

**Nanopartikel-Protein Interaktionen:  
Quantifizierung struktureller und funktioneller  
Aspekte des Adsorptionsprozesses**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin

**Marcelina Patrizia Malissek**

geboren in Groß-Strehlitz (Polen)

Fakultät für Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

**2013**



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juni 2009 bis Oktober 2012 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Reinhard Zellner unter Betreuung von Herrn PD Dr. Lennart Treuel am Institut für Physikalische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. Reinhard Zellner

Prof. Dr. Matthias Epple

Vorsitzende: Prof. Dr. Elke Sumfleth

Tag der Disputation: 18.09.2013



*Für meine Familie*



*Inhaltsverzeichnis*

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Grundlagen.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Struktur und Funktion von Proteinen .....</b>	<b>6</b>
2.1.1. Serum-Albumin .....	10
2.1.2. Lysozym .....	12
2.1.3. Insulin .....	13
2.1.4. Immunoglobulin (IgG) .....	14
2.1.5. Trypsin.....	14
2.1.6. Chymotrypsin .....	15
2.1.7. Thermodynamik und Kinetik von Proteinfaltungen.....	16
<b>2.2. Nanopartikel .....</b>	<b>20</b>
2.2.1. Synthese, Stabilität und Eigenschaften von Nanopartikeln.....	20
2.2.2. Verwendung von Nanopartikeln.....	25
<b>2.3. Spektroskopie .....</b>	<b>27</b>
2.3.1. Circular dichroismus (CD) -Spektroskopie .....	27
2.3.1.1. Circular polarisiertes Licht .....	27
2.3.1.2. CD-Spektroskopie von Proteinen .....	30
2.3.2. Fluoreszenzspektroskopie.....	37
<b>2.4. Enzymkinetik.....</b>	<b>40</b>
<b>3. Methoden .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1. Verwendete Methoden .....</b>	<b>44</b>
3.1.1. Elektronenmikroskopie.....	44

## Inhalt

---

3.1.2. Dynamische Lichtstreuung .....	44
3.1.3. Nanoparticle Tracking Analysis .....	45
3.1.4. Analytische Scheibenzentrifuge .....	45
<b>3.2. Synthese und Charakterisierung der Nanopartikel .....</b>	<b>46</b>
3.2.1. Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel .....	46
3.2.2. Citrat-stabilisierte Gold-Nanopartikel .....	48
3.2.3. Gold-Nanoschalen .....	49
3.2.4. PVP-funktionalisierte Gold-Nanopartikel .....	50
3.2.5. PVP-funktionalisierte Silber-Nanopartikel .....	52
3.2.6. UV-Vis-Spektren der Nanopartikel .....	53
3.2.7. Polystyrol-Nanopartikel .....	54
3.2.8. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Größenbestimmung.....	56
3.2.9. Silber-Nanopartikel (12 nm, Seed).....	56
3.2.10. Silber-Nanopartikel (20-90 nm) .....	57
<b>3.3. CD-Spektroskopie .....</b>	<b>59</b>
3.3.1. Aufbau der Apparatur .....	59
3.3.2. Probenpräparation.....	60
3.3.3. Messungen.....	61
3.3.4. Bestimmung von Sekundärstrukturanteilen .....	61
3.3.5. Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten .....	63
<b>3.4. CD-Messungen von Bovinem Serum-Albumin in Gegenwart von Ionen .....</b>	<b>66</b>
<b>3.5. Quantifizierung der Adsorption von Proteinen auf Nanopartikel-Oberflächen.....</b>	<b>67</b>
3.5.1. Dialyse .....	67
3.5.2. Dialyse-Experimente .....	68
3.5.3. Präparation des Coomassie Brilliant Blue G250 Farbstoffes .....	69
3.5.4. Bradford-Protein-Assay.....	70

## Inhalt

---

3.5.5. Validierung mit Dialyse / Bradford-Protein-Assay .....	70
<b>3.6. Fluoreszenzspektroskopie.....</b>	<b>71</b>
3.6.1. Apparatur .....	71
3.6.2. Messungen.....	72
3.6.3. Bestimmung der Enzymaktivität .....	72
3.6.4. Desorptionsexperimente mit Trypsin .....	73
<b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>74</b>
<b>4.1. Einfluss der Oberflächen-Funktionalisierung auf die Proteinadsorption .....</b>	<b>74</b>
4.1.1. Wechselwirkung von Bovinem Serum-Albumin (BSA) mit metallischen Nanopartikeln .....	74
4.1.2. Wechselwirkung von Bovinem Serum-Albumin (BSA) mit Polymer-funktionalisierten Nanopartikeln .....	77
4.1.3. Wechselwirkung von Bovinem Serum-Albumin (BSA) mit Siliziumdioxid-Nanopartikeln .....	80
4.1.4. Wechselwirkung von Bovinem Serum-Albumin (BSA) mit Quantenpunkten ..	82
4.1.5. Zusammenfassung .....	84
<b>4.2. Einfluss des Proteins .....</b>	<b>85</b>
4.2.1. Wechselwirkung von Nanopartikeln mit verschiedenen Proteinen.....	85
4.2.2. Bovines Insulin.....	85
4.2.3. Humanes Immunglobulin (IgG) .....	91
4.2.4. Bovines Lysozym .....	93
4.2.5. Humanes Serum-Albumin (HSA) .....	95
4.2.6. Zusammenfassung .....	97
<b>4.3. Einfluss der Nanopartikel-Größe auf die Proteinadsorption.....</b>	<b>98</b>
4.3.1. Wechselwirkung von Bovinem Serum-Albumin mit Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln unterschiedlicher Größe (12-90 nm).....	98
<b>4.4. Einfluss auf die Enzym-Funktion .....</b>	<b>105</b>

## Inhalt

---

4.4.1. Aktivität von Enzymen in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln .....	106
4.4.2. Humanes Lysozym .....	106
4.4.3. Bovines Trypsin.....	108
4.4.3.1. Enzymaktivität von Trypsin in Gegenwart von negativ geladenen PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln.....	108
4.4.3.2. Enzymaktivität von Trypsin in Gegenwart von positiv geladenen PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln.....	112
4.4.3.3. Sekundärstruktur von Trypsin in Gegenwart von Gold-Nanopartikeln (PVP-funktionalisiert) .....	115
4.4.3.4. Desorptionsexperimente mit Trypsin von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln .....	116
4.4.3.5. Quantifizierungsexperimente mit dem Bradford-Protein-Assay und UV-Vis-Spektroskopie .....	117
4.4.4. Bovines Chymotrypsin .....	120
<b>5. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>123</b>
Publikationen.....	145
Anhang .....	148
1. CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Silber-Nanopartikeln unterschiedlicher Durchmesser.....	148
2. HPLC-Daten.....	152
Abbildungsverzeichnis .....	158
Tabellenverzeichnis.....	166
Eidesstattliche Erklärung.....	167
Danksagung .....	168
Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

### Zusammenfassung

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Wechselwirkung von Proteinen mit Nanopartikel-Oberflächen. Das Ziel bestand in grundlegenden qualitativen und quantitativen Untersuchungen des Adsorptionsprozesses und den damit verbundenen strukturellen und funktionellen Änderungen von Proteinen.

Basierend auf der Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie wurde eine neue Meßmethode entwickelt und validiert, mit der sich erfolgreich Gleichgewichtskonstanten ( $K_D$ ) für den Adsorptions-/Desorptionsprozess von Proteinen auf Nanopartikel-Oberflächen bestimmen lassen.

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Proteine eine unterschiedliche Affinität zur Nanopartikel-Oberfläche besitzen. Die Proteine Serum-Albumin (BSA) und Insulin zeigen eine starke Affinität zu Silber-Nanopartikel-Oberflächen. Dieses äußert sich in einer Gleichgewichtskonstante ( $K_D$ ) im kleinen nanomolaren Bereich. Für die Proteine Lysozym und Immunglobulin (IgG) wurden höhere  $K_D$ -Werte ermittelt. Es stellte sich heraus, dass die Oberflächenladung einen entscheidenden Faktor im Adsorptionsverhalten von Proteinen darstellt.

Bei metallischen Gold- und Silber-Nanopartikeln konnte kein Unterschied im Adsorptionsverhalten von BSA festgestellt werden. Dieses konnte verändert werden, wenn Nanopartikel Polymer-funktionalisiert wurden. Für die Untersuchung des Einflusses einer Polymerfunktionalisierung wurden im Rahmen einer Kooperation Gold- und Silber-Nanopartikel mit dem Polymer (Poly)vinylpyrrolidon (PVP) funktionalisiert. Untersuchungen von BSA mit Citrat-stabilisierten metallischen Nanopartikeln zeigen  $K_D$ -Werte im kleinen nanomolaren Bereich, während für Polymere und Polymer-funktionalisierte Nanopartikel Gleichgewichtskonstanten im kleinen mikromolaren Bereich bestimmt wurden.

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Abhängigkeit der Nanopartikel-Größe im Interaktionsprozess mit BSA untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Nanopartikel-Größe bis zu einem Durchmesser von 40 nm relevant ist. Hier kann wahrscheinlich aufgrund der gleichen Größenverhältnisse von BSA und der Silber-Nanopartikel-Oberfläche das Protein mit weniger funktionellen Gruppen mit der Nanopartikel-Oberfläche interagieren. Diese geringere Affinität zeigt sich in größeren  $K_D$ -Werten. Bei einem Nanopartikel-Durchmesser von über 40 nm interagiert das BSA, aufgrund der stärker ausgeprägten Größenverhältnisse

## Zusammenfassung

---

gegenüber dem Nanopartikel, nur noch mit einer „flachen“ NP-Oberfläche. Hier ist nur noch die vorhandene Gesamt-Oberfläche verantwortlich für die Denaturierung des BSA. Demnach konnten für große Nanopartikel keine Unterschiede in der Gleichgewichtskonstante ermittelt werden.

Neben dem strukturellen Einfluss wurde die Funktionshemmung von Enzymen im Interaktionsprozess mit PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln untersucht. Die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Lysozym zeigen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Enzymaktivität im Interaktionsprozess mit PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln. Die Funktionshemmung von Trypsin wurde in Gegenwart von Gold-Nanopartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenladung untersucht. Es konnte in Gegenwart dieser Nanopartikel eine stärkere Hemmung der Enzymaktivität bestimmt werden, wenn die Oberflächenladung negativ war (- 30 mV), als für eine positive Oberflächenladung (+ 30 mV). Ursächlich für dieses Verhalten ist die überwiegend positive Oberflächenladung des Trypsins, welches eine stärkere Adsorptionsaffinität zu negativ geladenen Nanopartikeln besitzt. CD-Messungen belegen zudem einen Strukturverlust des Enzyms im Interaktionsprozess mit Gold-Nanopartikel-Oberflächen. Dieser Strukturverlust kann ebenfalls im Bereich des aktiven Zentrums stattfinden, was den Verlust der Funktion des Enzyms erklärt. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich Trypsin-Moleküle wieder von der Nanopartikel-Oberfläche desorbieren lassen, diese dann allerdings keine Enzymaktivität mehr aufweisen.

### 1. Einleitung

Aufgrund ihrer besonderen physikalischen und chemischen Eigenschaften haben Nanopartikel (NPs) heutzutage eine breite Anwendung in der Forschung, in der Medizin und in vielen kommerziellen Produkten (Goesmann und Feldmann 2010; Richter und Bastian 2008; Aitken et al. 2006; Schmid 2005; Anselmann 2001). Dabei ist es unvermeidbar, dass Nanopartikel in die Umwelt und in den menschlichen Körper gelangen und mit biologischen Systemen interagieren.

Wenn Nanopartikel in Kontakt mit biologischen Systemen kommen, findet eine physikalische und chemische Interaktion zwischen der Nanopartikel-Oberfläche und den darin enthaltenen biologischen Komponenten statt (Yang et al. 2013; Lynch et al. 2006). Bei den biologischen Komponenten kann es sich um Proteine, Membranen, Phospholipide, Organellen und DNA handeln.

Nanopartikel bewegen sich in der gleichen Größenskala wie biologische Komponenten (z.B. Proteine) und können damit biologische Barrieren (Blut-Hirn-Schranke, Lungen-Blut-Schranke) überwinden (Buzea et al. 2007; Nemmar et al. 2002) und in Zellen eindringen (Wang et al. 2012; Zhao et al. 2011; Lunov et al. 2011). Gelangen Nanopartikel in ein biologisches Medium, können Proteine an die Nanopartikel-Oberfläche binden (De Paoli Lacerda et al. 2010; Röcker et al. 2009; Lundqvist et al. 2008; Cedervall et al. 2007; Lynch 2006). Die Gesamtproteinkonzentration in biologischen Systemen, wie z.B. im Blut und in Zellkompartimenten beträgt  $0.35 \text{ g mL}^{-1}$  (Klein 2007). Diese Medien enthalten über 3700 verschiedene Proteine in unterschiedlichen Konzentrationen (Cedervall et al. 2007). Um das Verhalten von Nanopartikeln in biologischen Systemen zu verstehen, ist es elementar, ihre Interaktionen mit Proteinen zu erforschen (Watari et al. 2009; Fillafer et al. 2009).

*Cedervall et al.* haben den Begriff „hard und soft protein corona“ (harte und weiche Proteinhülle) etabliert (Cedervall et al. 2007). Die weiche Proteinhülle bildet sich innerhalb von einigen Sekunden bis Minuten, während die Ausbildung der harten Proteinhülle einige Stunden dauern kann (Monopoli et al. 2011). Bei gleichbleibenden Bedingungen ist die harte Proteinhülle über viele Stunden stabil, wenn die Bedingungen wie pH-Wert und Proteinkonzentration gleich bleiben. Bei Eintritt in ein anderes Medium, wie z.B. in Zellen oder in ein Organ, findet ein rascher Austausch von Proteinen in der Corona statt (Cedervall et al. 2007). Einen Erklärungsansatz dieses Phänomens bietet der Vroman-Effekt, welcher die Affinität von Proteinen zur Adsorption auf eine Oberfläche beschreibt (Jung et al. 2003;

Vroman und Adams 1969). Demnach müssten Proteine wie z.B. HSA als erstes auf die Nanopartikel-Oberfläche adsorbieren, würden aber dann von anderen Proteinen ausgetauscht werden. Es hat sich herausgestellt, dass dieser Effekt für Nanopartikel-Oberflächen nicht exakt zutrifft (Tenzer et al. 2011).

Weitere Systeme (z.B. Zellen) interagieren dann mit der Protein-Corona, so dass die Art der Corona im Wesentlichen die biologische Identität des Nanopartikels bestimmt (Treuel et al. 2010; Röcker et al. 2009; Cedervall et al. 2007) und einen wichtigen Faktor in der biologischen Wirkung darstellt (Leszczynski 2010). Bei der Adsorption auf die Nanopartikel-Oberfläche kann es zu Strukturänderungen im Protein kommen (Gebauer et al. 2012; Treuel et al. 2010; Aubin-Tam und Hamad-Schifferli 2008; Roach et al. 2006; Aubin-Tam und Hamad-Schifferli 2005; Medintz et al. 2004; Zhou et al. 1997). Die Strukturänderungen des Proteins, die während einer Adsorption auf der Nanopartikel-Oberfläche auftreten, können zum Verlust der biologischen Aktivität (Vertegel et al. 2004) und zu einer Immunreaktion führen (Brandes et al. 2006; Baron et al. 1999). So kann die Protein-Corona den Transport in biologischen Medien oder die Wechselwirkung der Nanopartikel mit Zellen beeinflussen (Monopoli et al. 2011).

Bisher gibt es kaum aussagekräftige Studien zur Toxizität von Nanopartikeln, so dass eine Einschätzung des Gefahrenpotentials unzureichend ist (Oberdörster et al. 2007; Wiesner et al. 2006; Borm et al. 2006). Studien zeigen, dass Nanopartikel aufgrund ihrer geringen Größe über die Lungen und den Magen-Darm-Trakt aufgenommen werden und sich in Organen wieder finden (Semmler-Behnke et al. 2008). Zelleexperimente belegen eine Zytotoxizität von Nanopartikeln (Lewinski et al. 2008). Ebenfalls konnten bereits Störungen des Immunsystems, die Entstehung von Krebs oder Entzündungen des Magen-Darm-Traktes mit Nanopartikeln in Verbindung gebracht werden (Ashwood et al. 2007; Gatti 2004). Wesentliche Wirkungsmechanismen in der Interaktion zwischen Nanopartikeln und Biomolekülen sind noch unzureichend geklärt. Das gilt z.B. für den Transport von Nanopartikeln über biologische Membranen in die Zellen (Chithrani et al. 2010). Des Weiteren ist der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen Nanopartikeln und Proteinen noch nicht verstanden und welche Auswirkungen dieser auf die biologische Funktion von Proteinen hat. Der Grund liegt hauptsächlich im mechanistischen Verständnis der Interaktion von Nanopartikeln mit biologischen Komponenten (Treuel et al. 2012 ; Nel et al. 2009). Eine Einschätzung des Risikos für Mensch und Umwelt ist demnach überfällig (Olson und Gurian 2012; Abbas et al. 2010; Handy et al. 2008; Maynard et al. 2006).

## Einleitung

---

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der Interaktion von Nanopartikeln mit Proteinen. Grundlegende Fragenstellungen sind, ob das Nanopartikel-Material, -die Größe und -Oberflächenfunktionalisierung die Struktur und Funktion von Proteinen beeinflussen. Es gibt verschiedene analytische Methoden um Nanopartikel-Protein-Interaktionen zu untersuchen (Li et al. 2010), aber nur wenige erlauben eine quantitative Untersuchung des Interaktionsprozesses. Die Untersuchung von Konformations-Änderungen von Proteinen im Interaktionsprozess mit Nanopartikeln mit Hilfe der CD-Spektroskopie findet in der Literatur eine breite Anwendung (Mu et al. 2008; Wangoo et al. 2008; Shang et al. 2007; Shen et al. 2007; Matsuura et al. 2006; Worrall et al. 2006; Aubin-Tam und Hamad-Schifferli 2005; Jiang et al. 2005; Lundqvist et al. 2004; Hong et al. 2004). Vorteil dieser Methode ist, dass diese nur die Konformation von Proteinen betrachtet und deshalb weitestgehend unabhängig von der Nanopartikel-Spezies ist.

