesion and substrate choice in mussels and barnacles. *J. Colloid. Interface Sci.* **104** (1), 40-50 (1985).
  138. Yu J, Wei W, Menyo MS, Masic A, Waite JH, Israelachvili JN. Adhesion of Mussel Foot Protein-3 to TiO<sub>2</sub> Surfaces: the Effect of pH. *Biomacromolecules* **14** (4), 1072-1077 (2013).
  139. Wei W, Petrone L, Tan Y, Cai H, Israelachvili JN, Miserez A, Waite JH. An Underwater Surface-Drying Peptide Inspired by a Mussel Adhesive Protein. *Adv. Funct. Mater.* **26** (20), 3496-3507 (2016).
  140. Waite JH. Reverse Engineering of Bioadhesion in Marine Mussels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **875** (1), 301-309 (1999).
  141. Baty AM, Leavitt PK, Siedlecki CA, Tyler BJ, Suci PA, Marchant RE, Geesey GG. Adsorption of Adhesive Proteins from the Marine Mussel, *Mytilus edulis*, on Polymer Films in the Hydrated State Using Angle Dependent X-ray Photoelectron Spectroscopy and Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **13** (21), 5702-5710 (1997).

142. Yang J, Cohen Stuart MA, Kamperman M. Jack of all trades: versatile catechol crosslinking mechanisms. *Chem. Soc. Rev.* **43** (24), 8271-8298 (2014).
143. Burzio LA, Waite JH. Cross-Linking in Adhesive Quinoproteins: Studies with Model Decapeptides. *Biochemistry* **39** (36), 11147-11153 (2000).
144. Haemers S, Koper GJM, Frens G. Effect of Oxidation Rate on Cross-Linking of Mussel Adhesive Proteins. *Biomacromolecules* **4** (3), 632-640 (2003).
145. McDowell LM, Burzio LA, Waite JH, Schaefer J. Rotational Echo Double Resonance Detection of Cross-links Formed in Mussel Byssus under High-Flow Stress. *J. Biol. Chem.* **274** (29), 20293-20295 (1999).
146. Liu B, Burdine L, Kodadek T. Chemistry of Periodate-Mediated Cross-Linking of 3,4-Dihydroxyphenylalanine-Containing Molecules to Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **128** (47), 15228-15235 (2006).
147. Kato T, Ito S, Fujita K. Tyrosinase-catalyzed binding of 3,4-dihydroxyphenylalanine with proteins through the sulfhydryl group. *Biochim. Biophys. Acta* **881** (3), 415-421 (1986).
148. Sternson AW, McCreery R, Feinberg B, Adams RN. Electrochemical studies of adrenergic neurotransmitters and related compounds. *J. Electroanal. Chem. Interf. Electrochem.* **46** (2), 313-321 (1973).
149. Tse DCS, McCreery RL, Adams RN. Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *J. Med. Chem.* **19** (1), 37-40 (1976).
150. Zhao H, Waite JH. Coating Proteins: Structure and Cross-Linking in fp-1 from the Green Shell Mussel *Perna canaliculus*. *Biochemistry* **44** (48), 15915-15923 (2005).
151. Holten-Andersen N, Mates TE, Toprak MS, Stucky GD, Zok FW, Waite JH. Metals and the Integrity of a Biological Coating: The Cuticle of Mussel Byssus. *Langmuir* **25** (6), 3323-3326 (2008).
152. Harrington MJ, Masic A, Holten-Andersen N, Waite JH, Fratzl P. Iron-Clad Fibers: A Metal-Based Biological Strategy for Hard Flexible Coatings. *Science* **328** (5975), 216-220 (2010).
153. Zeng H, Hwang DS, Israelachvili JN, Waite JH. Strong reversible Fe<sup>3+</sup>-mediated bridging between dopa-containing protein films in water. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107** (29), 12850-12853 (2010).
154. Taylor SW, Luther GW, Waite JH. Polarographic and Spectrophotometric Investigation of Iron(III) Complexation to 3,4-Dihydroxyphenylalanine-Containing Peptides and Proteins from *Mytilus edulis*. *Inorg. Chem.* **33** (25), 5819-5824 (1994).
155. Holten-Andersen N, Harrington MJ, Birkedal H, Lee BP, Messersmith PB, Lee KYC, Waite JH. pH-induced metal-ligand cross-links inspired by mussel yield self-healing polymer networks with near-covalent elastic moduli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108** (7), 2651-2655 (2011).
156. Taylor SW, Chase DB, Emptage MH, Nelson MJ, Waite JH. Ferric Ion Complexes of a DOPA-Containing Adhesive Protein from *Mytilus edulis*. *Inorg. Chem.* **35** (26), 7572-7577 (1996).
157. Martinez Rodriguez NR, Das S, Kaufman Y, Israelachvili JN, Waite JH. Interfacial pH during mussel adhesive plaque formation. *Biofouling* **31** (2), 221-227 (2015).
158. Herlinger E, Jameson RF, Linert W. Spontaneous autoxidation of dopamine. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (2), 259-263 (1995).
159. Powell H, Taylor M. Interactions of iron(II) and iron(III) with gallic acid and its homologues: a potentiometric and spectrophotometric study. *Aust. J. Chem.* **35** (4), 739-756 (1982).
160. Wilker JJ. Marine bioinorganic materials: mussels pumping iron. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14** (2), 276-283 (2010).
161. Waite JH. The phylogeny and chemical diversity of quinone-tanned glues and varnishes. *Comp. Biochem. Phys. B.* **97** (1), 19-29 (1990).
162. Smyth JD. A technique for the histochemical demonstration of polyphenoloxidase and its application to egg shell formation in helminths and byssal formation in *Mytilus*. *Q. J. Microsc. Sci.* **95** 139-152 (1954).