## 2. Grundlagen

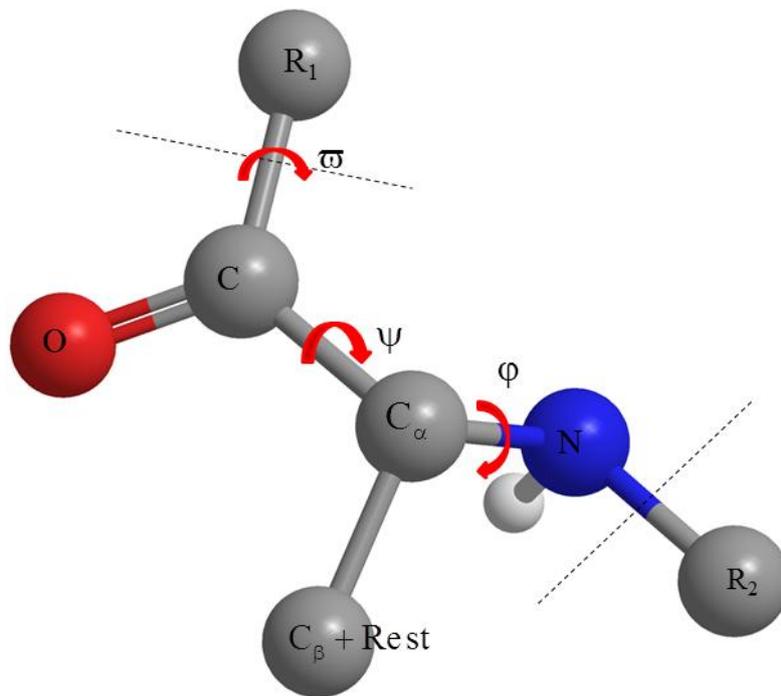
### 2.1. Struktur und Funktion von Proteinen

Proteine sind lebenswichtige Bausteine im menschlichen Körper und spielen in vielen biologischen Vorgängen eine wichtige Rolle. Jedes Protein besitzt eine bestimmte Funktion, die sich in seiner räumlichen Struktur widerspiegelt. Nach ihrer Funktion unterteilt, gibt es Strukturproteine, Enzyme, Transportproteine, Speicherproteine, Signalproteine, Rezeptorproteine und Genregulationsproteine. Strukturproteine verleihen Zellen und Geweben eine größere mechanische Stabilität und sind durch eine faserartige Struktur gekennzeichnet. Hierzu zählt z.B. Kollagen und Elastin (Kühn 1974). Enzyme katalysieren Stoffwechselfvorgänge, z.B. die Bildung oder Öffnung kovalenter Verbindungen. Hierzu zählen z.B. Trypsin und Chymotrypsin, die als Verdauungsenzyme fungieren (Stroud 1974). Transportproteine können Ionen, Moleküle oder andere Biomoleküle an sich binden und in der Blutbahn oder in die Zellen transportieren. Als Beispiel kann man hier Serum-Albumin, Hämoglobin und Transferrin erwähnen (Schechter 2008; Huebers et al. 1984). Andere Proteine wiederum sind in der Lage, Ionen zu speichern. Dieses ist z.B. beim Ferritin der Fall, welches Eisen in der Leber speichert (Harrison und Arosio 1996). Hormone zählen zu den Signalproteinen. Diese sorgen für eine Übertragung von Informationen zwischen den Zellen. Rezeptorproteine, zu denen beispielsweise das Retina-Protein Rhodopsin gehört, dienen im Organismus dazu, Signale wahrzunehmen und diese weiterzuleiten (Klare et al. 2008; Spudich et al. 2000). Weiterhin gibt es Proteine, die am Aufbau und Abbau von DNA beteiligt sind. Sie werden als Genregulatorproteine (z.B. RNA-Polymerase) bezeichnet (Cramer et al. 2000).

Bei Proteinen handelt es sich um Makromoleküle, deren Bausteine Aminosäuren sind. Diese sind über Peptidbindungen miteinander verknüpft. Proteine besitzen eine komplexe räumliche Struktur, die man in eine Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen aufteilen kann. Als Primärstruktur bezeichnet man die Aminosäuresequenz des Proteins.

Die Aminosäuresequenz beschreibt die Reihenfolge der Aminosäuren, die durch kovalente Peptid-Bindungen miteinander verbunden sind. Die Aminosäureketten bestehen aus einem Rückgrat und einer Seitenkette. Diese kovalenten Bindungen erlauben prinzipiell eine freie Drehbarkeit der Aminosäuresequenz über die Winkel  $\phi$ ,  $\omega$  und  $\Psi$ , wobei  $\phi$  den Winkel

zwischen dem  $C_\alpha$  und der N-Bindung und  $\Psi$  den Winkel zwischen dem  $C_\alpha$  und der C-Einfachbindung beschreibt. Als  $\omega$  ist der Winkel zwischen dem Kohlenstoff und dem Rest der Aminosäurekette definiert. Abbildung 1 zeigt diese Winkel innerhalb der Peptidbindung. Für Winkel, die  $180^\circ$  entsprechen, erhält man eine vollständig gestreckte Konformation des Peptides (Horton et al. 2008).

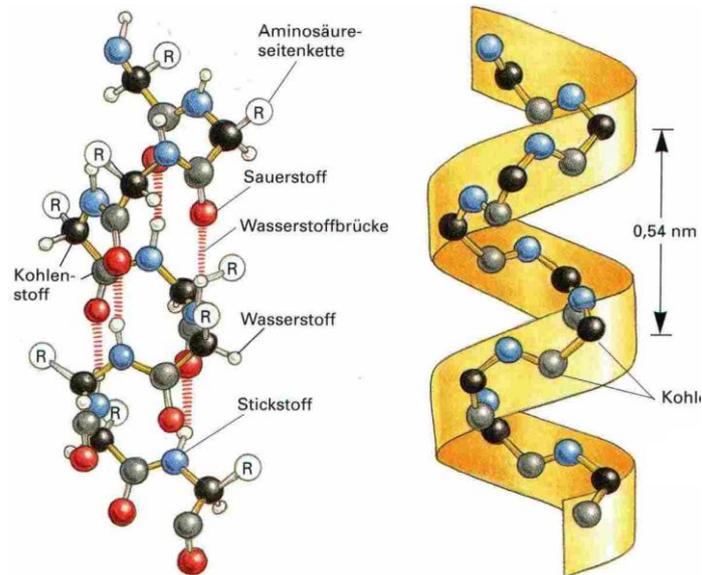


**Abbildung 1:** Darstellung einer Peptidbindung mit den zugehörigen Torsionswinkeln:  $\phi$ ,  $\psi$  und  $\omega$  (Horton et al. 2008)

Durch nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen erhält das Protein eine spezielle Faltung. Eine lokale räumliche Anordnung in einem Abschnitt eines Proteins wird als Sekundärstruktur bezeichnet. Diese entsteht durch eine konstante Drehung der Winkel an jedem  $\alpha$ -Kohlenstoffatom der Peptidbindung. Die häufigste Sekundärstruktur ist die  $\alpha$ -Helix, die in Abbildung 2 dargestellt ist. Die  $\alpha$ -helikale Struktur bildet sich durch Wechselwirkungen zwischen den N-H und den C-O-Gruppen im Polypeptid aus. Die Wasserstoffbrückenbindung befindet sich zwischen jeder vierten Peptidbindung und hat eine Länge von 0,28 nm (Pauling et al. 1951). Daraus resultiert die spezielle Schraubenform der  $\alpha$ -Helix. Durch die Summe aus vielen einzelnen Wasserstoffbrückenbindungen wird die Struktur des Proteins stabilisiert. Pro Drehung findet man in einer  $\alpha$ -Helix 3,6 Aminosäuren.

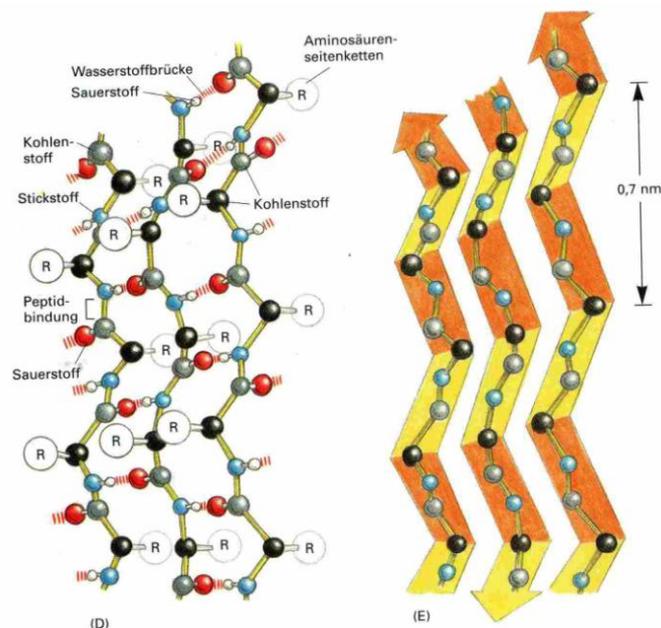
## Grundlagen

Die Seitenketten der  $\alpha$ -Helix ragen nach außen, um eine sterische Wechselwirkung zu minimieren. Ebenfalls von Bedeutung für die Stabilisierung der  $\alpha$ -Helix sind die Van-der-Waals Wechselwirkungen.



**Abbildung 2:**  $\alpha$ -Helix-Struktur von Proteinen (*entnommen aus Alberts et al.*) (Alberts et al. 2001)

Eine weitere Sekundärstruktur von Proteinen ist das  $\beta$ -Faltblatt, welches in Abbildung 3 dargestellt ist.



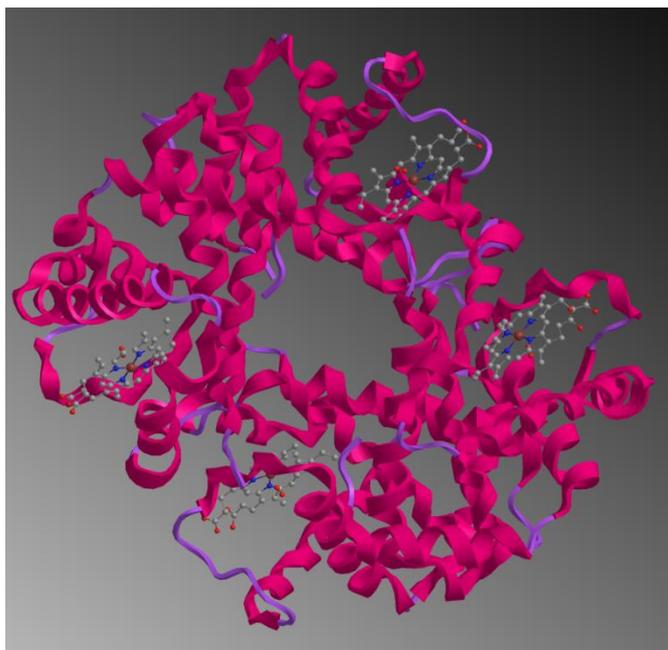
**Abbildung 3:**  $\beta$ -Faltblatt-Struktur von Proteinen (*entnommen aus Alberts et al.*) (Alberts et al. 2001)

Das  $\beta$ -Faltblatt kann in einer parallelen oder antiparallelen Form vorliegen. Bei der antiparallelen Kette faltet sich das Polypeptid auf sich selbst zurück, so dass die Laufrichtung der antiparallelen Kette entgegengesetzt zu der Nachbarkette ist. Beim parallelen  $\beta$ -Faltblatt verlaufen zwei benachbarte Polypeptidketten in die gleiche Richtung. Die  $\beta$ -Faltblätter sind ebenfalls durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. In der Regel findet man in einem  $\beta$ -Faltblatt zwischen 2 und 12 Peptidstränge (Whitford 2005). Weitere Strukturelemente in Proteinen sind die Turns. Dabei handelt es sich um Schleifen mit einem Winkel von  $180^\circ$ . Ein Turn besteht aus mindestens drei Aminosäuren und verbindet häufig weitere Sekundärstrukturelemente miteinander. Turns findet man in diversen Typen vor, wobei Turn I und II die zwei häufigsten Formen sind (Creighton 1992).

Zuletzt ist das Random Coil (Zufallsknäuel) eine elementar wichtige Sekundärstruktur in Proteinen. Das Random Coil ist im Gegensatz zur  $\alpha$ -Helix und zum  $\beta$ -Faltblatt durch eine nicht regelmäßige Struktur charakterisiert (Woody 1992). Dabei ist der Begriff Zufallsknäuel irreführend, da diese Bereiche trotz nicht regelmäßiger Struktur dennoch oft eine definierte Struktur vorweisen. So spielt gerade dieser Bereich im Protein häufig eine große Rolle, da durch die Flexibilität dieser Struktur andere Moleküle und Ionen angebunden werden können. In der Regel befindet sich in diesem Bereich oft das aktive Zentrum eines Enzyms (Bartlett et al. 2002).

Die Gesamtheit aller Sekundärstrukturanteile im Protein bezeichnet man als Tertiärstruktur. D.h. die räumliche Struktur eines Proteins setzt sich aus der Abfolge von vielen Sekundärstrukturanteilen zusammen. Die Faltung der Tertiärstruktur wird unter anderem durch die Aminosäuresequenz bestimmt. Das bedeutet, dass man anhand der Polypeptidkette erste Hinweise der Faltung des Proteins voraussagen kann. Eine weitere Stabilisierung der Struktur erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen im Protein-Inneren, elektrostatische Wechselwirkungen, Van-der-Waals Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken- und Disulfidbindungen (Treuel und Nienhaus 2012; Nel et al. 2009).

Weiterhin findet man noch eine nächst höhere Ordnung in Proteinen. Diese wird dann als Quartärstruktur bezeichnet. Als Beispiel kann man hier Hämoglobin erwähnen. Hier besteht der gesamte Proteinkomplex aus vier Untereinheiten (Abbildung 4).



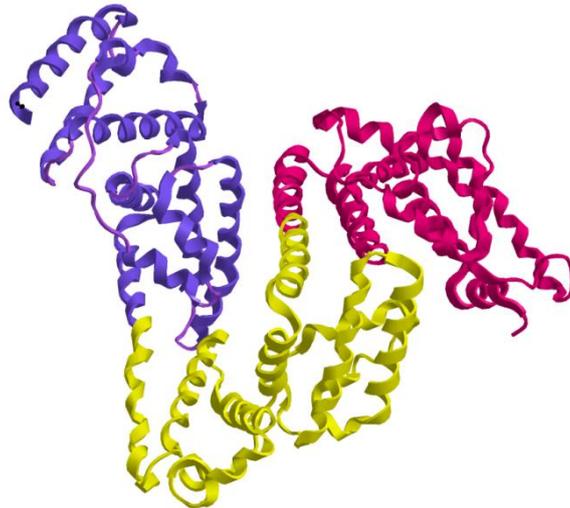
**Abbildung 4:** Struktur von Hämoglobin (RCSB Protein Data Bank 2013; Paoli et al. 1996), PBD-Code: 1GZX

### 2.1.1. Serum-Albumin

Die Struktur und Funktion des Serum-Albumins ist sehr gut erforscht (Dockal et al. 1999; He und Carter 1992). Diesem Protein wird eine Relevanz bei Untersuchungen von Nanopartikel-Protein-Interaktionen zugesprochen, da es am häufigsten in der physiologischen Protein-Corona auf Nanopartikel-Oberflächen gefunden wird (Tenzer et al. 2011). Deshalb wird Serum-Albumin im Rahmen dieser Arbeit meistens als „Modellprotein“ verwendet. Es ist mit einer Konzentration von  $0.6 \text{ mmol L}^{-1}$  im Blutplasma und einem Anteil von über 50 % aller Proteine das am häufigsten vorkommende Protein im menschlichen Körper (Dockal et al. 1999; He und Carter 1992).

Das Bovine Serum-Albumin (BSA) hat eine molare Masse von 66430 D und ist aus drei gleichwertigen Domänen aufgebaut, die jeweils in zwei Subdomänen unterteilt sind (Francis 2010; Olivieri und Craievich 1995). Die einzelnen Domänen besitzen unterschiedliche Nettoladungen. Domäne I besitzt eine Nettoladung von -10, Domäne II eine Nettoladung von -8 und Domäne III ist insgesamt ungeladen. Unter physiologischen Bedingungen ist Serum-Albumin negativ geladen. Die Ladung des Proteins spielt insgesamt eine große Rolle im Sinne der Orientierung des Proteins bei der Adsorption auf die Nanopartikel-Oberfläche (Li et al. 2006). BSA besitzt bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert eine herzförmige Struktur

(Bos et al. 1989). Das Protein besteht aus einem  $\alpha$ -Helix Anteil von 67 % (He und Carter 1992) und keinem  $\beta$ -Faltblatt. Dabei werden in der Literatur auch andere  $\alpha$ -Helix Anteile postuliert, die unter anderem durch das verwendete Lösungsmittel und den pH-Wert zustande kommen. Als cysteinereiches Protein besitzt es 17 Disulfidbindungen (Dugaiczky et al. 1982). Nachfolgende Abbildung zeigt die Struktur des Serum-Albumins.



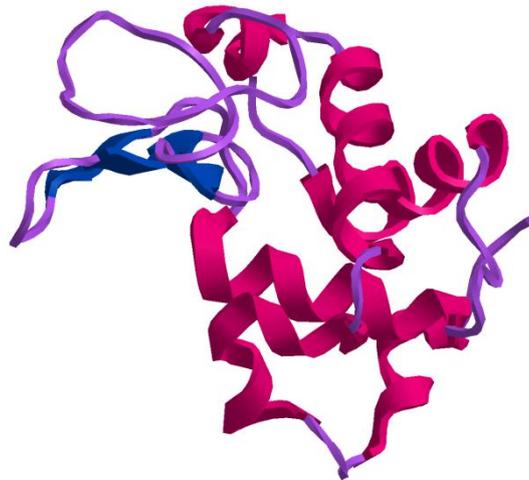
**Abbildung 5:** Struktur von Serum-Albumin. Darstellung der drei Domänen (RCSB Protein Data Bank 2013; Sugio et al. 1999), PDB-Code: 1AO6

Serum-Albumin ist für den Transport von wasserunlöslichen Biomolekülen wie Fettsäuren und wasserunlöslichen Vitaminen verantwortlich (Bikle et al. 1985). Zusätzlich ist das Protein an der Regulation des osmotischen Druckes (Quinlan et al. 2005) und des pH-Wertes im Blut beteiligt.

Die Synthese des Serum-Albumins erfolgt in der Leber (Quinlan et al. 2005). Für die Ermittlung der geometrischen Struktur von HSA wird eine gleichseitige dreieckige Prismen Struktur mit einer Länge von 8.4 nm und einer Dicke von 3.15 nm angenommen (Röcker et al. 2009; He und Carter 1992). Dieses gilt auch für das Bovine Serum-Albumin (Ferrer et al. 2001). Das Serum-Albumin kann entweder mit der kompletten Seitenfläche (side-on) auf das Nanopartikel adsorbieren oder mit der kleineren Stirnfläche (end-on). Für die side-on Möglichkeit ergibt sich ein Platzbedarf von 30.9 nm<sup>2</sup> und für die end-on Variante beträgt der Platzbedarf 26.5 nm<sup>2</sup>.

### 2.1.2. Lysozym

Das Lysozym gehört als Enzym zu der Gruppe der Hydrolasen und hat die Aufgabe die  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidische Bindung in Peptidoglycan, einem Makromolekül welches in Bakterienzellwänden vorhanden ist, zu spalten und Bakterien damit abzutöten (Callewaert und Michiels 2010). Es kommt in menschlichen und tierischen Geweben und Körperflüssigkeiten (z.B. Tränenflüssigkeit) vor. Lysozym hat eine molare Masse von 14.3 kD und besteht aus 129 Aminosäuren (Prager und Wilson 1988). Bei den Aminosäuren 1-40 handelt es sich um helixreiche Abschnitte mit hauptsächlich unpolaren Aminosäuren, die sich im Inneren des Lysozymmoleküls befinden. Die Aminosäuren 41-95 dagegen sind reich an polaren Aminosäuren, aber konformativ weniger stabil (Jollès 1969). Die restlichen Aminosäuren umhüllen den unpolaren Bereich im Protein. Insgesamt besitzt das Lysozym einen Gesamthelix-Anteil von 40 %. Das Lysozym enthält vier Disulfidbindungen, die zusätzlich für eine Stabilität im Protein sorgen. In Abbildung 6 ist die räumliche Struktur von Humanem Lysozym dargestellt.



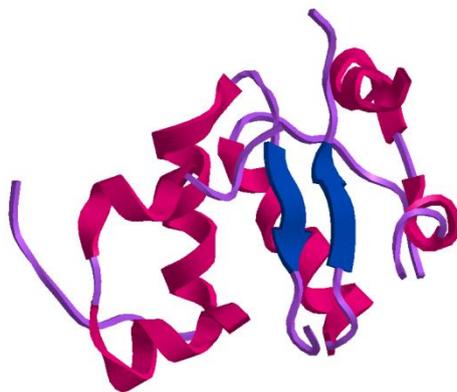
**Abbildung 6:** Räumliche Struktur von Humanem Lysozym (RCSB Protein Data Bank 2013; Harata et al. 1992), PDB-Code: 1LAA

Das Lysozym besitzt eine Größe von etwa 4.5 nm x 3.5 nm x 3.5 nm (Vertegel et al. 2004). Das aktive Zentrum dieses Enzyms bilden die Aminosäuren Glu35 und Asp52 (Malcolm et al. 1989). Hier werden Substrate durch Wasserstoffbrückenbindungen und das aktive Zentrum gebunden und gespalten. Zusätzlich ist noch Tryptophan an der enzymatischen Wirkung beteiligt. Das Lysozym spaltet das in der Zellwand von gram-positiven Bakterien (z.B. *Micrococcus Lysodeikticus*) enthaltenen Peptidoglycan und macht diese damit unschädlich.

Bei dem Peptidoglycan handelt es sich um eine Polymerkette von zwei miteinander verknüpften Zuckerderivatmolekülen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure an der noch eine Tetrapeptid gebunden ist. Das Lysozym spaltet im aktiven Zentrum die  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glucosaminbindung. Das Lysozym wurde für die Untersuchung von Nanopartikel-Protein Interaktionen gewählt, da es eine große Relevanz in der Immunabwehr besitzt (Benachour et al. 2012).

### 2.1.3. Insulin

Bei dem Insulin handelt es sich um ein Protein mit 51 Aminosäuren, welches aus 2 Ketten aufgebaut ist, die mit zwei Disulfidbindungen verknüpft sind. Die A-Kette beinhaltet 21 Aminosäuren und die B-Kette 30 Aminosäuren (Brange und Langkjoer 1993). Folgende Abbildung zeigt die räumliche Struktur des Insulin Monomers.

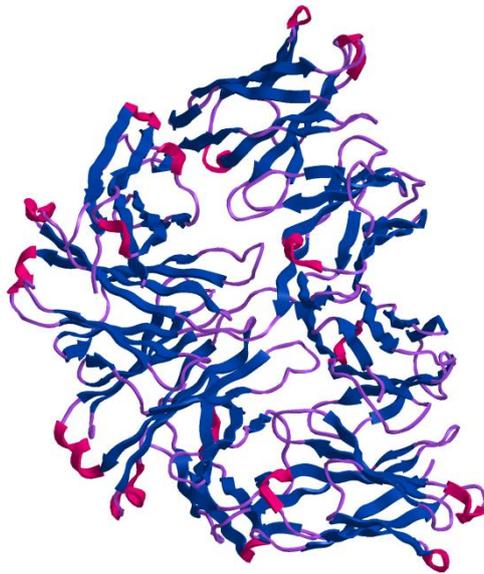


**Abbildung 7:** Räumliche Struktur des Bovinen Insulin Monomers (RCSB Protein Data Bank 2013; Brange et al. 1997), PDB-Code: 4INS

Das Insulin liegt bei Konzentrationen unter 0.1  $\mu$ M als Monomer vor (Brange und Langkjoer 1993). Bei höheren Konzentrationen bildet es Dimere aus. In Gegenwart von Zinkionen schließen sich ab einer Konzentration von 0.01 mM und pH-Werten zwischen 4 und 8 die Dimere zu Hexameren zusammen (Brange und Langkjoer 1993). Bei dem Insulin handelt es sich um ein sehr helixreiches Protein. Der A-Strang besitzt im überwiegenden Helix-Anteile und Strang B besteht neben  $\alpha$ -Helix auch aus zwei  $\beta$ -Faltblättern. Insulin wird in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas synthetisiert. Das Enzym hat im Organismus die Funktion, den Glucose-Metabolismus zu steuern und wirkt somit als Hormon. Das monomere Insulin hat eine Größe von ungefähr 2.5 nm x 2 nm x 3 nm (Brange et al. 1990).

### 2.1.4. Immunoglobulin (IgG)

Bei dem Immunoglobulin handelt es sich um ein Glykoprotein, d.h. an dem Protein ist eine Kohlenhydratgruppe gebunden, die dem Protein eine zusätzliche Stabilität verleiht. Das Protein hat eine molare Masse von 150 kD und ist aus vier Proteinketten aufgebaut (Steward 1984). Abbildung 8 zeigt die Struktur von Humanem IgG:



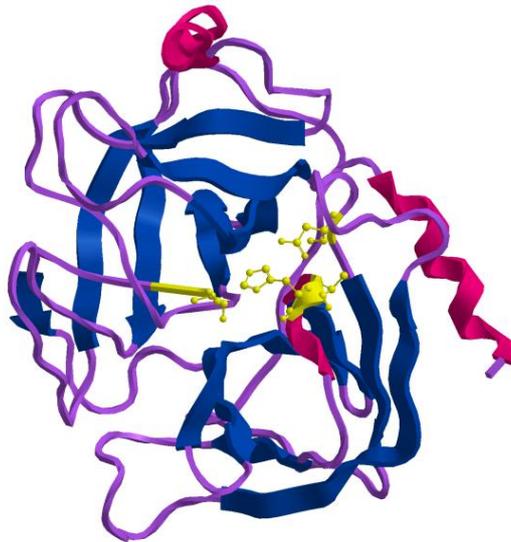
**Abbildung 8:** Räumliche Struktur von Humanem IgG (RCSB Protein Data Bank 2013; Houde et al. 2009), PDB-Code: 3FZU

Bei den vier Proteinketten handelt es sich um zwei größere Abschnitte mit jeweils einer molaren Masse von 50 kD und zwei kleineren Abschnitten mit molaren Massen von jeweils 25 kD (Amzel und Poljak 1979). IgG fungiert als Antikörper. Es hat im menschlichen Körper die Aufgabe, Antigene an sich zu binden und eine Immunabwehr auszulösen. Die Anbindung von z.B. Granulozyten erfolgt an den Enden der kurzen Proteinketten, die in ihrer räumlichen Struktur sehr flexibel sind (Barnett Foster et al. 1978). Das Immunoglobulin G hat Größe von ungefähr 14.5 nm x 8.5 nm x 4.0 nm (Tan et al. 2008).

### 2.1.5. Trypsin

Trypsin gehört zu der Gruppe der Endopeptidasen und hat die Aufgabe, Proteine zu spalten. Deshalb fungiert es als Verdauungsenzym. Da man dieses Enzym im Magen-Darm-Trakt findet, ist es relevant, die Interaktion mit Nanopartikeln zu untersuchen, da Nanopartikel

ebenfalls auf diese Weise vom Körper aufgenommen werden können. Das Trypsin kann in verschiedenen isomeren Formen vorkommen (Andersén et al. 2001). Man nennt das Trypsin ebenfalls Serinprotease, da die Aminosäure Serin, zusammen mit einem Histidin Molekül das aktive Zentrum des Enzyms darstellt und andere Proteine am Arginin-Rest spaltet. Die nachfolgende Abbildung stellt die räumliche Struktur des Bovinen Trypsins mit den Sekundärstrukturanteilen und dem aktiven Zentrum dar:



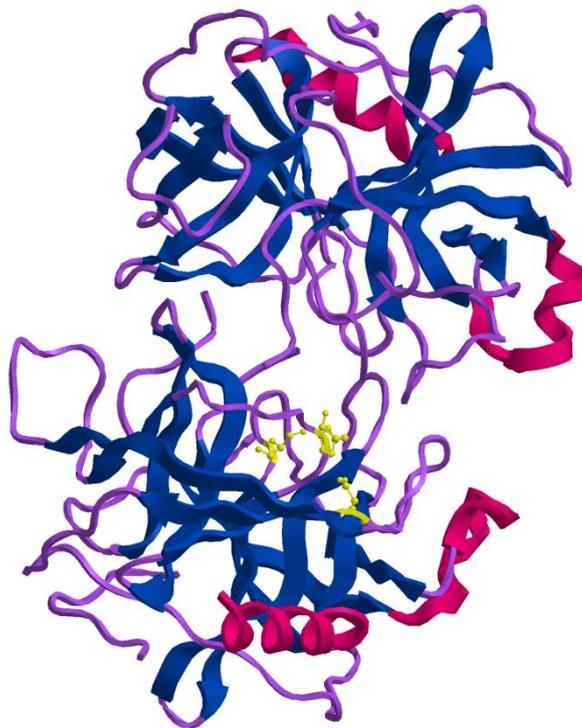
**Abbildung 9:** Struktur von Bovinem Trypsin, Darstellung der Sekundärstrukturen und des aktiven Zentrums: Ser-195, Asp-102, His-57 (gelb markiert) (RCSB Protein Data Bank 2013; Yamane et al. 2011), PBD-Code: 3ATL

Bei der Spaltung wird der Sauerstoff des Serins durch das Histidin deprotoniert und kann dann nukleophil an der Carbonylfunktion des Arginins des zu spaltenden Proteins angreifen. Die Abspaltung des Arginins erfolgt über einen tetraedrischen Übergangszustand und unter der Beteiligung eines Wassermoleküls (Jackson 2006). Trypsin hat eine Größe von ungefähr 3.8 nm x 3.8 nm x 3.8 nm (Min et al. 2010; Hartmann 2005).

### 2.1.6. Chymotrypsin

Das Chymotrypsin ist wie das Trypsin ebenfalls ein Verdauungsenzym und kann in die Enzymklasse der Serinproteasen eingeteilt werden (Stroud 1974). Das Enzym besitzt eine ellipsoidale Struktur. Es besteht aus mehreren  $\beta$ -Faltblättern und einem  $\alpha$ -helixreichen Bereich am C-Terminus (Garrett und Grisham 2013). Das aktive Zentrum des Enzyms bilden

die drei Aminosäuren Asparaginsäure, Histidin und Serin. Wie das Trypsin, spaltet auch das Chymotrypsin Peptidbindungen, wobei die Bindung an aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin gespalten wird. In Abbildung 10 ist die räumliche Struktur und das aktive Zentrum von Bovinem Chymotrypsin dargestellt.



**Abbildung 10:** Struktur von Bovinem  $\alpha$ -Chymotrypsin, Darstellung der Sekundärstrukturen und des aktiven Zentrums: Ser-195, Asp-102, His-57 (gelb markiert) (RCSB Protein Data Bank 2013; Tsukada und Blow 1985), PDB-Code: 4CHA

Die Dimensionen des Chymotrypsin betragen ungefähr 4 nm x 4 nm x 5.1 nm (Biswas und Pal 2004).

### 2.1.7. Thermodynamik und Kinetik von Proteinfaltungen

Die biologische Funktion eines Proteins hängt nicht nur von der Aminosäuresequenz des Proteins ab, sondern vielmehr von seiner räumlichen Struktur (Frauenfelder et al. 1988). Diese spezielle Faltung des Proteins wird unter anderem durch die Aminosäuresequenz festgelegt. Das heißt, dass die native Proteinstruktur eine eindeutige räumliche Anordnung besitzt (Robertson und Murphy 1997). So fand *Levinthal* heraus, dass sich denaturierte

## Grundlagen

---

Proteine spontan in die native Form zurückfalten können, da die Informationen zur Faltung in der Aminosäuresequenz liegen (Levinthal 1968). Neben der Aminosäuresequenz gibt es noch weitere Faktoren, die die Faltung eines Proteins beeinflussen. Dazu zählen nicht lokale Wechselwirkungen wie z.B. mit einem Solvens. Unter physiologischen Bedingungen können Proteine spontan eine native Struktur einnehmen, wobei nativ bedeutet, dass das Protein seine biologische Funktion besitzt und eine definierte räumliche Struktur aufweist. Im Gleichgewicht liegt die native Proteinstruktur (N) neben der denaturierten Form (E) in einem Zustand ohne jegliche Zwischenstufen vor. Deshalb kann man schreiben:



Hierfür ergibt sich dann folgende Gleichgewichtskonstante:

$$K_{eq} = \frac{[N]_{eq}}{[E]_{eq}} = \frac{k_E}{k_N} \quad (2)$$

Die native Form eines Proteins entspricht immer dem Zustand der niedrigsten freien Gibbs'schen Energie.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (3)$$

Maßgeblich für die Stabilität eines Proteins ist die Differenz der freien Energie  $\Delta G$  des denaturierten und des nativen Proteins, wobei für die Faltung gilt:

$$\Delta G^0 = G^0_{\text{Bildung nativ}} - G^0_{\text{Bildung denaturiert}} \quad (4)$$

mit  $\Delta G^0 < 0$ .

Die Stabilität des Proteins lässt sich mit folgender Gleichung ermitteln:

$$\Delta G^0 = -RT \ln(K_{eq}) = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (5)$$

Die Differenz in der Gibbs'schen Energie des nativen und denaturierten Zustandes von Proteinen besitzt einen kleinen Wert, d.h. die Stabilität eines Proteins setzt sich aus vielen einzelnen stabilisierenden Teilbeiträgen zusammen. Man erhält für HSA eine Gibbs'sche Energie von  $-20.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Krishnakumar und Panda 2002). Weitere Proteine bewegen sich in einem Bereich von  $-10$  bis  $40 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Pace et al. 2004). Man sollte hier beachten, dass sich die Gibbs-Energie aus Beiträgen der Enthalpie und Entropie zusammensetzt. Das bedeutet, dass sich die Energiebeiträge aus vielen stabilisierenden und destabilisierenden Kräften zusammensetzen. Ein denaturiertes Protein besitzt eine höhere Entropie als ein natives Protein, welches sich in seiner entfalteten Form durch freie Drehbarkeit der Winkel in den Seitenketten und einen freien Zugang des hydrophoben Protein-Inneren auszeichnet (Doig und Sternberg 1995). Dennoch ist die native Proteinstruktur die stabilste, da diese Strukturform sich durch einen Gewinn an Enthalpie auszeichnet (Dill 1990).