163. Gerzeli G. Ricerche istomorfologiche e istochimiche sulla formazione del bisso in *Mytilus galloprovincialis*. *Pubbl. Staz. zool. Napoli* **32** 88-103 (1961).
164. Pujol J-P. Le complexe byssogene de mollusques bivalves. Histochimie comparée des secretations chez *Mytilus edulis* L. et *Pinna nobilis* L. *Bull. Soc. Linn. Normandie* **10** 308–332 (1967).
165. Zuccarello LV. Ultrastructural and cytochemical study on the enzyme gland of the foot of a mollusc. *Tissue Cell* **13** (4), 701-713 (1981).
166. Waite JH. Catechol Oxidase in the Byssus of the Common Mussel, *Mytilus Edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **65** (2), 359-371 (1985).
167. Hellio C, Bourgougnon N, Gal YL. Phenoloxidase (E.C. 1.14.18.1) from the byssus gland of *Mytilus edulis*: Purification, partial characterization and application for screening products with potential antifouling activities. *Biofouling* **16** (2-4), 235-244 (2000).
168. Bharathi N, Ramalingam K. Electrophoretic study of the enzyme phenoloxidase from the enzyme gland in the foot of *Perna viridis* Linnaeus. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **70** (2), 123-128 (1983).
169. Burzio LA. Catechol oxidases associated with byssus formation in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Masterarbeit, University of Delaware* (1996).
170. Guerette PA, Hoon S, Seow Y, *et al.* Accelerating the design of biomimetic materials by integrating RNA-seq with proteomics and materials science. *Nat. Biotech.* **31** 908 (2013).
171. Mayer AM. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* **67** (21), 2318-2331 (2006).
172. Mason HS, Fowlks WL, Peterson E. Oxygen Transfer and Electron Transport by the Phenolase Complex1. *J. Am. Chem. Soc.* **77** (10), 2914-2915 (1955).
173. Baldwin MJ, Root DE, Pate JE, Fujisawa K, Kitajima N, Solomon EI. Spectroscopic studies of side-on peroxide-bridged binuclear copper(II) model complexes of relevance to oxyhemocyanin and oxytyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* **114** (26), 10421-10431 (1992).
174. Olivares C, Solano F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigm. Cell Melanoma R.* **22** (6), 750-760 (2009).
175. Ros JR, Rodríguez-López JN, García-Cánovas F. Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.* **295** (1), 309-312 (1993).
176. Chandrasekaran N, Dimartino S, Janmale T, Gieseg SP, Fee CJ. Adsorption of chemically synthesized mussel adhesive peptide sequences containing DOPA on stainless steel. *J. Pept. Sci.* **21** (8), 630-635 (2015).
177. Hwang DS, Yoo HJ, Jun JH, Moon WK, Cha HJ. Expression of Functional Recombinant Mussel Adhesive Protein Mgf-5 in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (6), 3352-3359 (2004).
178. Salerno AJ, Goldberg I. Cloning, Expression, and Characterization of a Synthetic Analog to the Bioadhesive Precursor Protein of the Sea Mussel *Mytilus-Edulis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39** (2), 221-226 (1993).
179. Kim BJ, Oh DX, Kim S, *et al.* Mussel-Mimetic Protein-Based Adhesive Hydrogel. *Biomacromolecules* **15** (5), 1579-1585 (2014).
180. Hwang DS, Gim Y, Yoo HJ, Cha HJ. Practical recombinant hybrid mussel bioadhesive fp-151. *Biomaterials* **28** (24), 3560-3568 (2007).
181. Lim S, Choi YS, Kang DG, Song YH, Cha HJ. The adhesive properties of coacervated recombinant hybrid mussel adhesive proteins. *Biomaterials* **31** (13), 3715-3722 (2010).
182. Filpula DR, Lee S-M, Link RP, Strausberg SL, Strausberg RL. Structural and Functional Repetition in a Marine Mussel Adhesive Protein. *Biotechnol. Prog.* **6** (3), 171-177 (1990).
183. Gim Y, Hwang DS, Lim S, Song YH, Cha HJ. Production of fusion mussel adhesive fp-353 in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **24** (6), 1272-1277 (2008).
184. Hwang DS, Gim Y, Cha HJ. Expression of Functional Recombinant Mussel Adhesive Protein Type 3A in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **21** (3), 965-970 (2005).

185. Hwang DS, Gim Y, Kang DG, Kim YK, Cha HJ. Recombinant mussel adhesive protein Mgf<sub>p</sub>-5 as cell adhesion biomaterial. *J. Biotechnol.* **127** (4), 727-735 (2007).
186. Kitamura M, Kawakami K, Nakamura N, *et al.* Expression of a model peptide of a marine mussel adhesive protein in *Escherichia coli* and characterization of its structural and functional properties. *J. Polym. Sci. A1* **37** (6), 729-736 (1999).
187. Lee SJ, Han YH, Nam BH, Kim YO, Reeves PR. A novel expression system for recombinant marine mussel adhesive protein Mefp1 using a truncated OmpA signal peptide. *Mol. Cells* **26** (1), 34-40 (2008).
188. Zhong C, Gurry T, Cheng AA, Downey J, Deng Z, Stultz CM, Lu TK. Strong underwater adhesives made by self-assembling multi-protein nanofibres. *Nat. Nano* **9** (10), 858-866 (2014).
189. Yamamoto H, Hayakawa T. Synthesis of sequential polypeptides containing L-β-3,4-dihydroxyphenyl-α-alanine (DOPA) and L-lysine. *Biopolymers* **21** (6), 1137-1151 (1982).
190. Yamamoto H. Adhesive studies of synthetic polypeptides: A model for marine adhesive proteins. *J. Adhes. Sci. Technol.* **1** (1), 177-183 (1987).
191. Tatehata H, Mochizuki A, Kawashima T, Yamashita S, Yamamoto H. Model polypeptide of mussel adhesive protein. I. Synthesis and adhesive studies of sequential polypeptides (X-Tyr-Lys)<sub>n</sub> and (Y-Lys)<sub>n</sub>. *J. Appl. Polym. Sci.* **76** (6), 929-937 (2000).
192. Yamamoto H, Tanisho H, Ohara S-i, Nishida A. Cross-linking and gel formation of water-soluble lysine polypeptides. An insolubilization model reaction for adhesive proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **14** (2), 66-72 (1992).
193. Yamamoto H, Kuno S, Nagai A, Nishida A, Yamauchi S, Ikeda K. Insolubilizing and adhesive studies of water-soluble synthetic model proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **12** (5), 305-310 (1990).
194. Yu M, Deming TJ. Synthetic Polypeptide Mimics of Marine Adhesives. *Macromolecules* **31** (15), 4739-4745 (1998).
195. Yu M, Hwang J, Deming TJ. Role of 1-3,4-Dihydroxyphenylalanine in Mussel Adhesive Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **121** (24), 5825-5826 (1999).
196. Lee BP, Chao C-Y, Nunalee FN, Motan E, Shull KR, Messersmith PB. Rapid Gel Formation and Adhesion in Photocurable and Biodegradable Block Copolymers with High DOPA Content. *Macromolecules* **39** (5), 1740-1748 (2006).
197. Messersmith PB, Lee BP, Dalsin JL, Burke SA. *U.S. Patent No. 20,080,247,984* (2008).
198. Dalsin JL, Lee BP, Vollenweider L, *et al.* *U.S. Patent No. 20,100,113,828* (2010).
199. Yin M, Yuan Y, Liu C, Wang J. Development of mussel adhesive polypeptide mimics coating for in-situ inducing re-endothelialization of intravascular stent devices. *Biomaterials* **30** (14), 2764-2773 (2009).
200. Wilke P, Börner HG. Mussel-Glue Derived Peptide-Polymer Conjugates to Realize Enzyme-Activated Antifouling Coatings. *ACS Macro Letters* **1** (7), 871-875 (2012).
201. Wilke P, Helfricht N, Mark A, Papastavrou G, Faivre D, Börner HG. A Direct Biocombinatorial Strategy toward Next Generation, Mussel-Glue Inspired Saltwater Adhesives. *J. Am. Chem. Soc.* **136** (36), 12667-12674 (2014).
202. Murphy JL, Vollenweider L, Xu F, Lee BP. Adhesive Performance of Biomimetic Adhesive-Coated Biologic Scaffolds. *Biomacromolecules* **11** (11), 2976-2984 (2010).
203. Brodie M, Vollenweider L, Murphy JL, Xu F, Lyman A, Lew WD, Lee BP. Biomechanical properties of Achilles tendon repair augmented with a bioadhesive-coated scaffold. *Biomed. Mater.* **6** (1), 015014 (2011).
204. Guvendiren M, Brass DA, Messersmith PB, Shull KR. Adhesion of DOPA-Functionalized Model Membranes to Hard and Soft Surfaces. *J. Adhes.* **85** (9), 631-645 (2009).
205. Guvendiren M, Messersmith PB, Shull KR. Self-Assembly and Adhesion of DOPA-Modified Methacrylic Triblock Hydrogels. *Biomacromolecules* **9** (1), 122-128 (2008).