Das Protein in seiner nativen Form wird durch verschiedene nicht-kovalente Wechselwirkungen stabilisiert. Ein Protein faltet sich in wässriger Lösung so, dass sich die hydrophoben Seitenketten im Inneren befinden. Die hydrophoben Seitenketten interagieren dann durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen miteinander. Eine weitere Stabilisierungsmöglichkeit bieten Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Kräfte. Disulfidbindungen stabilisieren die native Form ebenfalls. Zwar wird durch die Ausbildung von Disulfidbindungen die freie Drehbarkeit eingeschränkt und damit die Entropie verringert, im Gegenzug nähert sich die enthalpische Stabilität durch eine weitere Form der Wechselwirkung (David et al. 2008). Durch Veränderung der äußeren Bedingungen lassen sich Proteine wieder entfalten, d.h. denaturieren. Eine Denaturierung des Proteins kann stattfinden bei einer pH-, (Dockal et al. 2000) Temperatur- oder Druckänderung (El Kadi et al. 2006), durch das Lösungsmittel oder Variation der Salzkonzentration oder Zugabe von denaturierenden Detergenzien (Ramprakash et al. 2008). Denaturierende Detergenzien sind z.B. Harnstoff (González-Jiménez und Cortijo 2002; Tanford 1964) und Guanidiniumhydrochlorid (Togashi et al. 2009). Diese können an das Protein binden und die Struktur verändern, so dass z.B. hydrophobe Seitenketten nicht mehr im Inneren des Proteins liegen. Auch eine Abhängigkeit der Proteinstabilität vom pH-Wert ist bereits in der Literatur

an vielen Proteinen, wie z.B. dem Humanen Serum-Albumin, untersucht worden (Dockal et al. 2000). Ursächlich für die Destabilisierung ist die Veränderung der Ladung der Aminosäuren durch den pH-Wechsel (Stigter et al. 1991), die als Zwitterionen interagieren. Des Weiteren können Änderungen der Temperatur und des Druckes die Stabilität von Proteinen beeinflussen. Nach der Gibbs'schen Fundamental-Gleichung gilt für die Änderung der Freien Enthalpie als Funktion von Druck und Temperatur:

$$dG = Vdp - SdT \quad (6)$$

Das bedeutet, dass  $dG$  temperatur- und druckabhängig ist. Für diese Abhängigkeiten gilt:

$$\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_p = -S \quad \text{und} \quad \left(\frac{\partial G}{\partial p}\right)_T = V \quad (7)$$

Für die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante, die wesentlich relevanter als die Druckabhängigkeit ist, da sie auf die Proteinstruktur keinen so großen Einfluss zeigt, gilt:

$$\frac{\partial \ln K_{eq}}{\partial T} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad (8)$$

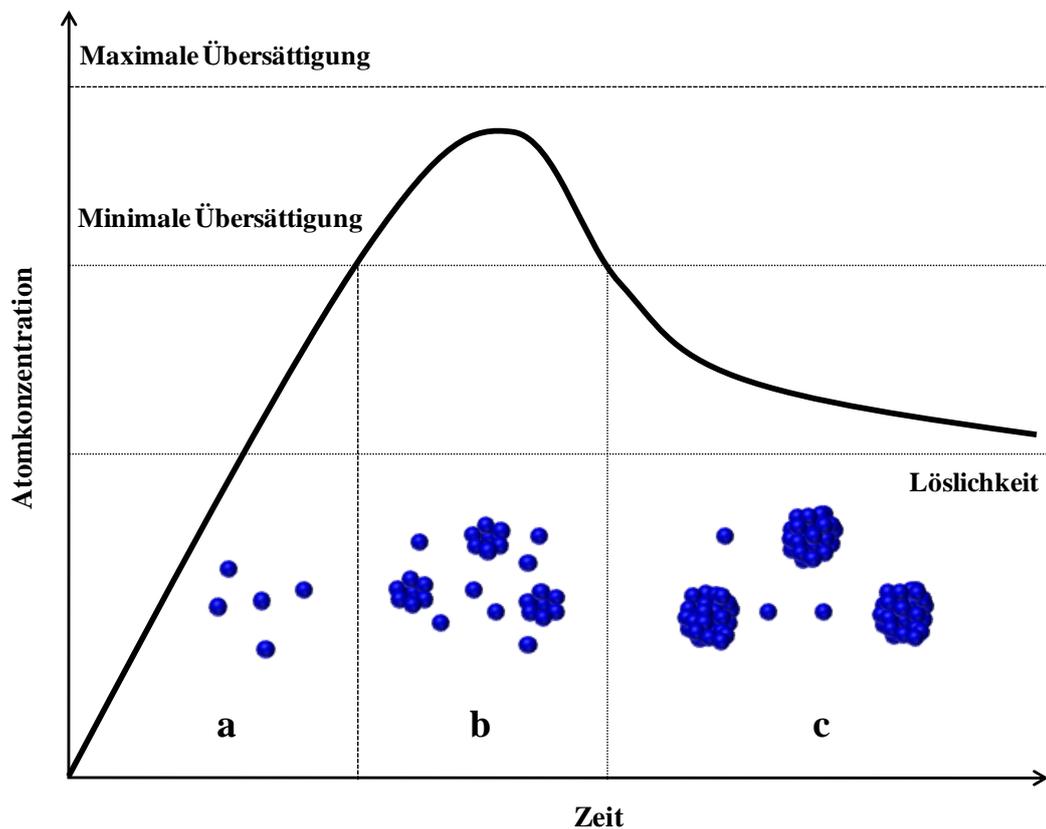
$$\text{oder} \quad \frac{\partial \ln K_{eq}}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H^0}{R} \quad (9)$$

Die native und denaturierte Form des Proteins haben eine unterschiedliche Wärmekapazität was sich zunächst auf die Temperaturabhängigkeit von  $\Delta H^0$  auswirkt. Die Faltung und Entfaltung von Proteinen verläuft über stabile Zwischenzustände, die als „molten globule“ bezeichnet werden (Arai und Kuwajima 2000). In diesem Zustand ist die Sekundärstruktur des Proteins vorhanden. Das Protein besitzt aber nicht die charakteristische Tertiärstruktur, da die Seitenketten sich in Regel in einer anderen, dichter gepackten Konformation befinden (Arai und Kuwajima 2000; Kuwajima 1996; Ptitsyn 1995).

## 2.2. Nanopartikel

### 2.2.1. Synthese, Stabilität und Eigenschaften von Nanopartikeln

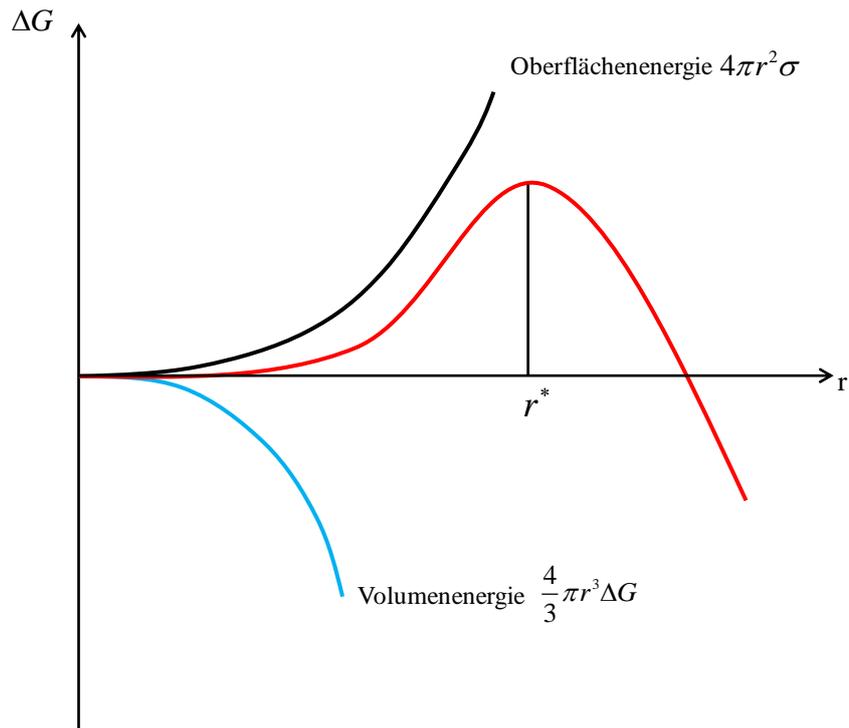
Als Nanopartikel bezeichnet man Teilchen, die in mindestens einer Raumrichtung eine Ausdehnung von weniger als 100 nm besitzen (Fahlman 2007). Eine Möglichkeit, metallische Nanopartikel zu synthetisieren, ist die Reduktion von entsprechenden Metallsalzen oder die Zersetzung einer Vorstufenverbindung. *LaMer et al.* haben die Nanopartikel-Synthese in drei Phasen unterteilt und für den Fall der Zersetzung von Vorstufenverbindungen beschrieben (Xia et al. 2009; LaMer und Dinegar 1950). Diese drei Phasen der Synthese sind in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11:** Darstellung der drei Phasen in der Nanopartikelbildung, *a*: Bildung von Atomen, *b*: Nukleation, *c*: Wachstum der Kristallkeime zu Nanopartikeln (nach *LaMer und Dinegar*) (Xia et al. 2009; LaMer und Dinegar 1950)

Der erste Schritt ist durch eine Bildung von Atomen gekennzeichnet, die durch die Zersetzung oder Reduktion einer Vorstufenverbindung entstehen. Das beinhaltet ein stetiges Wachstum der Atomkonzentration in der Lösung. Zunächst sind die Atome in der Lösung gut löslich. Ab einer bestimmten Atom-Konzentration wird ein Übersättigungspunkt erreicht (*Abschnitt a*). Bei dieser Konzentration ist die Lösung übersättigt und es beginnt die homogene Nukleation, da es für die übersättigte Lösung energetisch günstiger ist, eine zweite Phase auszubilden. Allerdings muss gesagt werden, dass es sich um eine schematische Darstellung handelt, da die Nukleation immer einen statistischen Prozess beinhaltet. Im weiteren Verlauf wachsen die Nukleationskeime durch weitere Anlagerung von Atomen weiter an. Ab diesem Zeitpunkt ist die spätere Form des Nanopartikels definiert, welches einkristallin, einfach oder mehrfach verzwilligt vorliegen kann (Xia et al. 2009). Das Kristallwachstum hat eine Abnahme der Atomkonzentration zur Folge (*Abschnitt b*). Unter der minimalen Übersättigung sinkt die Rate der Bildung weiterer Atome und damit der Nukleationskeime stark ab. Die Kristallkeime können dann durch weitere Anlagerung von Atomen zu Nanopartikeln wachsen. Die Folge ist eine Abnahme der Atomkonzentration durch Anlagerung weiterer Atome an die Nanokristall-Oberfläche. Das Wachstum der Nanopartikel wird gestoppt, wenn sich eine Gleichgewichtskonzentration zwischen den Atomen der Nanopartikel-Oberfläche und den Atomen in der Lösung ausgebildet hat (*Abschnitt c*).

Treibende Kraft für das Nanokristallwachstum ist die Änderung der Freien Energie in Abhängigkeit des Radius. Bis zu einem kritischen Radius ( $r^*$ ) nimmt die Gesamtenergie, welche sich aus der Volumen- und Oberflächenenergie des Nanopartikels zusammensetzt, zu. Demnach lösen sich kleinere Nanopartikel zugunsten größerer Nanopartikel wieder auf. Dieses Phänomen wird als Ostwald-Reifung bezeichnet (Roosen und Carter 1998). Wenn der kritische Radius ( $r^*$ ) erreicht wird, nimmt die Gesamtenergie mit wachsendem Radius wieder ab, so dass die Ausbildung eines stabilen Nanopartikelkristalls begünstigt wird. Der Zusammenhang ist in Abbildung 12 wiedergegeben.



**Abbildung 12:** Änderung der freien Energie in Abhängigkeit des Nanopartikelradius (Mullin 2001)

Für die Änderung der Gibbs'schen Energie gilt:

$$dG = \gamma d\sigma \quad (10)$$

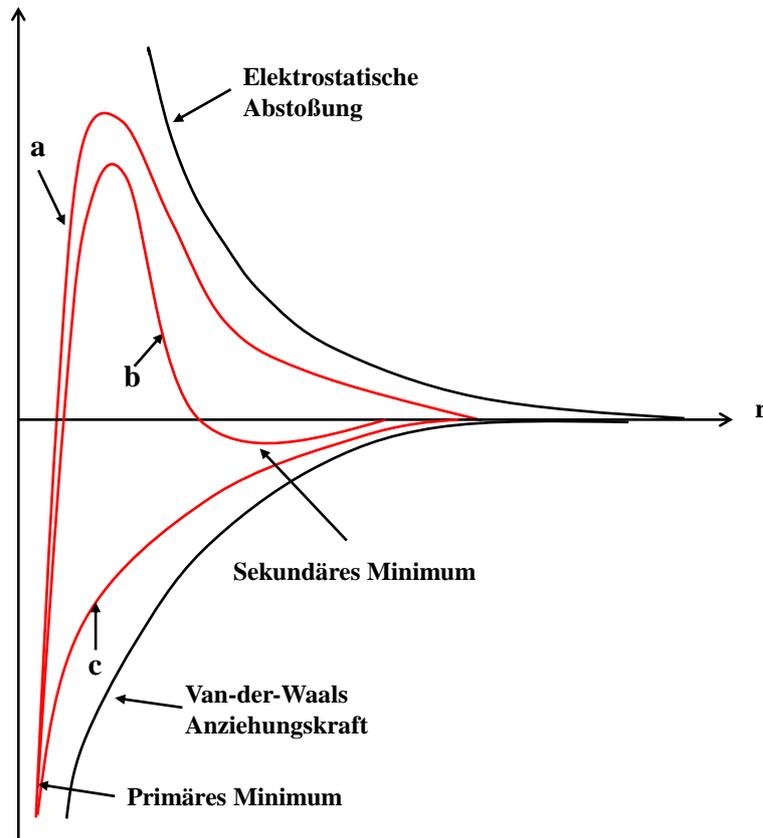
wobei  $dG$  als die Änderung der Gibbs'schen Energie in Abhängigkeit von  $d\sigma$  der Änderung der Oberfläche zu verstehen ist. Unter diesen Bedingungen bildet sie die thermodynamisch günstigste Form aus. Man spricht davon, dass die Synthese dann thermodynamisch kontrolliert abläuft. Eine kinetisch kontrolliert ablaufende Synthese ist ebenfalls möglich, welche durch den Einbau von Stapelfehlern in den Kristallkeimen zu anderen Nanopartikelformen führen kann. Experimentell kann dieses durch sehr schwache Reduktionsmittel erreicht werden (Xia et al. 2009).

Um eine Agglomeration zu verhindern, müssen Nanopartikel in einer Dispersion stabilisiert werden. Nanopartikel können entweder sterisch, elektrostatisch oder elektrosterisch stabilisiert werden (Böhnlein-Mauß et al. 1992). Bei der elektrostatischen Stabilisierung befinden sich Ionen oder geladene Moleküle wie z.B. Citrat, Thiole oder Phosphane auf der

Oberfläche. Die Oberflächenladung des Nanopartikels wird dann durch geladene Gegenionen kompensiert, indem sich eine diffuse Ionenschicht ausbildet. In der Nähe der Nanopartikel-Oberfläche ist die Konzentration der Gegenionen am höchsten und nimmt mit dem Abstand zur Oberfläche exponentiell ab. Eine Agglomeration wird dann entsprechend durch die gegenseitige Abstoßung von Teilchen gleicher Ladung verhindert. Eine zweite Möglichkeit eine Agglomeration zu verhindern, ist die Ummantelung des Nanopartikels mit einem Makromolekül. Dabei kann es sich entweder um ein Polymer z.B. PVP oder um Proteine handeln (Gebauer et al. 2012; Niemeyer 2001). Es handelt sich hierbei um eine sterische Stabilisierung. Die dritte Möglichkeit ist eine elektrosterische Stabilisierung, bei der eine sterische Abschirmung mit gleichzeitig geladenen Molekülen erfolgt.

Die Stabilität von Nanopartikeln lässt sich anhand der Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek-Theorie (DLVO-Theorie) beschreiben, welche besagt, dass die Stabilität aus der Summe von attraktiven Kräften (Van-der-Waals-Wechselwirkungen) und repulsiven Kräften (elektrostatische Kräfte) resultiert. Die Gesamtwechselwirkung zwischen zwei Nanopartikeln muss repulsiv sein, damit diese in einer Dispersion stabil bleiben. Bei Nanopartikel-Oberflächen, die sich entweder aufgrund von elektrischen Ladungen oder der Abwesenheit einer Oberflächenfunktionalisierung anziehen, ist die Energiebarriere durch die Abwesenheit von repulsiven Kräften nicht gegeben. Die Folge ist eine sofortige Agglomeration der Nanopartikel. Bei einer kinetischen Stabilisierung sind die Nanopartikel in der Lösung stabil. Es erfolgt eine Agglomeration am sekundären Minimum. Diese ist allerdings reversibel.

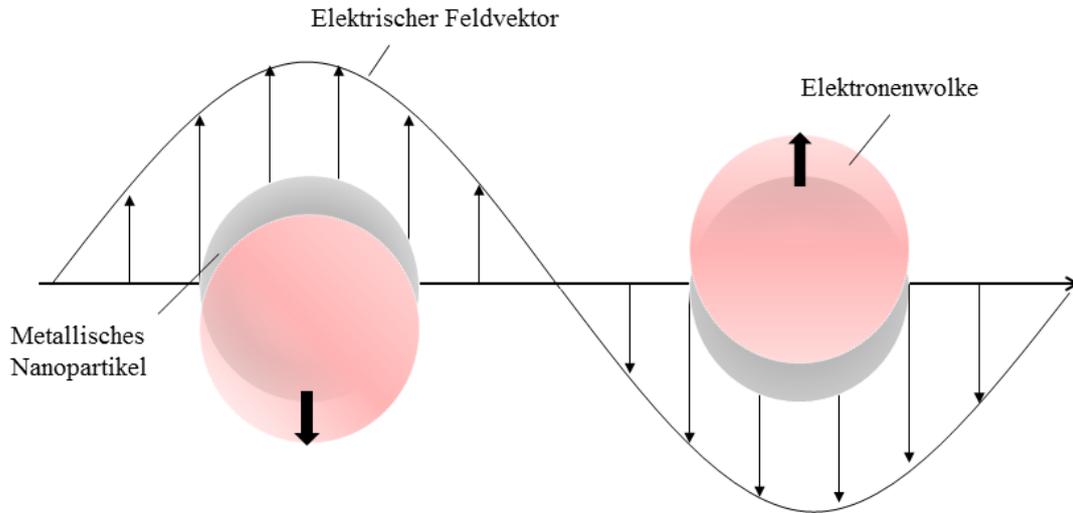
Der Potentialverlauf zwischen zwei Nanopartikeln im Abstand  $r$  zueinander wird im nachfolgenden grafisch dargestellt (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Potentialverlauf von zwei Nanopartikeln im Abstand  $r$  zueinander: Darstellung der Gesamtwechselwirkung für drei Fälle, **a:** Kolloide sind stabil, **b:** Kolloide sind kinetisch stabil, reversible Agglomeration am sekundären Minimum, **c:** Kolloide agglomerieren sofort (*nach Israelachvili*) (Israelachvili 1991)

Metallische Nanopartikel zeichnen sich durch ihre besonderen optischen Eigenschaften aus. Gold- und Silber-Nanopartikel haben bei einem definierten Durchmesser eine charakteristische Farbe.