206. Zobrist C, Sobocinski J, Lyskawa J, *et al.* Functionalization of Titanium Surfaces with Polymer Brushes Prepared from a Biomimetic RAFT Agent. *Macromolecules* **44** (15), 5883-5892 (2011).
207. Liu J, Yang W, Zareie HM, Gooding JJ, Davis TP. pH-Detachable Polymer Brushes Formed Using Titanium-Diol Coordination Chemistry and Living Radical Polymerization (RAFT). *Macromolecules* **42** (8), 2931-2939 (2009).
208. Fan X, Lin L, Dalsin JL, Messersmith PB. Biomimetic Anchor for Surface-Initiated Polymerization from Metal Substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **127** (45), 15843-15847 (2005).
209. Fan X, Lin L, Messersmith PB. Cell Fouling Resistance of Polymer Brushes Grafted from Ti Substrates by Surface-Initiated Polymerization: Effect of Ethylene Glycol Side Chain Length. *Biomacromolecules* **7** (8), 2443-2448 (2006).
210. Gao C, Li G, Xue H, Yang W, Zhang F, Jiang S. Functionalizable and ultra-low fouling zwitterionic surfaces via adhesive mussel mimetic linkages. *Biomaterials* **31** (7), 1486-1492 (2010).
211. Li G, Cheng G, Xue H, Chen S, Zhang F, Jiang S. Ultra low fouling zwitterionic polymers with a biomimetic adhesive group. *Biomaterials* **29** (35), 4592-4597 (2008).
212. Kuang J, Messersmith PB. Universal Surface-Initiated Polymerization of Antifouling Zwitterionic Brushes Using a Mussel-Mimetic Peptide Initiator. *Langmuir* **28** (18), 7258-7266 (2012).
213. Ye Q, Wang X, Li S, Zhou F. Surface-Initiated Ring-Opening Metathesis Polymerization of Pentadecafluorooctyl-5-norbornene-2-carboxylate from Variable Substrates Modified with Sticky Biomimic Initiator. *Macromolecules* **43** (13), 5554-5560 (2010).
214. Lee BP, Huang K, Nunalee FN, Shull KR, Messersmith PB. Synthesis of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) containing monomers and their co-polymerization with PEG-diacrylate to form hydrogels. *J. Biomat. Sci. Polym. E.* **15** (4), 449-464 (2004).
215. Charlot A, Sciannamea V, Lenoir S, *et al.* All-in-one strategy for the fabrication of antimicrobial biomimetic films on stainless steel. *J. Mater. Chem.* **19** (24), 4117-4125 (2009).
216. Xue X, Pasparakis G, Halliday N, *et al.* Synthetic Polymers for Simultaneous Bacterial Sequestration and Quorum Sense Interference. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50** (42), 9852-9856 (2011).
217. Faure E, Lecomte P, Lenoir S, *et al.* Sustainable and bio-inspired chemistry for robust antibacterial activity of stainless steel. *J. Mater. Chem.* **21** (22), 7901-7904 (2011).
218. Shao H, Bachus KN, Stewart RJ. A Water-Borne Adhesive Modeled after the Sandcastle Glue of *P. californica*. *Macromol. Biosci.* **9** (5), 464-471 (2009).
219. Niederer K, Schüll C, Leibig D, Johann T, Frey H. Catechol Acetonide Glycidyl Ether (CAGE): A Functional Epoxide Monomer for Linear and Hyperbranched Multi-Catechol Functional Polyether Architectures. *Macromolecules* **49** (5), 1655-1665 (2016).
220. Jenkins CL, Meredith HJ, Wilker JJ. Molecular Weight Effects upon the Adhesive Bonding of a Mussel Mimetic Polymer. *ACS Appl. Mater. Inter.* **5** (11), 5091-5096 (2013).
221. Meredith HJ, Jenkins CL, Wilker JJ. Enhancing the Adhesion of a Biomimetic Polymer Yields Performance Rivaling Commercial Glues. *Adv. Funct. Mater.* **24** (21), 3259-3267 (2014).
222. Matos-Pérez CR, White JD, Wilker JJ. Polymer Composition and Substrate Influences on the Adhesive Bonding of a Biomimetic, Cross-Linking Polymer. *J. Am. Chem. Soc.* **134** (22), 9498-9505 (2012).
223. Westwood G, Horton TN, Wilker JJ. Simplified Polymer Mimics of Cross-Linking Adhesive Proteins. *Macromolecules* **40** (11), 3960-3964 (2007).
224. Matos-Pérez CR, Wilker JJ. Ambivalent Adhesives: Combining Biomimetic Cross-Linking with Antiadhesive Oligo(ethylene glycol). *Macromolecules* **45** (16), 6634-6639 (2012).
225. Yang Z, Pelton R. The synthesis of poly(3,4-dihydroxystyrene) and poly[(sodium 4-styrenesulfonate)-co-(3,4-dihydroxystyrene)]. *Macromol. Rapid Commun.* **19** (5), 241-246 (1998).
226. White JD, Wilker JJ. Underwater Bonding with Charged Polymer Mimics of Marine Mussel Adhesive Proteins. *Macromolecules* **44** (13), 5085-5088 (2011).

227. Leibig D, Müller AHE, Frey H. Anionic Polymerization of Vinylcatechol Derivatives: Reversal of the Monomer Gradient Directed by the Position of the Catechol Moiety in the Copolymerization with Styrene. *Macromolecules* **49** (13), 4792-4801 (2016).
228. Marumo K, Waite JH. Optimization of hydroxylation of tyrosine and tyrosine-containing peptides by mushroom tyrosinase. *B.B.A. - Protein Struct. M.* **872** (1-2), 98-103 (1986).
229. Williams T, Marumo K, Waite JH, Henkens RW. Mussel glue protein has an open conformation. *Arch. Biochem. Biophys.* **269** (2), 415-422 (1989).
230. Prota G, Petrillo O, Santacrose C, Sica D. 2H-1,4-benzothiazines from the reaction of 2-aminoethanethiol with nascent 4-methyl-o-benzoquinone. *J. Heterocyclic Chem.* **7** (3), 555-561 (1970).
231. Waite JH. Determination of (catecholato)borate complexes using difference spectrophotometry. *Anal. Chem.* **56** (11), 1935-1939 (1984).
232. Rogers ME, Long TE. *Synthetic Methods in Step - Growth Polymers*. John Wiley & Sons, Inc. (2003).
233. Rescigno A, Zucca P, Flurkey A, Inlow J, Flurkey WH. Identification and discrimination between some contaminant enzyme activities in commercial preparations of mushroom tyrosinase. *Enzyme Microb. Tech.* **41** (5), 620-627 (2007).
234. Flurkey A, Cooksey J, Reddy A, Spoonmore K, Rescigno A, Inlow J, Flurkey WH. Enzyme, Protein, Carbohydrate, and Phenolic Contaminants in Commercial Tyrosinase Preparations: Potential Problems Affecting Tyrosinase Activity and Inhibition Studies. *J. Agr. Food Chem.* **56** (12), 4760-4768 (2008).
235. Kumar M, Flurkey WH. Activity, isoenzymes and purity of mushroom tyrosinase in commercial preparations. *Phytochemistry* **30** (12), 3899-3902 (1991).
236. Mauracher SG, Molitor C, Al-Oweini R, Kortz U, Rompel A. Latent and active abPPO4 mushroom tyrosinase cocrystallized with hexatungstotellurate(VI) in a single crystal. *Acta Crystallographica Section D* **70** (9), 2301-2315 (2014).
237. Pretzler M, Bijelic A, Rompel A. Heterologous expression and characterization of functional mushroom tyrosinase (AbPPO4). *Sci. Rep.* **7** (1), 1810 (2017).
238. Mirshafian R, Wei W, Israelachvili JN, Waite JH.  $\alpha, \beta$ -Dehydro-Dopa: A Hidden Participant in Mussel Adhesion. *Biochemistry* **55** (5), 743-750 (2016).
239. Rzepecki LM, Waite JH.  $\alpha, \beta$ -Dehydro-3,4-dihydroxyphenylalanine derivatives: Rate and mechanism of formation. *Arch. Biochem. Biophys.* **285** (1), 27-36 (1991).
240. Ito S, Prota G. A facile one-step synthesis of cysteinyl dopas using mushroom tyrosinase. *Experientia* **33** (8), 1118-1119 (1977).
241. Qi Y, Volmer DA. Electron-based fragmentation methods in mass spectrometry: An overview. *Mass Spectrom. Rev.* **36** (1), 4-15 (2017).
242. Ito S, Inoue S, Yamamoto Y, Fujita K. Synthesis and antitumor activity of cysteinyl-3,4-dihydroxyphenylalones and related compounds. *J. Med. Chem.* **24** (6), 673-677 (1981).
243. Riener C, Kada G, Gruber H. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem* **373** (4-5), 266-276 (2002).
244. Purich DL. *Enzyme Kinetics : Catalysis and Control - A Reference of Theory and Best-Practice Methods*. Elsevier (2010).
245. Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science* **318** (5849), 426-430 (2007).
246. Holmberg M, Hou X. Competitive Protein Adsorption—Multilayer Adsorption and Surface Induced Protein Aggregation. *Langmuir* **25** (4), 2081-2089 (2009).
247. Zhou C, Friedt J-M, Angelova A, *et al.* Human Immunoglobulin Adsorption Investigated by Means of Quartz Crystal Microbalance Dissipation, Atomic Force Microscopy, Surface Acoustic Wave, and Surface Plasmon Resonance Techniques. *Langmuir* **20** (14), 5870-5878 (2004).