Wenn metallische Nanopartikel mit einer elektromagnetischen Welle wechselwirken, erfolgt die Anregung der Elektronen im Leitungsband zu kollektiven Schwingungen. Dabei kommt es zu einer Ladungsverschiebung der Elektronenwolke, so dass diese räumlich vom positiv geladenen Atomrumpf getrennt ist und es zu einer Polarisierung des Nanopartikels kommt. Diese Schwingung des Elektronengases wird als Plasmonenresonanz bezeichnet. Im Folgenden wird der Vorgang schematisch dargestellt (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Schematische Darstellung der Plasmonen-Oszillation: Verschiebung der Elektronenwolke von metallischen Nanopartikeln während der Wechselwirkung mit einer elektromagnetischen Welle (Kelly et al. 2003)

### 2.2.2. Verwendung von Nanopartikeln

Die Eigenschaften von Nanopartikeln resultieren unter anderen aus der stark vergrößerten Gesamtoberfläche und bringen damit eine höhere Reaktivität mit sich. Deshalb finden Nanopartikel als Katalysatoren Anwendung (Graeser et al. 2007; Nel et al. 2006; Campbell et al. 2002). Magnetische Nanoteilchen finden eine Anwendung in der Nanoelektronik, in dem sie für Computerchips und Festplatten verwendet werden (Murray et al. 2001; Sun et al. 2000). Nanopartikel findet man aber heutzutage auch in Lebensmitteln (BUND 2008), Verpackungen und Kosmetika, wie z.B. als Liposomen in Cremes, Zahnpasta (Salata 2004) oder Titandioxid-Nanopartikel als UV-Absorber in Sonnenschutzcremes (Schnittger und Sinha 2007). Auch im Bereich der Nanomedizin wird intensiv geforscht. So gibt es bereits viele Applikationen, die zurzeit noch erforscht oder bereits angewendet werden. Ein Anwendungsbereich ist z.B. die Verwendung von Nanopartikeln als Biosensoren (Yin et al. 2013; Medintz et al. 2003) und als Wirkstoff-Transporter (Hao et al. 2010; Salata 2004). So lassen sich mit Hilfe von Nanopartikeln Wirkstoffe aufgrund von unterschiedlich großen Zellzwischenräumen in Tumorgewebe oder durch spezifische Anbindung von Proteinen in Gewebe anreichern. Auch eine Wirkstoffabgabe durch Nanopartikel direkt in Lunge, wird erforscht (Beck-Broichsitter et al. 2011). Vorteile der Verwendung von Nanopartikeln als Wirkstoff-Transporter sind die Verringerung von Nebenwirkungen und die bessere Überwindung von biologischen Barrieren z.B. der Blut-Hirnschranke und der Luft-

Blutsschranke. Weitere Anwendungsbereiche von Nanopartikeln in der Medizin sind Silber-Nanopartikel aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung (Dastjerdi und Montazer 2010), Eisen-Nanopartikel für die Magnetflüssigkeits-Therapie, in der Nanopartikel gezielt in Tumorgewebe gespritzt werden. Mit Hilfe von erzeugter Hitze durch ein externes Magnetfeld können Tumorzellen zerstört werden (Power et al. 2011; Tomitaka et al. 2009; Yoshida und Kobayashi 1999). Ein weiteres sehr zukunftsweisendes Gebiet in der Nanomedizin ist die *in vivo* und *in vitro* Diagnostik. So lassen sich in der molekularen Diagnostik Nanopartikel verwenden, die als Kontrastmittel oder Tumormarker dienen, die bessere optische Eigenschaften besitzen als z.B. organische Farbstoffe (Anker et al. 2008). Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Verwendung von Nanopartikeln in Biomaterialien, wie z.B. Knochen (Tautzenberger et al. 2012).

Eine Änderung der Eigenschaften von Nanopartikeln bezüglich ihrer Hydrophobizität, des Zeta-Potentials oder des Verhalten in biologischen Medien kann durch Oberflächenmodifizierungen realisiert werden (Kostarelos et al. 2009; Ghosh et al. 2008; Nel et al. 2006; Des Rieux et al. 2006; Galindo-Rodriguez et al. 2005). Insbesondere Polymer-funktionalisierte Nanopartikel sind für medizinische Anwendungen z.B. den Impf- und Wirkstofftransport in biologischen Medien von großem Interesse (Yang und Alexandridis 2000). Des Weiteren können Polymer-Nanopartikel aus pegylierten n-Hexadecylcyanoacrylat Nanopartikel die Blut-Hirn-Schranke überwinden und eine Wirkstoffabgabe in verschiedenen Hirnarenale abgeben, ohne diese zu schädigen (Harris und Chess 2003; Harris et al. 2001). Für den Transport von Antihypertensiva, Antikörpern, Antitumormedikamenten, Enzymen und Proteinen finden Poly(epsilon-caprolactone) (PCL), Poly(D,L-lactid) (PLA) und Poly(D,L-lactid-co-glycolid) (PLAGA) eine breite Anwendung (Leroueil-Le Verger et al. 1998). Trotz Polymerfunktionalisierung kann dennoch die Funktion des Kerns, z.B. einer Freisetzung von Wirkstoffen, Silber Ionen, gewährleistet bzw. nicht verhindert werden (Kittler et al. 2010; Greulich et al. 2009).

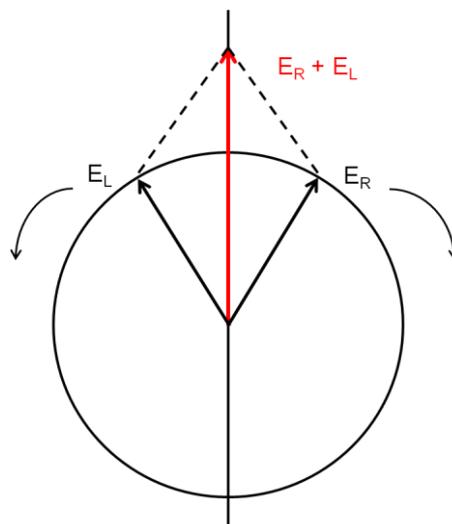
## 2.3. Spektroskopie

### 2.3.1. Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Die Circulardichroismus-Spektroskopie ist eine Methode, in der die Wechselwirkung einer optisch aktiven Probe, wie z.B. einem Protein in Lösung, mit circular polarisiertem Licht untersucht wird. Dabei wird als Messgröße die Elliptizität, welche durch die Asymmetrie des Moleküls entsteht, detektiert. Diese Methode ist eine ideale Technik, um Nanopartikel-Protein-Interaktionen zu studieren, da diese weitestgehend unabhängig vom Nanopartikel ist (Treuel und Malissek 2013; Treuel et al. 2010). So wurden im Rahmen dieser Arbeit mit dieser Methode Proteinstrukturen in Gegenwart von Nanopartikeln bestimmt und quantifiziert. Eine qualitative Aussage zu Strukturänderungen von Proteinen in Gegenwart von Nanopartikeln wurde bereits in der Literatur beschrieben (Wu und Narsimhan 2008; Bayraktar et al. 2008).

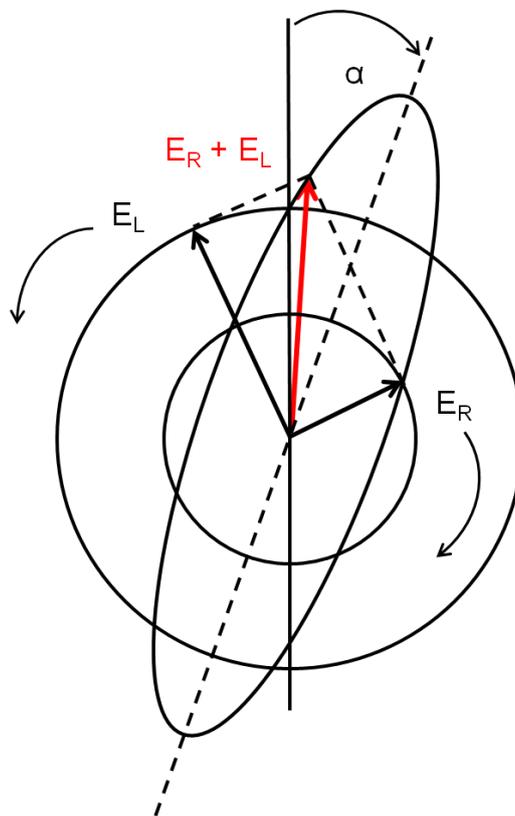
#### 2.3.1.1. Circular polarisiertes Licht

Linear polarisiertes Licht besteht aus zwei circular polarisierten Komponenten mit gleicher Amplitude und gleicher Phase. In jeder circular polarisierten Komponente rotiert der elektrische Feldvektor  $\vec{E}$  um die Ausbreitungsrichtung der elektromagnetischen Welle. Dieser Vorgang ist in Abbildung 15 grafisch dargestellt.



**Abbildung 15:** Grafische Darstellung der elektrischen Feldvektoren von linear polarisiertem Licht, die elektrischen Feldvektoren rotieren in entgegengesetzter Richtung auf einem Kreis, der resultierende elektrische Feldvektor (*rot*) führt zu linear polarisiertem Licht

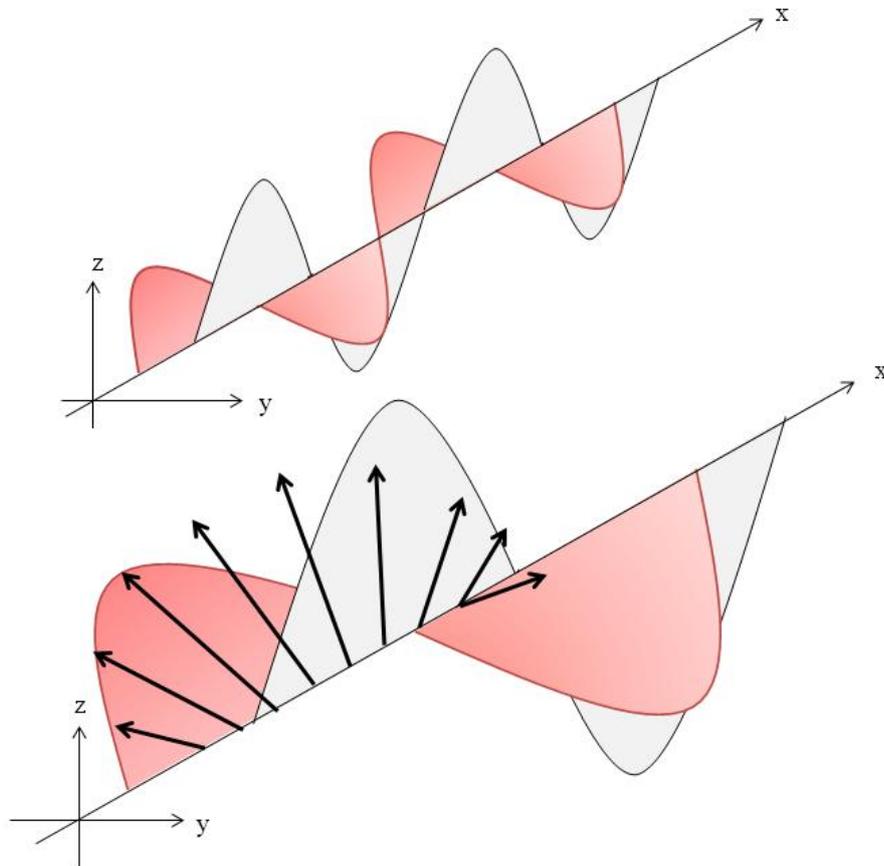
Circular polarisiertes Licht entsteht durch Überlagerung von zwei senkrecht zueinander stehenden, linear polarisierten Lichtwellen, die die gleiche Amplitude haben, aber um  $90^\circ$  phasenverschoben sind. Der resultierende elektrische Feldvektor beschreibt dann eine schraubenförmige Drehung um die z-Achse. Als links circular polarisiertes Licht wird die elektromagnetische Lichtwelle bezeichnet, wenn sich der elektrische Feldvektor in Ausbreitungsrichtung der elektromagnetischen Welle gegen den Uhrzeigersinn dreht (Blick in Richtung der Ausbreitungsrichtung der elektromagnetischen Welle). Von rechts circular polarisiertem Licht spricht man bei einer Drehung mit dem Uhrzeigersinn. Der Circular dichroismus resultiert dann aus der unterschiedlichen Absorption von rechts und links circular polarisiertem Licht. Bei Überlagerung von zwei Teilwellen unterschiedlicher Amplitude entsteht elliptisch polarisiertes Licht (Reider 2005).



**Abbildung 16:** Darstellung der elektrischen Feldvektoren von linear polarisierten elektromagnetischen Wellen unterschiedlicher Amplitude. Das Resultat ist elliptisch polarisiertes Licht (*rot*), welches aus rechts- und links-circular polarisiertem Licht ungleicher Intensität entsteht (Purdie und Brittain 1994; Snatzke 1994)

Die obere Grafik in Abbildung 17 zeigt zwei linear polarisierte elektromagnetische Wellen, welche sich in x-Richtung ausbreiten. Die untere Grafik zeigt die resultierende circular

polarisierte elektromagnetische Welle die durch die Additionen der beiden linearen Wellen erhalten wird.



**Abbildung 17:** Grafische Darstellung der elektrischen Feldvektoren von zwei linear-polarisierten elektromagnetischen Wellen (*oben*) und linear-polarisierten elektromagnetischen Wellen gleicher Amplitude aber verschiedener Phase (*unten*). Die Pfeile zeigen den elektrischen Feldvektor der resultierenden circular polarisierten elektromagnetischen Welle

Mathematisch lässt sich der elektrische Feldvektor einer sich ausbreitenden linear polarisierten elektromagnetischen Welle durch folgenden Ausdruck beschreiben.

$$\vec{E}_y = E_0 \cdot \vec{e}_y \cdot \cos \omega \left( t - \frac{nx}{c_0} \right) \quad (11)$$

Entsprechend gilt dann für den elektrischen Feldvektor einer circular polarisierten elektromagnetischen Welle:

$$\vec{E}_R = E_0 \left[ \vec{e}_y \cdot \cos \omega \left( t - \frac{nx}{c_0} \right) + \vec{e}_z \cdot \sin \omega \left( t - \frac{nx}{c_0} \right) \right] \quad (12)$$

$\vec{E}_R$  = Elektrischer Feldvektor

$\vec{e}$  = Einheitsvektor

$\omega$  = Winkelgeschwindigkeit [ $\text{rad s}^{-1}$ ]

$t$  = Ausbreitungsgeschwindigkeit [ $\text{m s}^{-1}$ ]

$c_0$  = Lichtgeschwindigkeit [ $\text{m s}^{-1}$ ]

$n$  = Brechungsindex

$x$  = Weglänge [ $\text{m}$ ]

### 2.3.1.2. CD-Spektroskopie von Proteinen

Die Absorption von unpolarisiertem Licht durch ein Medium wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben:

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (13)$$

$l$  = Weglänge des Lichtes durch das Medium [ $\text{cm}$ ]

$c$  = Konzentration [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

$I_0$  = Intensität des einfallenden Lichtes

$I$  = Intensität des Lichtes nach Durchgang durch das Medium

Dieses Gesetz gilt auch für circular polarisiertes Licht. Es lassen sich die molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_R$  und  $\varepsilon_L$  für rechts- und links- circular polarisiertes Licht ableiten. Für den Unterschied in den molaren Extinktionskoeffizienten von rechts- und links- circular polarisiertem Licht gilt dann:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = (A_R - A_L) / c l \quad (14)$$

wobei  $A_L$  bzw.  $A_R$  die entsprechenden Absorptionsgrade  $\left( A = \log \frac{I}{I_0} \right)$  sind.

Der molare Extinktionskoeffizient für unpolarisiertes Licht ist dann der Mittelwert aus links- und rechts- circular polarisiertem Licht.

$$\mathcal{E} = \frac{(\varepsilon_L + \varepsilon_R)}{2} \quad (15)$$

wobei der Zahlenwert von  $\Delta\varepsilon$  immer sehr klein im Verhältnis zu  $\varepsilon_L$  und  $\varepsilon_R$  ist. Das Verhältnis wird mit folgender Gleichung beschrieben:

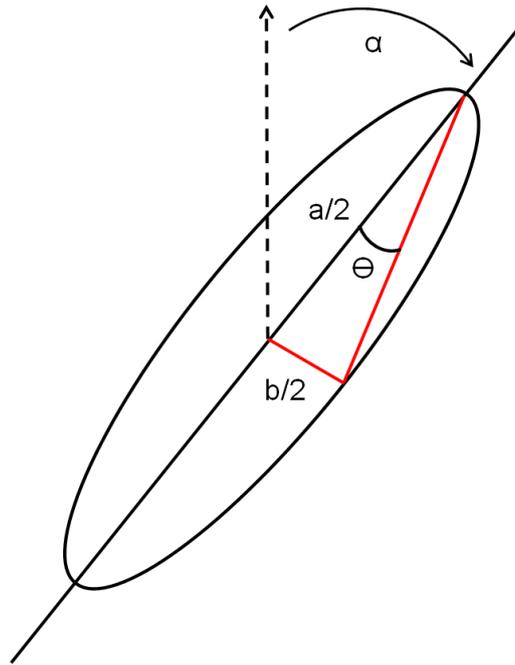
$$g = \frac{\Delta\varepsilon}{\varepsilon} = \frac{2(\varepsilon_L - \varepsilon_R)}{(\varepsilon_L + \varepsilon_R)} \quad (16)$$

Dieser Wert  $g$  wird als Anisotropiefaktor bezeichnet und nimmt selten höhere Zahlenwerte als  $10^{-2}$  an. In der Regel beträgt  $g \approx 10^{-4}$ , wobei in der CD-Spektroskopie das  $\Delta\varepsilon$  das Mess-Signal darstellt und  $\varepsilon$  sich in Rauschen des Mess-Signals zeigt. Alle kommerziellen CD-Spektrometer messen die unterschiedliche Absorption von rechts- und links- circular polarisiertem Licht.