248. Lee SH, Ruckenstein E. Adsorption of proteins onto polymeric surfaces of different hydrophilicities—a case study with bovine serum albumin. *J. Colloid Interf. Sci.* **125** (2), 365-379 (1988).
249. Höök F, Kasemo B, Nylander T, Fant C, Sott K, Elwing H. Variations in Coupled Water, Viscoelastic Properties, and Film Thickness of a Mefp-1 Protein Film during Adsorption and Cross-Linking: A Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, Ellipsometry, and Surface Plasmon Resonance Study. *Anal. Chem.* **73** (24), 5796-5804 (2001).
250. Sauerbrey G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z. Phys.* **155** (2), 206-222 (1959).
251. Voinova MV, Rodahl M, Jonson M, Kasemo B. Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach. *Phys. Scr.* **59** (5), 391 (1999).
252. Yan M, Liu C, Wang D, Ni J, Cheng J. Characterization of Adsorption of Humic Acid onto Alumina using Quartz Crystal Microbalance with Dissipation. *Langmuir* **27** (16), 9860-9865 (2011).
253. Reviakine I, Johannsmann D, Richter RP. Hearing What You Cannot See and Visualizing What You Hear: Interpreting Quartz Crystal Microbalance Data from Solvated Interfaces. *Anal. Chem.* **83** (23), 8838-8848 (2011).
254. Li L, Zeng H. Marine mussel adhesion and bio-inspired wet adhesives. *Biotribology* **5** 44-51 (2016).
255. STEINHORN I, ASSAF G, GAT JR, *et al.* The Dead Sea: Deepening of the Mixolimnion Signifies the Overture to Overtake of the Water Column. *Science* **206** (4414), 55-57 (1979).
256. Kosmulski M. Compilation of PZC and IEP of sparingly soluble metal oxides and hydroxides from literature. *Adv. Colloid Interfac.* **152** (1), 14-25 (2009).
257. Kosmulski M. *Chemical Properties of Material Surfaces*, 1st edn. CRC Press (2001).
258. Franks GV. Zeta potentials and yield stresses of silica suspensions in concentrated monovalent electrolytes: isoelectric point shift and additional attraction. *J. Colloid. Interface Sci.* **249** (1), 44-51 (2002).
259. Krivosheeva O, Dedinaite A, Claesson PM. Adsorption of Mefp-1: influence of pH on adsorption kinetics and adsorbed amount. *J. Colloid. Interface. Sci.* **379** (1), 107-113 (2012).
260. Maugis D. Adhesion of spheres: The JKR-DMT transition using a dugdale model. *J. Colloid Interf. Sci.* **150** (1), 243-269 (1992).
261. Carpick RW, Ogletree DF, Salmeron M. A General Equation for Fitting Contact Area and Friction vs Load Measurements. *J. Colloid Interf. Sci.* **211** (2), 395-400 (1999).
262. Israelachvili J, Min Y, Akbulut M, *et al.* Recent advances in the surface forces apparatus (SFA) technique. *Rep. Prog. Phys.* **73** (3), 036601 (2010).
263. Israelachvili JN, Adams GE. Direct measurement of long range forces between two mica surfaces in aqueous KNO<sub>3</sub> solutions. *Nature* **262** (5571), 774-776 (1976).
264. Lu Q, Wang J, Faghiehnejad A, Zeng H, Liu Y. Understanding the molecular interactions of lipopolysaccharides during E. coli initial adhesion with a surface forces apparatus. *Soft Matter* **7** (19), 9366-9379 (2011).
265. Helm CA, Knoll W, Israelachvili JN. Measurement of ligand-receptor interactions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88** (18), 8169-8173 (1991).
266. Levine ZA, Rapp MV, Wei W, *et al.* Surface force measurements and simulations of mussel-derived peptide adhesives on wet organic surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113** (16), 4332-4337 (2016).
267. Brubaker CE, Messersmith PB. The Present and Future of Biologically Inspired Adhesive Interfaces and Materials. *Langmuir* **28** (4), 2200-2205 (2012).
268. Hansen DC, Corcoran SG, Waite JH. Enzymatic tempering of a mussel adhesive protein film. *Langmuir* **14** (5), 1139-1147 (1998).
269. Ogura K, Tsuchihashi G-i. A versatile reagent for aldehyde synthesis. Methyl methylthiomethyl sulfoxide. *Tetrahedron Lett.* **12** (34), 3151-3154 (1971).

270. Soloshonok VA, Ueki H. Efficient and Practical Protection of the Catechol Residue of 3,4-Dihydroxyphenylalanine (DOPA) Derivative as Acetonide. *Synthesis* **2008** (05), 693-695 (2008).
271. Liu Z, Hu B-H, Messersmith PB. Convenient synthesis of acetonide-protected 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) for Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **49** (38), 5519-5521 (2008).
272. Monahan J, Wilker JJ. Cross-Linking the Protein Precursor of Marine Mussel Adhesives: Bulk Measurements and Reagents for Curing. *Langmuir* **20** (9), 3724-3729 (2004).
273. Şimşek Ş, Yemenicioğlu A. Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochem.* **42** (6), 943-950 (2007).
274. Ikehata K, Nicell JA. Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technol.* **74** (3), 191-199 (2000).
275. Weidman SW, Kaiser ET. The Mechanism of the Periodate Oxidation of Aromatic Systems. III. A Kinetic Study of the Periodate Oxidation of Catechol. *J. Am. Chem. Soc.* **88** (24), 5820-5827 (1966).
276. Liu X, Zhang Z, Cheng G, Dong S. Spectroelectrochemical and Voltammetric Studies of L-DOPA. *Electroanalysis* **15** (2), 103-107 (2003).
277. Miller DR, Spahn JE, Waite JH. The staying power of adhesion-associated antioxidant activity in *Mytilus californianus*. *J. R. Soc. Interface* **12** (111), (2015).
278. Hoyle CE, Bowman CN. Thiol-En-Klickchemie. *Angew. Chem.* **122** (9), 1584-1617 (2010).
279. Espeel P, Celasun S, Omurtag PS, Martens S, Du Prez FE. Responsive Thiolactone-Derived N-Substituted Poly(Urethane-Amide)s. *Macromol. Rapid Comm.* **38** (7), 1600783 (2017).
280. Martens S, Van den Begin J, Madder A, Du Prez FE, Espeel P. Automated Synthesis of Monodisperse Oligomers, Featuring Sequence Control and Tailored Functionalization. *J. Am. Chem. Soc.* **138** (43), 14182-14185 (2016).
281. Celasun S, Du Prez FE, Börner HG. PEGylated Precision Segments Based on Sequence-Defined Thiolactone Oligomers. *Macromol. Rapid Comm.* **38** (24), 1700688 (2017).
282. von Helden G, Wyttenbach T, Bowers MT. Conformation of Macromolecules in the Gas Phase: Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Methods in Ion Chromatography. *Science* **267** (5203), 1483-1485 (1995).
283. Grandjean J, Laszlo P, Offermann W, Rinaldi PL. Sodium(1+) complexes with acyclic polyethers. Stabilities, enthalpies, and entropies of reaction in acetonitrile and pyridine. A sodium-23 NMR study. *J. Am. Chem. Soc.* **103** (6), 1380-1383 (1981).
284. Sawaki Y, Foote CS. Mechanism of carbon-carbon cleavage of cyclic 1,2-diketones with alkaline hydrogen peroxide. The acyclic mechanism and its application to the basic autoxidation of pyrogallol. *J. Am. Chem. Soc.* **105** (15), 5035-5040 (1983).
285. Witham AA, Beach DG, Gabryelski W, Manderville RA. Hydroxyl Radical-Induced Oxidation of a Phenolic C-Linked 2'-Deoxyguanosine Adduct Yields a Reactive Catechol. *Chem. Res. Toxicol.* **25** (2), 315-325 (2012).
286. Um I-H, Lee S-E, Kwon H-J. Effect of Amine Nature on Reaction Mechanism: Aminolyses of O-4-Nitrophenyl Thionobenzoate with Primary and Secondary Amines. *J. Org. Chem.* **67** (25), 8999-9005 (2002).
287. Isidro-Llobet A, Álvarez M, Albericio F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **109** (6), 2455-2504 (2009).
288. Kamber B. Cystinpeptid aus (S-Acetamidomethyl-cystein)-peptiden durch Oxydation mit Jod: Die synthese von cyclo-L-cystin. *Helv. Chim. Acta* **54** (3), 927-930 (1971).
289. Veber D, Milkowski J, Varga S, Denkewalter R, Hirschmann R. Acetamidomethyl. A Novel Thiol Protecting Group for Cysteine. *J. Am. Chem. Soc.* **94** (15), 5456-5461 (1972).