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (17)$$

Das Mess-Signal wird üblicherweise in die Elliptizität  $\Theta$  umgerechnet. In Abbildung 18 wird die Definition der Elliptizität grafisch veranschaulicht.

Die Hauptschwingungsachsen (a, b) des einfallenden Lichtes werden um einen Winkel  $\alpha$  gedreht. Als Elliptizität wird dann der Winkel, dessen Tangens  $\theta$  gleich dem Quotienten aus der kleinen Halbachse b und der großen Halbachse a ist, definiert.



**Abbildung 18:** Definition der Elliptizität: Als Elliptizität wird der Winkel  $\theta$  bezeichnet, welcher aus dem Tangens der beiden Ellipsenachsen (*rot*)  $a$  und  $b$  resultiert,  $\alpha$  bezeichnet die optische Rotationsdispersion (ORD) und beschreibt den spezifischen Drehwert (Snatzke 1994)

Für sehr kleine Winkeländerungen gilt dann:

$$\begin{aligned} \theta(\text{rad}) &\approx \tan \theta = \frac{(|E_L| - |E_R|)}{(|E_L| + |E_R|)} \\ &= \frac{\left[ \exp\left(-\frac{A_L}{2}\right) - \exp\left(-\frac{A_R}{2}\right) \right]}{\left[ \exp\left(-\frac{A_L}{2}\right) \exp\left(-\frac{A_R}{2}\right) \right]} \end{aligned} \quad (18)$$

Durch eine Umrechnung vom Bogen- ins Gradmaß erhält man dann folgenden Zusammenhang:

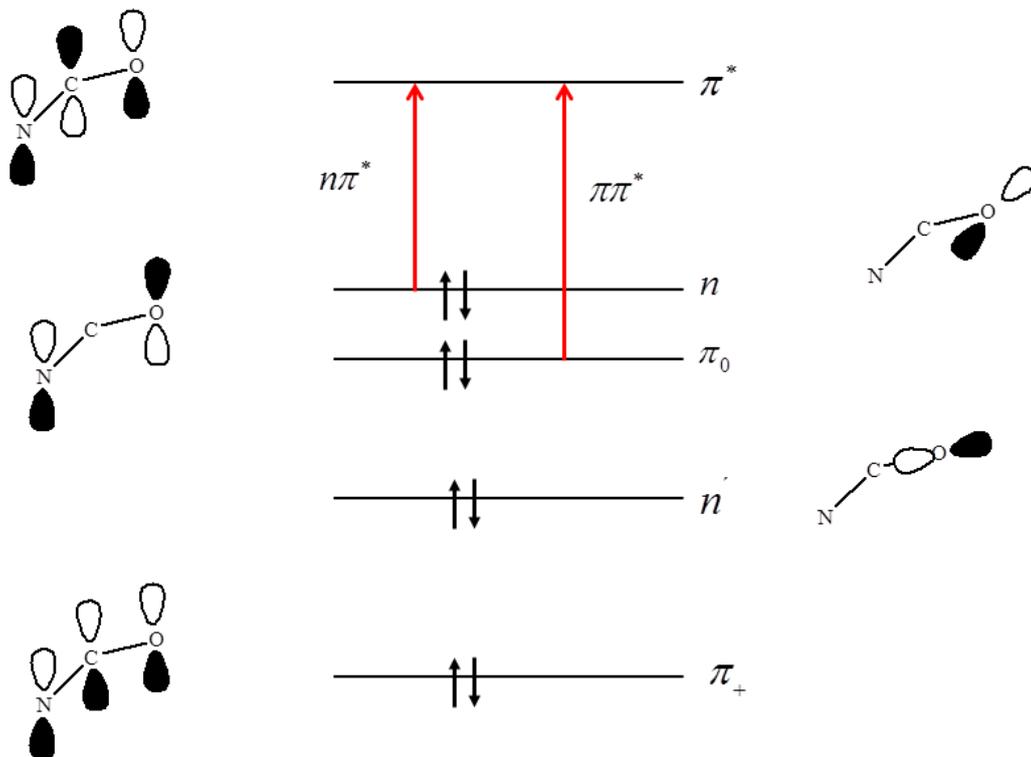
$$\Theta = \left[ 180 \cdot \frac{\ln 10}{4\pi} \right] \cdot \Delta A = 32.98 \cdot \Delta A \quad (19)$$

Um die Abhängigkeit des Mess-Signals von der Konzentration  $c$  der Probe und der Weglänge  $l$  auszurechnen, ist es üblich, die molare Elliptizität anzugeben:

$$[\Theta] = \frac{100 \cdot \Theta}{l \cdot c} \quad (20)$$

Ursächlich für das CD-Signal sind elektronische Übergänge in der Amidbindung zwischen zwei Aminosäuren. Die Peptidbindung ist durch ein großes Übergangsdipolmoment ausgezeichnet. Dabei erhält man für die unterschiedlichen Sekundärstrukturanteile verschiedene Signale, die jeweils von der elektronischen Umgebung abhängen (Johnson 1988).

Die Molekülorbitale der Amidbindung und die möglichen elektronischen Übergänge während der Interaktion der Amidbindung mit einer elektromagnetischen Welle sind in nachfolgender Abbildung dargestellt.

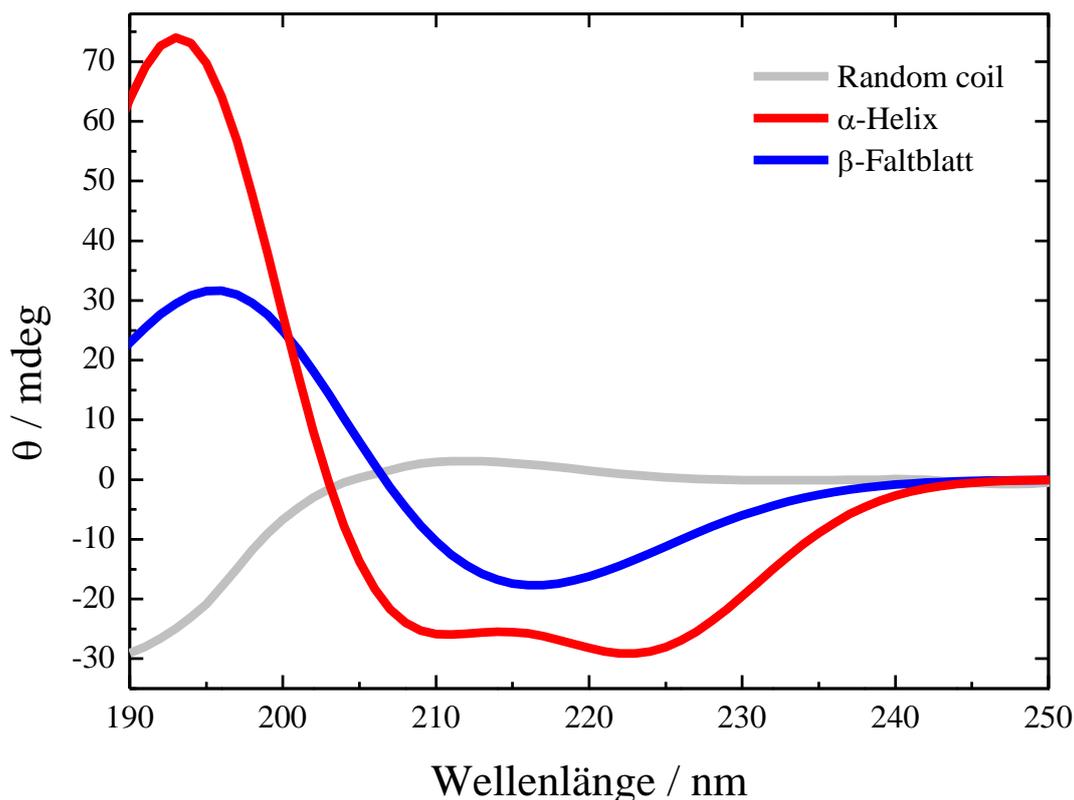


**Abbildung 19:** Darstellung der Molekülorbitale und elektronischen Übergänge der Amidbindung des Proteins (entnommen aus Fasman) (Fasman 1996)

Aus den drei p-Orbitalen der Amidgruppe entstehen durch Kombination drei  $\pi$ -Molekülorbitale, wobei eines bindend ( $\pi_+$ ), eines nichtbindend ( $\pi_0$ ) und das dritte antibindend ist ( $\pi^*$ ). Des Weiteren besitzt der Sauerstoff in der Amidgruppe zwei freie Elektronenpaare. Aus den freien Elektronenpaaren des Sauerstoffatoms resultiert ein  $n \rightarrow \pi^*$  Übergang, der aus dem großen Übergangsdipolmoment resultiert. Zwei der  $\pi$ -Elektronen können einen  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergang durchführen.

In der Circular dichroismus-Spektroskopie von Proteinen gibt es zwei relevante Spektralbereiche. Im fernen UV-Bereich können im Wellenlängenbereich von 260–180 nm Sekundärstrukturen ermittelt werden. Aussagen über die aromatischen Aminosäuren, Disulfidbindungen oder eine korrekte Faltung des Proteins, also der Tertiärstruktur, erhält man aus dem Spektrum des nahen UV Bereichs. Dieser erstreckt sich in einem Wellenlängenbereich von 320 bis 260 nm.

Abbildung 20 zeigt die CD-Spektren der drei häufigsten Sekundärstrukturen.



**Abbildung 20:** CD-Spektren der verschiedenen Sekundärstrukturen eines Proteins,  $\alpha$ -Helix: zwei Minima bei 208 nm und 222 nm, Maximum bei 196 nm,  $\beta$ -Faltblatt: Minimum bei  $217 \pm 3$  nm, Maximum bei 198 nm, Random Coil: Minimum bei  $195 \pm 5$  nm, Maximum bei 210 nm

Das CD-Spektrum einer  $\alpha$ -Helix besitzt zwei Minima bei 208 nm und 222 nm. Das Maximum liegt bei 196 nm (Fasman 1996). Das Minimum bei 222 nm folgt aus einem  $n \rightarrow \pi^*$  Übergang (Woody und Tinoco 1967). Das Minimum bei 208 nm und Maximum bei 196 nm resultiert aus einem  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergang (Moffitt 1956). Das  $\beta$ -Faltblatt hat im CD-Spektrum ein Minimum bei  $217 \pm 3$  nm, wobei das exakte Minimum vom Anteil an parallelem und antiparallelem Faltblatt abhängig ist (Woody 1969). Dieses Minimum resultiert aus einem  $n \rightarrow \pi^*$  Übergang. Das Maximum liegt bei 198 nm, dessen Ursprung ein  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergang ist (Woody 1969). Beim Random Coil liegt das Minimum bei  $195 \pm 5$  nm und das Maximum bei etwa 210 nm (Johnson 1988).

Für die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit dem Protein muss die Energie der Strahlung der Differenz des angeregten- und des Grundzustandes entsprechen. Es gilt:

$$E = h \cdot \nu = E'' - E' \quad (21)$$

$E'$  = Energie des Grundzustandes

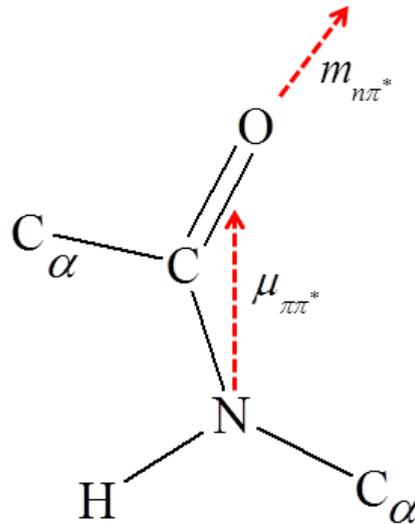
$E''$  = Energie des angeregten Zustandes

Eine Voraussetzung für einen elektronischen Übergang ist eine Änderung des magnetischen oder elektrischen Dipolmoments im Molekül. Daraus resultiert ein von Null verschiedenes Übergangsdipolmoment:

$$\mu_{01} \neq 0 \quad (22)$$

Bei Peptiden handelt es sich um asymmetrische Moleküle mit einem großen Dipolmoment, weshalb sich die Struktur von Proteinen durch die CD-Spektroskopie untersuchen lässt.

Abbildung 21 veranschaulicht das elektrische Dipolmoment des Amid  $\pi\pi^*$ -Übergangs und das magnetische Dipolmoment des Amid  $n\pi^*$ -Überganges.



**Abbildung 21:** Elektrisches Dipolmoment des Amid  $\pi\pi^*$ -Übergangs ( $\mu_{\pi\pi^*}$ ) und magnetisches Dipolmomentes des Amid  $n\pi^*$ -Überganges ( $m_{n\pi^*}$ ) (entnommen aus Fasman) (Fasman 1996)

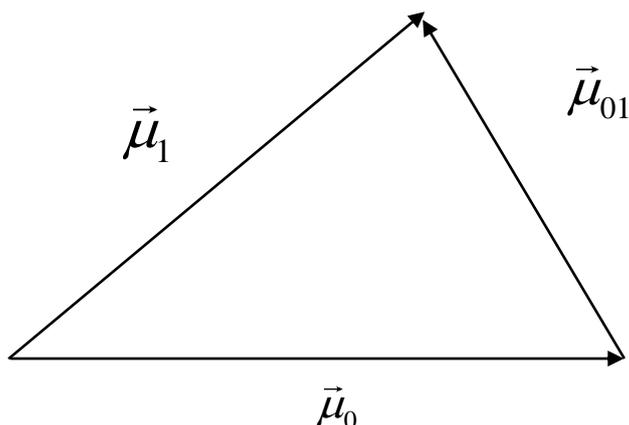
Das Übergangsdipolmoment ist durch folgende Gleichung definiert:

$$\mu_{01} = \langle \psi_0 | \vec{\mu} | \psi_1^* \rangle \quad (23)$$

$\psi_0$  und  $\psi_1^*$  beschreiben die Wellenfunktionen des Grund- und angeregten Zustandes. Das Übergangsdipolmoment lässt sich demnach durch die Differenz dieser beiden diskreten Energiezustände im Molekül beschreiben, welche durch eine Ladungsverschiebung des Elektronenübergangszustandes kommt (Holtzhauer 1996). Das Dipolmoment ergibt sich aus der Summe der Elektronen im Molekül mit einem Abstand  $r_i$  zum Zentrum der positiven Ladung  $e_0$ :

$$\vec{\mu} = -e_0 \cdot \sum \vec{r}_i \quad (24)$$

Eine sehr vereinfachte Darstellung des Übergangsdipolmomentes ist in folgender Abbildung gezeigt.

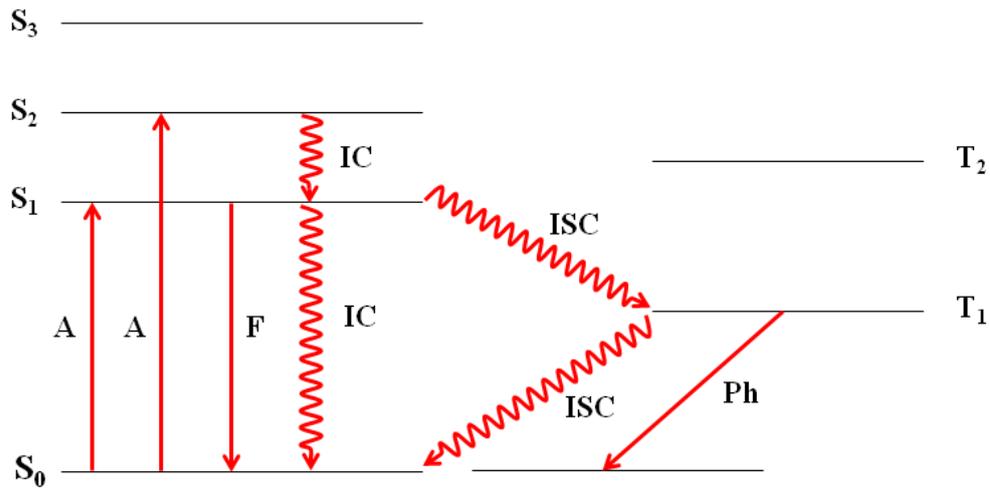


**Abbildung 22:** Grafische Darstellung zwischen den Dipolmomenten des Grundzustandes  $\vec{\mu}_0$  und angeregten Zustandes  $\vec{\mu}_1$  und dem daraus resultierenden Übergangsdipolmoment  $\vec{\mu}_{01}$

### 2.3.2. Fluoreszenzspektroskopie

Durch die Aufnahme von Energie aus elektromagnetischer Strahlung können  $\pi$ -Elektronen in Molekülen von ihrem Grundzustand ( $S_0$ ) in einen angeregten Zustand ( $S_1$ ) überführt werden. Ursächlich dafür ist die Wechselwirkung des oszillierenden elektromagnetischen Feldes mit dem Molekül. Fluoreszenz bezeichnet eine kurzzeitige Emission von Licht, die aus einem Übergang eines elektronisch angeregten ( $S_1$ ) in einen Zustand niedrigerer Energie resultiert. Nach den Auswahlregel  $\Delta S = 0$  für diesen Übergang erfolgt eine Erhaltung des Spins. Die Fluoreszenz-Spektroskopie beruht auf dem Prinzip, dass die von Molekülen absorbierte Energie der elektromagnetischen Strahlung durch Emission von Licht abgegeben wird und sich dadurch Aussagen über die elektronische Umgebung des Moleküls machen lassen. Das Jablonski-Schema, welches die Elektronenübergänge während der Wechselwirkung mit einer elektromagnetischen Welle beschreibt, ist in Abbildung 23 dargestellt.

Durch die Absorption der Energie aus einer elektromagnetischen Welle sind Übergänge vom Grundzustand ( $S_0$ ) in den ersten angeregten ( $S_1$ ) oder zweiten angeregten Zustand ( $S_2$ ) möglich. Fluoreszenz bezeichnet dann den Übergang vom ersten angeregten Zustand zurück in den Grundzustand. Die emittierte Wellenlänge ist dabei von der Energiedifferenz des Übergangs und die Intensität von der Übergangswahrscheinlichkeit abhängig (Holtzhauer 1996).