290. Veber DF, Milkowski JD, Denkwalter RG, Hirschmann R. The synthesis of peptides in aqueous medium, IV. A novel protecting group for cysteine. *Tetrahedron Lett.* **9** (26), 3057-3058 (1968).
291. Royo M, Alsina J, Giralt E, Slomczynska U, Albericio F. S-Phenylacetamidomethyl (Phacm): an orthogonal cysteine protecting group for Boc and Fmoc solid-phase peptide synthesis strategies. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (9), 1095-1102 (1995).
292. Weber U, Hartter P. S-Alkylmercapto-Gruppen zum Schutz der SH-Funktion des Cysteins, I. Synthese und Stabilität einiger S-(Alkylmercapto)cysteine. *H.-S. Z. Physiol. Chem.* **351** (2), 1384 (1970).
293. Bland L, Ramage R. *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis and Combinatorial Libraries: Peptides, Proteins and Nucleic Acids-Small Molecule Organic Chemistry Diversity Collected Papers, International Symposium, 6th*. Epton, R., Ed.; Mayflower Scientific Ltd.: Kingswinford, U.K. (2001).
294. Karas JA, Scanlon DB, Forbes BE, *et al.* 2-Nitroveratryl as a Photocleavable Thiol-Protecting Group for Directed Disulfide Bond Formation in the Chemical Synthesis of Insulin. *Chem. Eur. J.* **20** (31), 9549-9552 (2014).
295. Kotzur N, Briand B, Beyermann M, Hagen V. Wavelength-Selective Photoactivatable Protecting Groups for Thiols. *J. Am. Chem. Soc.* **131** (46), 16927-16931 (2009).
296. Hammond JBW, Nichols R. Carbohydrate Metabolism in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing.: Changes in Soluble Carbohydrates during Growth of Mycelium and Sporophore. *J. Gen. Microbiol.* **93** (2), 309-320 (1976).
297. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Express. Purif.* **41** (1), 207-234 (2005).
298. French CS, Milner HW. [9] Disintegration of bacteria and small particles by high-pressure extrusion. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press (1955).
299. Duckworth HW, Coleman JE. Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **245** 1613-1625 (1970).
300. Hutter JL, Bechhoefer J. Calibration of atomic - force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.* **64** (7), 1868-1873 (1993).
301. Butt H-J, Cappella B, Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf. Sci. Rep.* **59** (1-6), 1-152 (2005).
302. Seuss M, Fery A. MaxSeuss/AFM-Force-Curve-Analyzer-IgorPro: AFM Force Curve Analyzer for IgorPRO (2018). doi:10.5281/zenodo.1208549.
303. Johnson KL, Kendall K, Roberts AD. Surface Energy and the Contact of Elastic Solids. *P. Roy. Soc. A.-Math. Phys.* **324** (1558), 301-313 (1971).
304. Derjaguin BV, Muller VM, Toporov YP. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *J. Colloid Interf. Sci.* **53** (2), 314-326 (1975).
305. Nomenclature and Symbolism For Amino Acids and Peptides. *pac* **56** (5), 595 (1984).

## Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Betreuer Prof. Dr. Hans G. Börner für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, das Anvertrauen eines spannenden interdisziplinären Forschungsthemas und die fachliche sowie finanzielle Unterstützung. Für die zahlreichen Kontakt- und Kooperationsvermittlungen, die zu meinen Ergebnissen beigetragen haben, bin ich ebenso dankbar. Auch für den Ansporn und die Ermöglichung meine Forschungsergebnisse auf internationalen Konferenzen zu präsentieren, möchte ich mich bedanken. Nicht zu vergessen sind die Gruppenfahrten nach Rostock und Posen und die Weihnachtsessen, die eine angenehme Flucht aus dem Arbeitsalltag waren.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Dorothea Fiedler und Prof. Dr. Andreas Fery für die Begutachtung dieser Arbeit danken.

Bei Dario Remmler und Philipp Roesch möchte ich mich für die Hilfe bei der Korrektur bedanken.

Meinen Kooperationspartnern danke ich für den vielen Fleiß und die gute Zusammenarbeit, ohne die große Teile meiner Arbeit nicht möglich gewesen wären. Besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Annette Rompel, die es ermöglicht hat eine Tyrosinase zu verwenden, die reproduzierbare, hervorragende Aktivierungen liefern konnte und Matthias Pretzler, der viel Zeit in die Synthese und Aufreinigung des Enzyms gesteckt hat (auch wenn uns die Deutsche Post manchmal einen Strich durch die Rechnung gemacht hat). Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Andreas Fery, Maximilian Seuss und Inga Melnyk für die produktive Zusammenarbeit in Bezug auf Adhäsionsmessungen und die Gastfreundschaft bei den Besuchen in Dresden danken. Dr. Eberhard Krause, Heike Stephanowitz und Dr. Michael Schümann danke ich für die Unterstützung bei den massenspektrometrischen Fragmentierungsexperimenten und Fragestellungen.

An dieser Stelle möchte ich auch Marlies Gräwert und Dario Remmler für die Hilfe bei GPC- und MALDI-Messungen danken. Bei Dr. Steffen Weidner bedanke ich mich für die Möglichkeit das MALDI-Gerät an der BAM zu nutzen. Ich danke auch Anna Pohl aus der Arbeitsgruppe von Dr. Damien Faivre am MPI Golm, dass mir das 4-Kanal-System der QCM-D Anlage zur Verfügung gestellt wurde. Meinem damaligen Forschungspraktikanten Stefan Peplau und der studentischen Hilfskraft Tim Kröber danke ich für die engagierte Dopa-Synthese und Sensu Celasun für die Synthese des Thiolactons.

Natürlich bedanke ich mich auch bei meinen Kollegen im gesamten Arbeitskreis Börner für das gute Arbeitsklima, den hilfreichen Austausch und die schöne Zeit. Besonders möchte ich mich bei Patrick Wilke bedanken, der mich in die Welt der Tyrosinase eingeführt hat und der für Problemstellungen immer ein offenes Ohr und hilfreiche Ratschläge hatte. Außerdem danke ich meinen weiteren Laborkollegen Sandra Arias López, Steffi Große, Felix Hanßke, Sebastian Wiczorek, Eva Maron, Carmen Juds und Felix Gandor für die zumeist gute Stimmung im Labor. Auch bei Emmanuelle Schué, Sensu Celasun, Sandra Arias López, Eva Maron und Narendra Venkatarreddy als harten Mensa-Kern der Gruppe möchte ich dafür bedanken, dass sie mir das oft mittelmäßige aber günstige Mensaessen erträglich gemacht haben.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern für die jahrelange bedingungslose Unterstützung, die mir das Studium und diese Arbeit ermöglicht hat, und meiner Freundin Fenja für ihre Geduld und ihr Verständnis bezüglich der langandauernden Fertigstellung und der emotionalen Begleitung durch die Höhen und Tiefe der letzten Jahre.