**Abbildung 23:** Jablonski-Thermeschema der Elektronenkonfiguration (Hesse et al. 2005)

Strahlungsprozess ( $\rightarrow$ ), strahlungsloser Prozess ( $\rightsquigarrow$ )

$A$  = Absorption,  $F$  = Fluoreszenz

$IC$  = internal conversion

$ISC$  = Intersystem crossing

$S$  = Singulettzustand

$T$  = Triplettzustand

Diese ist dem Quadrat des Betrages des Übergangsdipolmoments proportional.

$$I \sim |\mu_{01}|^2 \quad (25)$$

Da die Deaktivierung auch über strahlungslose Prozesse verlaufen kann, ist die Energie der emittierten Photonen geringer als die vom Molekül absorbierte. Demnach ist die Wellenlänge des emittierenden Photons ins Langwellige verschoben. Die Effizienz dieses Vorgangs kann durch die Quantenausbeute ausgedrückt werden. Die Quantenausbeute  $\Phi$  ergibt sich aus dem Verhältnis der Anzahl der emittierten Photonen zur Anzahl der absorbierten Photonen (Grabolle et al. 2009):

$$\Phi = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbiertes Photonen}} \leq 1 \quad (26)$$

wobei  $\Phi$  ebenfalls entspricht (Holtzhauer 1996):

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_q(Q)} \quad (27)$$

Neben der Fluoreszenz gibt es noch weitere Prozesse, welche an der Deaktivierung beteiligt sind. Bei der inneren Umwandlung (*internal conversion, IC*) erfolgt eine Deaktivierung durch Schwingungen im Inneren des Moleküls oder durch eine Weitergabe der Energie auf andere Moleküle durch Stöße. Bei der Interkombination (*Intersystem crossing, ISC*) erfolgt ein strahlungsloser Übergang vom angeregten  $S_1$  Zustand in den angeregten Triplettzustand  $T_1$ . Eine weitere Möglichkeit der Desaktivierung ist das Fluoreszenzquenching. Hierbei unterscheidet man zwischen der statistischen und dynamischen Fluoreszenzlöschung. Bei der statistischen Fluoreszenzlöschung erfolgt eine Ausbildung eines Komplexes zwischen dem Fluorophor und dem Fluoreszenzquenscher, die die Möglichkeit zur Fluoreszenz verhindert. Während bei der dynamischen Fluoreszenz die Energie des Fluorophors durch Stöße auf andere Moleküle übertragen wird. Dabei ist die Fluoreszenzausbeute abhängig von der Konzentration des Quenchers.

Eine Beschreibung ergibt sich aus der Stern-Volmer-Gleichung.

$$\frac{I_0}{I} - 1 = K \cdot c_Q \cdot \tau_0 \quad (28)$$

$I_0$  = Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Quenchemolekülen

$I$  = Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von Quenchemolekülen

$c_Q$  = Konzentration der Quenchemoleküle

$\tau_0$  = Fluoreszenzlebensdauer

$K$  = Quencherkonstante (Proportionalitätsfaktor)

Hier ist die Lebensdauer  $\tau_0$  als die Zeit definiert, in der die Anzahl der angeregten Moleküle  $N_0$  wieder auf den Bruchteil  $N_0 / e$  zurückgegangen sind. Es gilt:

$$-\frac{dN}{dt} = k_f \cdot N \quad (29)$$

Für die Anzahl der Moleküle im angeregten Zustand in Abhängigkeit der Zeit, folgt dann:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-k_f / \tau_0} \quad (30)$$

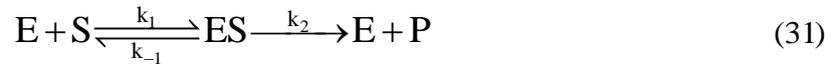
## 2.4. Enzymkinetik

Enzyme sind Biokatalysatoren, welche die Aufgabe haben, Stoffwechselreaktionen durch Herabsetzung der Aktivierungsenergie zu beschleunigen. Sie zeichnen sich durch eine sehr hohe Substrat- und Wirkungsspezifität aus (Adam et al. 2009). Dabei verlässt das Enzym die Reaktion unverändert. Das heißt, dass diese nur einen Stoffwechselmetabolit katalysieren. Insgesamt kann man die Enzyme- je nach Funktion- in sechs verschiedene Gruppen einteilen (Prasad 2011) (siehe Tabelle).

**Tabelle 1:** Überblick über die Enzymklassen und deren Funktion (Prasad 2011)

Enzym-Gruppe	Funktion
Oxidoreduktasen	katalysieren Redoxreaktionen
Transferasen	katalysieren die Übertragung verschiedener funktioneller Gruppen
Lyasen	katalysieren nicht-hydrolytische Abspaltungsreaktionen
Isomerasen	katalysieren Isomerisierungsreaktionen
Ligasen	katalysieren Verknüpfungsreaktionen
Hydrolasen	katalysieren hydrolytische Reaktionen

Für die Bildung des Produktes gilt folgende Reaktionsgleichung (Yia und Liu 2010):



Das Substrat (S) bindet an das aktive Zentrum des Enzyms (E) und bildet ein Enzym-Substrat-Komplex. Im nächsten Schritt erfolgt dann die Bildung des Produktes, welches wieder vom aktiven Zentrum des Enzyms abgespalten wird. Für diesen Reaktionsschritt gibt es keine Rückreaktion.

Ausgehend von der Reaktionsgleichung, erhält man für die Geschwindigkeit der Produktbildung (RG) folgende Differentialgleichung (Bisswanger 2000):

$$RG = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (31)$$

Für die zeitlichen Änderungen der Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer erhält man folgende Ausdrücke (Bisswanger 2000):

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[S] \cdot [E] + k_{-1}[ES] \quad (32)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[S] \cdot [E] + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (33)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S] \cdot [E] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (34)$$

Für die Bildung und den Zerfall des [ES] Komplexes gilt:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (35)$$

---

## Grundlagen

---

Es herrscht also quasi ein Gleichgewicht vor zwischen der Bildung und dem Verbrauch des Substrat-Enzym-Komplexes. Das heißt, dass sich der [ES] Komplex insgesamt im „steady state“ Zustand befindet.

Bei der Umsetzung wird das Enzym, das als Katalysator fungiert, nicht verbraucht. Das bedeutet, dass sich die eingesetzte Enzymkonzentration  $[E]_0$  aus freien Enzym [E] und Enzym-Substrat Komplex [ES] zusammensetzt.

$$[E]_0 = [E] + [ES] \text{ und } [E] = [E]_0 - [ES] \quad (36)$$

Mit Hilfe der Gleichungen (34), (35) und (36) kann man die Enzym-Substrat Konzentration bestimmen:

$$k_1[S]([E]_0 - [ES]) - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \quad (37)$$

$$k_1[S] \cdot [E]_0 - k_1[S] \cdot [ES] - k_{-1}[ES] + k_2[ES] = 0 \quad (38)$$

$$[ES] = \frac{k_1[S] \cdot [E]_0}{(k_1[S] - k_{-1} - k_2)} \quad (39)$$

Durch Umformen erhält man dann (Bisswanger 2000):

$$[ES] = \frac{[S] \cdot [E]_0}{\left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}\right) + [S]} \quad (40)$$

$$[ES] = \frac{[S][E]_0}{k_m + [S]} \quad (41)$$

## Grundlagen

---

Die Konstante  $k_m$  ist eine für jedes Enzym und Substrat spezifische Konstante, die so genannte Michaelis-Menten-Konstante.

Damit gilt dann für die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$ :

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot \frac{[S][E]_0}{k_m + [S]} \quad (42)$$

Geht man von einer Enzym-Sättigung aus, kann man  $k_2 [E]_0$  durch die maximale Geschwindigkeit  $v_{\max}$  ersetzen (Yia und Liu 2010):

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = \frac{[S] \cdot v_{\max}}{k_m + [S]} \quad (43)$$

## 3. Methoden

### 3.1. Verwendete Methoden

#### 3.1.1. Elektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) beruht auf dem Prinzip, dass ein dünner Elektronenstrahl über eine Probe geführt wird und damit die Topografie stark vergrößert dargestellt werden kann. In diesem Prozess, in dem die zu untersuchende Probe abgerastert wird, kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen den eingestrahlten Elektronen und der Probe. Diese Wechselwirkung ist durch einen Austritt von Sekundär- und Rückstreuелеktronen und Röntgenstrahlung charakterisiert. Die Stromintensität, die von der Intensität der Sekundärelektronen abhängt, wird von einem Detektor erkannt und daraus die Topografie der zu untersuchenden Oberfläche ermittelt. Diese Art der Elektronenmikroskopie findet im Hochvakuum statt, um eine Wechselwirkung der Elektronen mit Gasmolekülen zu vermeiden. Eine spezielle Art Rasterelektronenmikroskopie stellt die „environmental scanning microscopy“ (ESEM) dar. Hier findet die Abrasterung der Probe unter einem bestimmten Gasdruck in Probennähe statt.

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchdringt der Elektronenstrahl die zu untersuchende Probe. Voraussetzung für dieses Verfahren ist demnach, dass die Probe sehr dünn auf den Probenträger aufgetragen wird. Vorteil dieser Methode ist, dass hier noch größere Auflösungen erreicht werden und im Gegensatz zur Rasterelektronenmikroskopie nicht nur die Topografie, sondern die innere Struktur dargestellt werden kann.

#### 3.1.2. Dynamische Lichtstreuung

Mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) lässt sich der hydrodynamische Radius von Nanopartikeln bestimmen. Hierbei beobachtet man mit Hilfe eines monochromatischen Laserstrahls die Diffusion der Nanopartikel in einem bestimmten Volumen. Wenn der Laserstrahl auf die Nanopartikel trifft, kommt es zu einer Streuung des Lichtes (Rayleigh-Streuung / Mie-Streuung). Durch die Brown'sche Molekularbewegung kommt es zu zeitlichen Änderungen in der Streuintensität. Aufgrund dessen lässt sich der

Diffusionskoeffizient der Nanopartikel ermitteln. Dieser hängt von der Größe der Nanopartikel ab. So kann man bei sphärischen Nanopartikeln über die Stokes-Einstein-Gleichung den hydrodynamischen Radius ( $R_H$ ) berechnen:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (44)$$

$k_B$  = Boltzmann-Konstante

$T$  = Temperatur

$\eta$  = Viskosität des Dispersionsmittels

$D$  = Diffusionskoeffizient

$R_H$  = Hydrodynamischer Radius

Die Datenauswertung erfolgt dann mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion, d.h. aufgrund der zeitlichen Änderung des Signals lässt sich die Größe der Nanopartikel berechnen.

### 3.1.3. Nanoparticle Tracking Analysis

Die Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) beruht ebenfalls auf dem Prinzip der Brown'schen Molekularbewegung. Mit Hilfe eines Mikroskops und einer CCD-Kamera lässt sich die Bewegung der Nanopartikel in Abhängigkeit der Zeit beobachten. Dabei werden die Reflexionspunkte des Laserlichtes während der Wechselwirkung mit den Nanopartikeln detektiert. Die Größe der Nanopartikel kann dann analog zu der Methode der DLS mit der Stokes-Einstein-Gleichung berechnet werden. Auch eine breite Größenverteilung kann mit dieser Methode gut erfasst werden (Filipe et al. 2010).

### 3.1.4. Analytische Scheibenzentrifuge

Bei der Analytischen Scheibenzentrifuge wird die Nanopartikel-Dispersion in eine rotierende und mit Flüssigkeit gefüllte Scheibe (Disc) eingespritzt. Die Nanopartikel wandern aufgrund der Zentrifugalbeschleunigung entgegen einem Dichtegradienten. Bei diesem kann es sich beispielsweise um eine Saccharose-Lösung handeln. Dabei sedimentieren die Nanopartikel

unterschiedlich stark, so dass eine Auftrennung nach ihrer Größe erfolgen kann. Die Nanopartikel können dann mittels Absorption detektiert werden. Vorteil dieser Methode ist, dass man hier einen Überblick über Verteilung der Nanopartikel-Größen erhält.

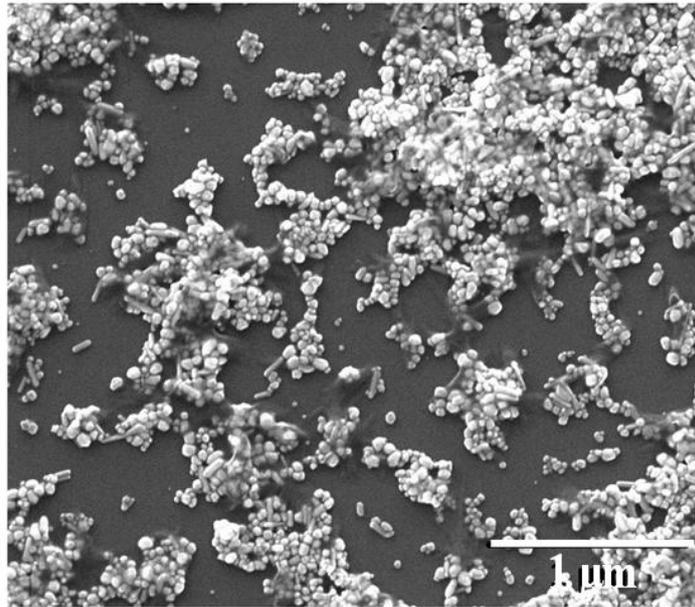
### 3.2. Synthese und Charakterisierung der Nanopartikel

Die Charakterisierung der Nanopartikel erfolgte teilweise mit Hilfe der Arbeitskreise von Prof. Dr. M. Epple des Institutes für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen (Nanopartikel mit unterschiedlicher Funktionalisierung) und Prof. Dr. W. Peukert (Citrat-stabilisierte Nanopartikel verschiedener Größe) des Institutes für Partikel-Technologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Für die Charakterisierung standen folgende Methoden zur Verfügung: Rasterelektronenmikroskop (REM), Transmissionselektronenmikroskop (TEM), Dynamische Lichtstreuung (DLS), UV-Vis-Spektroskopie, Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) und analytische Scheibenzentrifuge (DCS).

#### 3.2.1. Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel

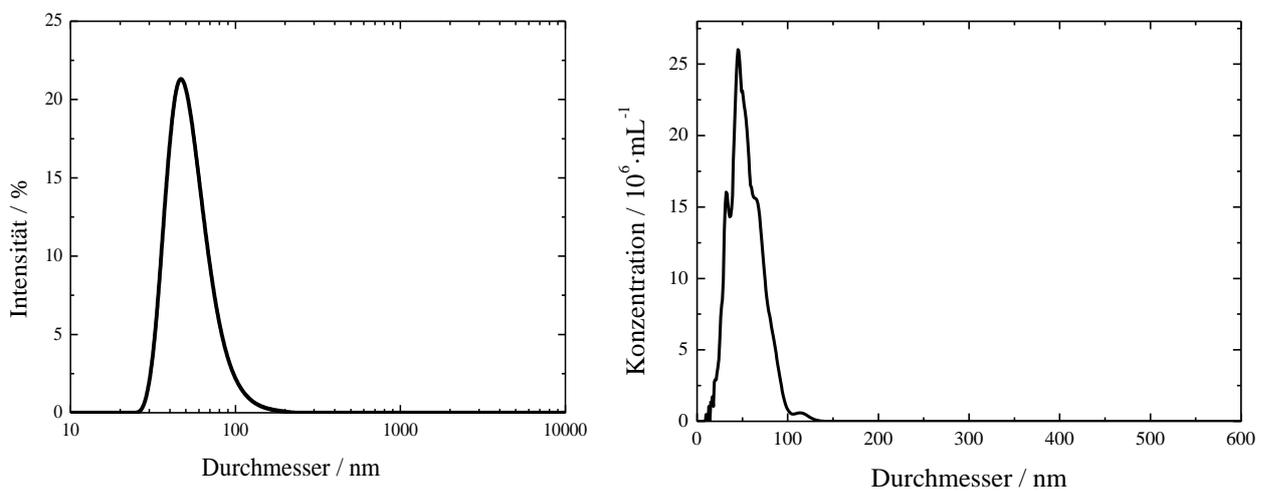
Die Synthese der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel erfolgte nach der Methode von *Lee und Meisel* (Lee und Meisel 1982). Vor der Synthese wurden alle Glasgeräte mit Königswasser ausgekocht und anschließend mehrfach mit Reinstwasser (18.2 M $\Omega$  cm) gespült. In 100 mL Reinstwasser wurden 17 mg Silbernitrat (Roth, p.a.  $\geq 99.9$  %) gelöst und auf 95 °C erhitzt. Daraufhin wurden schnell 10 mL einer 1 %igen Tri-Natriumcitrat-Dihydratlösung (AppliChem) hinzugegeben. Die Lösung wurde solange konstant bei 95 °C gerührt (ca. 30 min) bis sie eine goldgelbe Farbe aufwies. Anschließend wurde sie sofort mit Hilfe eines Eisbades auf Raumtemperatur gebracht. Um die Nanopartikel zu reinigen, wurde die Suspension 30 min bei 30000 U min<sup>-1</sup> zentrifugiert und anschließend wieder in Wasser redispersiert. Es erfolgte eine Charakterisierung der Nanopartikel nach Größenverteilung und Stabilität.

Die Größe der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel wurde mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) ermittelt. Hierbei wurde ein Durchmesser von  $40 \pm 10$  nm für diese Nanopartikel bestimmt. Eine exemplarische Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme ist in Abbildung 24 gezeigt.



**Abbildung 24:** Exemplarische Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel mit einem Durchmesser von  $40 \pm 10$  nm

Ergänzend erfolgte die Bestimmung der Nanopartikel-Größe mit der Dynamischen Lichtstreuung und der Nanoparticle Tracking Analysis. Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse.