## Publikationsliste

### Fachartikel

1. J. Horsch, P. Wilke, H. Stephanowitz, E. Krause, H. G. Börner, Fish and Clips: A Convenient Strategy to Identify Tyrosinase Substrates with Rapid Activation Behavior for Materials Science Applications. *ACS Macro Lett.* **2019**, 8 (6), 724-729.
2. N. L. Venkatareddy, P. Wilke, N. Ernst, J. Horsch, M. Weber, A. Dallmann, H. G. Börner, Mussel-Glue Inspired Adhesives: A Study on the Relevance of L-Dopa and the Function of the Sequence at Nanomaterial-Peptide Interfaces. *Adv. Mater. Interfaces* **2019**, 6 (13), 1900501, doi:10.1002/admi.201900501.
3. J. Horsch, P. Wilke, M. Pretzler, M. Seuss, I. Melnyk, D. Remmler, A. Fery, A. Rompel, H.G. Börner, Polymerizing Like Mussels Do: Toward Synthetic Mussel Foot Proteins and Resistant Glues. *Angew. Chem. Intl. Ed.* **2018**, 57 (48), 15728-15732.

### Beiträge der Autoren

1. J. Horsch und P. Wilke haben in Zusammenarbeit mit H. G. Börner die Studien geplant. Die Synthese der Peptidbibliothek und der Fluoreszenzsonde wurde von J. Horsch durchgeführt. Die Peptide und Peptid-PEG-Konjugate für kinetische Untersuchungen wurden von P. Wilke synthetisiert, deren Charakterisierung führte J. Horsch durch. Die Referenzexperimente, die Aktivierung und das Screening der Peptidbibliothek mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie die Vorbereitung der Identifizierung selektierter Peptide hat J. Horsch ausgeführt. Die MALDI-TOF-MS/MS Sequenzierungen wurden von J. Horsch in Zusammenarbeit mit H. Stephanowitz durchgeführt und von J. Horsch ausgewertet. Die UV/VIS-Spektroskopie-Experimente wurden von P. Wilke und die QCM-D-Adsorptionsstudien von J. Horsch durchgeführt. J. Horsch hat das Manuskript inklusive Abbildungen mit Beiträgen von P. Wilke, H. G. Börner vorbereitet. In Übereinstimmung aller Autoren wurde das Manuskript in seiner endgültigen Form abgeschlossen.
2. N. L. Venkatareddy, M. Weber, A. Dallmann und H. G. Börner haben die Studien geplant. N. L. Venkatareddy hat alle NMR und QCM-D-Experimente sowie die Molekülsimulationen durchgeführt und ausgewertet. A. Dallmann unterstützte in der Interpretation der Ergebnisse der NMR-Analysen. N. Ernst führte die Dopa-Parametrisierung und moleküldynamische Simulationen durch. P. Wilke und J. Horsch synthetisierten die Peptide und führten die Charakterisierung mittels UPLC-ESI-MS und MALDI-TOF-MS durch. N. L. Venkatareddy hat

mit Unterstützung von H. G. Börner das Manuskript inklusive Abbildungen vorbereitet. Alle Autoren haben die Ergebnisse diskutiert und zur finalen Form des Manuskripts beigetragen.

3. J. Horsch hat in Zusammenarbeit mit H. G. Börner und P. Wilke die Studien geplant. Darüber hinaus hat er sämtliche Peptidsynthesen und die Charakterisierung der Peptide durchgeführt. Alle Experimente bezüglich der enzymatischen Aktivierung, Modell-Reaktion, Polymerisation und Adsorption wurden von J. Horsch durchgeführt und ausgewertet und sind in der Dissertation in den Kapiteln 4.1 bis 4.4 mit aufgeführt. Diese Experimente umfassten analytische Messungen mittels UPLC-ESI-MS, HPLC, MALDI-TOF-MS, SDS-PAGE und QCM-D, die ebenfalls von J. Horsch ausgeführt und ausgewertet wurden. Die MALDI-TOF-MS-Messungen zur Polymercharakterisierung wurden von J. Horsch vorbereitet und von D. Remmler durchgeführt. Die Daten wurden in Kapitel 4.3.1 der Dissertation verwendet. A. Fery und M. Seuss haben die CP-AFM Adhäsionsstudien geplant. Die Probenvorbereitung zu den CP-AFM Messungen wurde von J. Horsch durchgeführt und die Ausführung und Auswertung der Messungen erfolgte durch M. Seuss und I. Melnyk. In der Dissertation wurden diese Daten in das Kapitel 4.5 aufgenommen. M. Pretzler hat das in den Studien verwendete Enzym *AbPPO4* exprimiert und gereinigt. J. Horsch bereitete das Manuskript inklusive Abbildungen mit Beiträgen von P. Wilke, H. G. Börner, M. Seuss, M. Pretzler und A. Rompel vor. In Übereinstimmung aller Autoren wurde das Manuskript in seiner endgültigen Form abgeschlossen.

## Vorträge

1. J. Horsch, P. Wilke, M. Pretzler, M. Seuss, A. Fery, A. Rompel, H. G. Börner, Segmented Sequence-defined Polymers Inspired by Mussel Byssus Formation. *16th EPF European Polymer Congress*, Lyon, Frankreich, 02.-07. Juli 2017.
2. J. Horsch, P. Wilke, M. Pretzler, A. Rompel, H. G. Börner, Enzyme-mediated polymerization. *5th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials*, Lissabon, Portugal, 6.-10. März 2017.

## Posterpräsentationen

1. J. Horsch, M. Seuss, A. Fery, H. G. Börner, Specifically Interacting Polymers: Can Polymer Chemists still Learn Anything from Mussels? *Macromolecular Colloquium*, Freiburg, Deutschland, 21.-23. Februar 2018.
2. J. Horsch, H. G. Börner, Mussel-inspired Polymerization. *29. Tag der Chemie*, Berlin, Deutschland, 18. Juni 2015.

## Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 42/2018 am 11.07.2018 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 22.07.2019

Justus Horsch