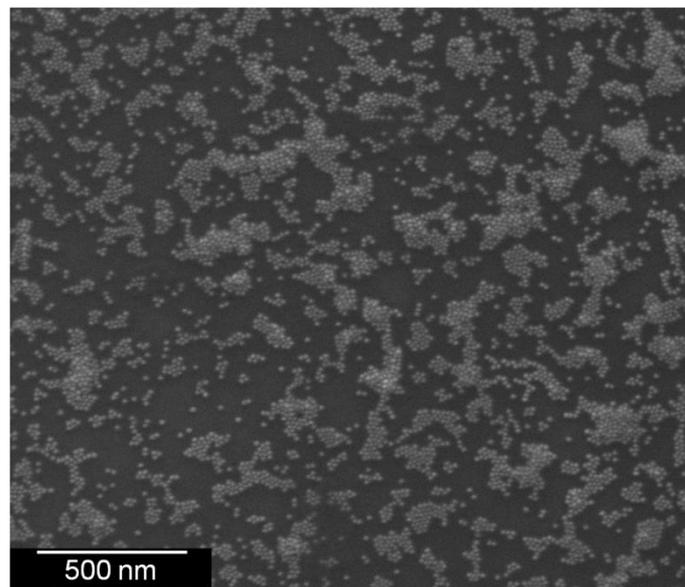


**Abbildung 25:** Ergebnisse der Bestimmung des Durchmessers der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (DLS), mit einem bestimmten Durchmesser von  $45 \pm 4$  nm (*links*) und der Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), mit der ein Durchmesser von  $45 \pm 4$  nm ermittelt wurde (*rechts*)

Bei der DLS-Messung wurde ein Nanopartikel-Durchmesser von  $45 \pm 4$  nm bestimmt. Das gleiche Ergebnis konnte auch mit der NTA erzielt werden. Hier wurde ein Durchmesser von  $45 \pm 4$  nm bestimmt. Insofern lieferten alle Methoden vergleichbare Ergebnisse.

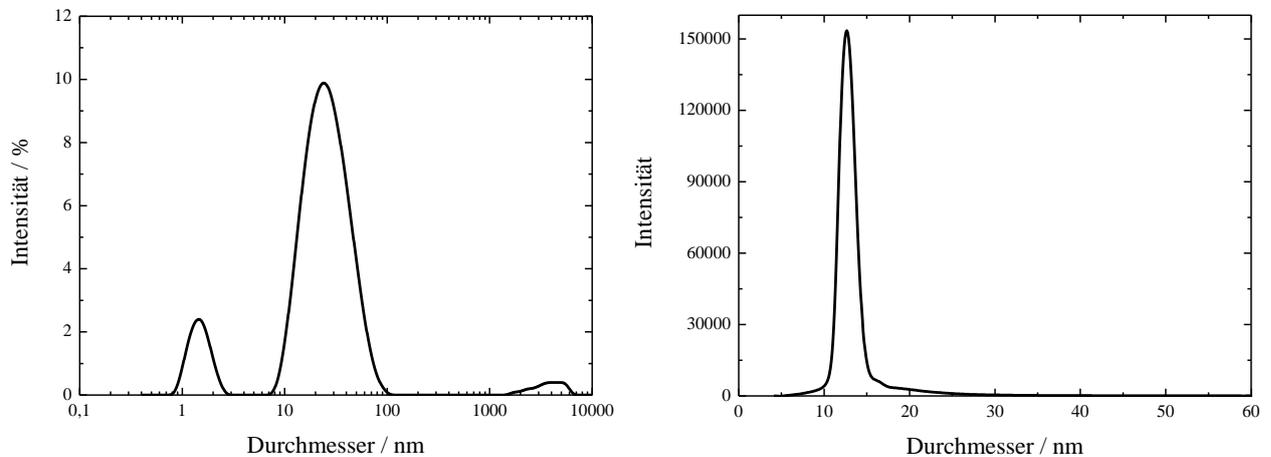
### 3.2.2. Citrat-stabilisierte Gold-Nanopartikel

Für die Synthese von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln wurde eine Methode verwendet, die von *Turkevich et al.* beschrieben wurde (Turkevich et al. 1951). Auch hier wurden alle Glasgeräte vor der Synthese mit Königswasser ausgekocht und mehrmals mit Reinstwasser ( $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) gespült.  $40 \mu\text{L}$  30 Gew%ige  $\text{HAuCl}_4$ -Lösung (Aldrich, 99.99 %) wurden in 250 mL Reinstwasser gegeben und auf  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt. Nach Erreichen dieser Temperatur wurde eine 1 %ige Lösung Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (AppliChem) schnell zu der Lösung gegeben und so lange konstant bei  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  gehalten, bis die Lösung eine dunkelrote Farbe aufwies. Anschließend wurde die Nanopartikel Lösung schnell auf Raumtemperatur abgekühlt. Von den Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln wurden Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Abbildung 26 zeigt eine exemplarische Aufnahme der Nanopartikel.



**Abbildung 26:** Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikel mit einem Durchmesser von  $13 \pm 2$  nm

Die Auswertung der REM-Aufnahmen ergab für die Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikel einen Durchmesser von  $13 \pm 2$  nm. Weitere Größenbestimmungen erfolgten mit Hilfe der DLS und der Analytischen Scheibenzentrifuge.



**Abbildung 27:** Größenbestimmung der Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikel durch die Dynamische Lichtstreuung; mit der DLS wurde ein Durchmesser von  $17 \pm 2$  nm erhalten (*links*) und der analytischen Scheibenzentrifuge die einen Durchmesser von  $12 \pm 2$  nm lieferte (*rechts*)

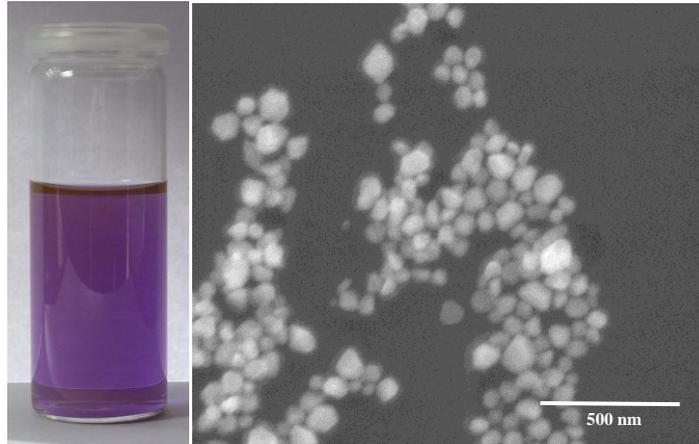
Die Dynamische Lichtstreuung ergab einen Durchmesser von  $17 \pm 2$  nm. Mit Hilfe der analytischen Scheibenzentrifuge wurde ein Durchmesser von  $12 \pm 2$  nm für die Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikel ermittelt.

### 3.2.3. Gold-Nanoschalen

Die Synthese der Gold-Nanoschalen erfolgte nach einer von *Sun et al.* publizierten Syntheseanleitung. Vor der Synthese wurden alle Glasgeräte mit Königswasser ausgekocht und mehrfach mit Reinstwasser gespült. Es wurden 3 mL Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel (40 nm) in 50 mL Reinstwasser verdünnt und bis zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden 2.5 mL einer 1 %igen Goldsäurelösung (gelöst in Wasser und HCl) tropfenweise hinzugegeben. Die Lösung wurde so lange erhitzt bis diese einen Lila-Ton aufwies (Sun und Xia 2002).

Es erfolgte eine Größenbestimmung der Gold-Nanoschalen durch die Rasterselektronenmikroskopie. Die Nanopartikel besitzen einen Durchmesser von  $50 \pm 8$  nm

und weisen im Gegensatz zu den Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln eine unregelmäßige Struktur auf. Abbildung 28 zeigt eine REM-Aufnahme der Gold-Nanoschalen.

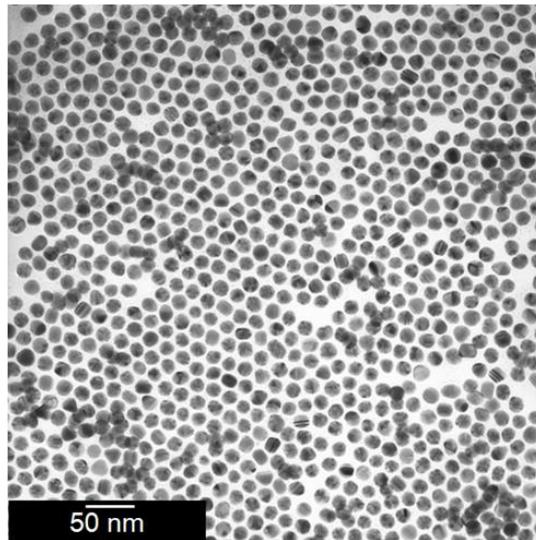


**Abbildung 28:** Foto (*links*) und Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Gold-Nanoschalen; es wurde ein Durchmesser von  $50 \pm 8$  nm ermittelt (*rechts*)

### 3.2.4. PVP-funktionalisierte Gold-Nanopartikel

Die Synthese der PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikel erfolgte durch Herrn Dr. Dirk Mahl nach folgender Syntheseanleitung:  $2.54 \cdot 10^{-5}$  mol Goldsäurelösung und  $1.70 \cdot 10^{-4}$  mol Tri-Natriumcitrat-Dihydrat gelöst in 5 mL Wasser wurden zu 90 mL siedendem Wasser ( $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ) gegeben und weiter bei konstanter Temperatur gerührt bis die Lösung eine dunkelrote Farbe aufwies. Daraufhin erfolgte eine Zugabe von (Poly)vinylpyrrolidon ( $3.05 \cdot 10^{-7}$  mol in 5 mL Wasser gelöst) zu der Gold-Nanopartikel-Suspension. Um Ionen/Citrat und Oxidationsprodukte zu entfernen wurden die Nanopartikel durch Ultrazentrifugation (20 min,  $20000 \text{ U min}^{-1}$ , 29400 g) getrennt und anschließend in Reinstwasser redispergiert.

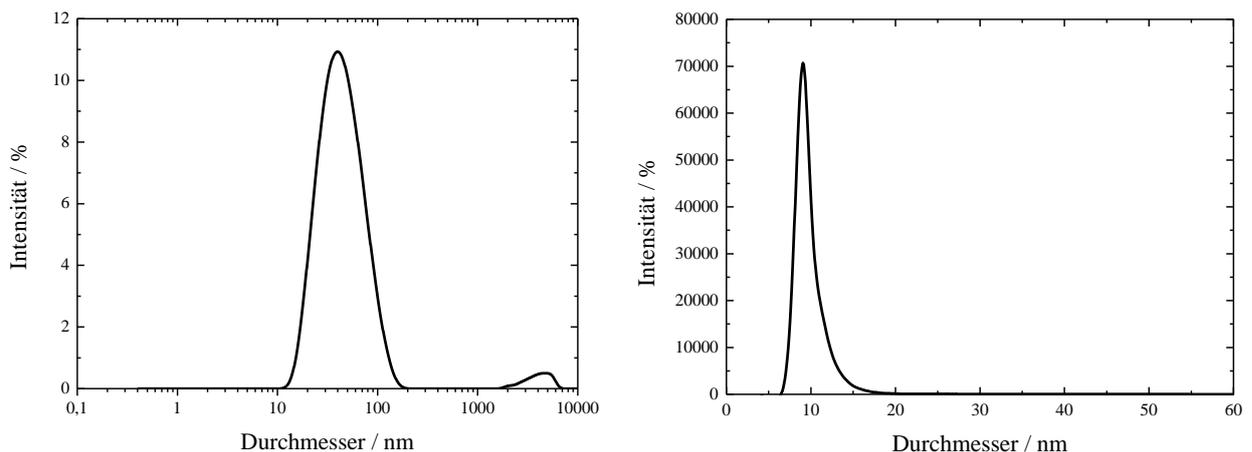
Für die Charakterisierung der Gold-Nanopartikel wurden TEM-Aufnahmen gemacht. Abbildung 29 zeigt eine TEM-Bild dieser Nanopartikel.



**Abbildung 29:** Exemplarische Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahme der PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikel (Treuel et al. 2012 ) mit einem Durchmesser von  $13 \pm 2$  nm

Die Untersuchung der Größe der Gold-Nanopartikel mittels TEM ergab einen Durchmesser von  $13 \pm 2$  nm, wobei hier zu beachten ist, dass die Polymer-Schicht in wässrigem Medium aufquillt und der Durchmesser dadurch tatsächlich größer ist. So konnte mit der Dynamischen Lichtstreuung ein Durchmesser von  $39 \pm 3$  nm bestimmt werden.

Mit der Analytischen Scheibenzentrifuge wurde ein Durchmesser von  $9 \pm 2$  nm ermittelt. Die Ergebnisse der beiden Messungen sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

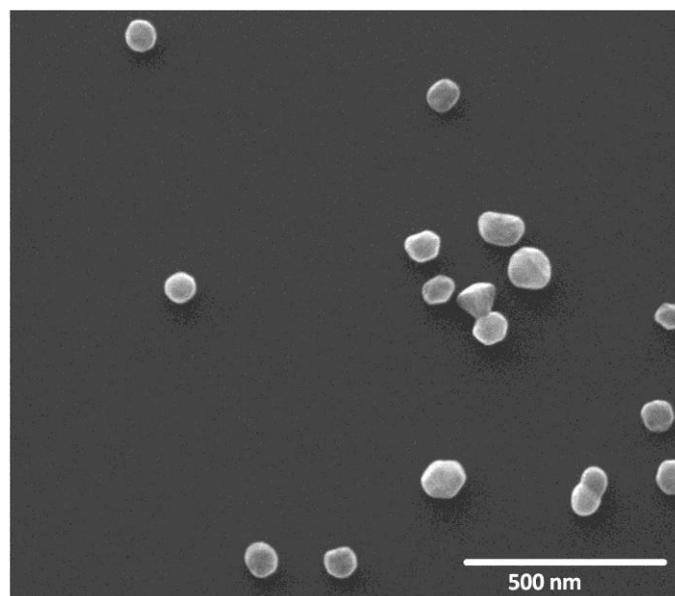


**Abbildung 30:** Untersuchung der Größe von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln mittels Dynamischer Lichtstreuung; es wurde ein Durchmesser von  $39 \pm 3$  nm erhalten (*links*) und mit der Analytischen Scheibenzentrifuge (*rechts*) wurde ein Durchmesser von  $9 \pm 2$  nm bestimmt (Treuel et al. 2012 )

Als Erklärung für die unterschiedlichen Größen sollte man hier erwähnen, dass die Elektronenmikroskopie keine Auskunft über den Agglomerationszustand der Nanopartikel-Lösung gibt, da die Probe im getrockneten Zustand analysiert wird. Die Dynamische Lichtstreuung gibt einen größeren Überblick in der Größenverteilung der Nanopartikel-Dispersionen. Vor allem Agglomerate werden mit dieser Methode berücksichtigt. Allerdings sollte hier beachtet werden, dass gerade Nanopartikel mit einem größeren Durchmesser stärker streuen, so dass man als Ergebnis einen größeren Durchschnittswert erhält (Mahl et al. 2011).

### 3.2.5. PVP-funktionalisierte Silber-Nanopartikel

Die Synthese der PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel erfolgte durch Herrn Dr. Jörg Diendorf nach folgender Syntheseanleitung (Treuel et al. 2012 ; Wang et al. 2005): 2 g Glucose und 1 g Poly(vinylpyrrolidon) (PVP, K30, Povidon 30, Fluka) wurden in 40 mL Wasser gelöst und unter Rühren auf 90 °C erhitzt. 0.5 g Silbernitrat (Roth, p.a.) wurden in 1 mL Wasser gelöst und schnell zu der PVP/Glucose Lösung hinzugegeben. Die Lösung wurde 1 h bei 90 °C gerührt und anschließend auf Raumtemperatur gekühlt. Eine Reinigung der Nanopartikel erfolgte durch eine zweimalige Zentrifugation (30 min bei 30000 U min<sup>-1</sup>) und anschließender Redispersion in Reinstwasser. Es wurden Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen der PVP-stabilisierten Silber-Nanopartikel gemacht (Abbildung 31).

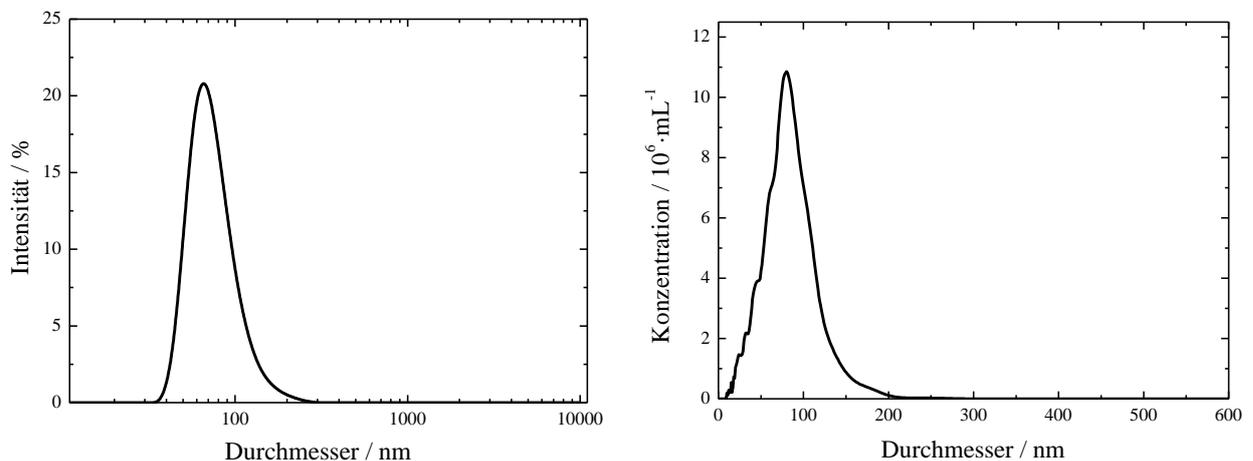


**Abbildung 31:** Exemplarische Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel mit einem Durchmesser von  $70 \pm 20$  nm

Die Charakterisierung der Nanopartikel mittels Rasterelektronenmikroskop ergab einen Durchmesser von  $70 \pm 20$  nm.

Mit der Dynamischen Lichtstreuung wurde ein Durchmesser von  $80 \pm 6$  nm bestimmt. Die Ergebnisse können als übereinstimmend gewertet werden, da bei der DLS der hydrodynamische Radius ermittelt wird und zudem die Polymer-Schicht in wässrigem Medium aufquillt (Treuel et al. 2012). Zusätzlich gibt die Rasterelektronen-Aufnahme nur einen kleinen Ausschnitt der Größenverteilung an, während mit der DLS ein größeres Probenvolumen erfasst wird.

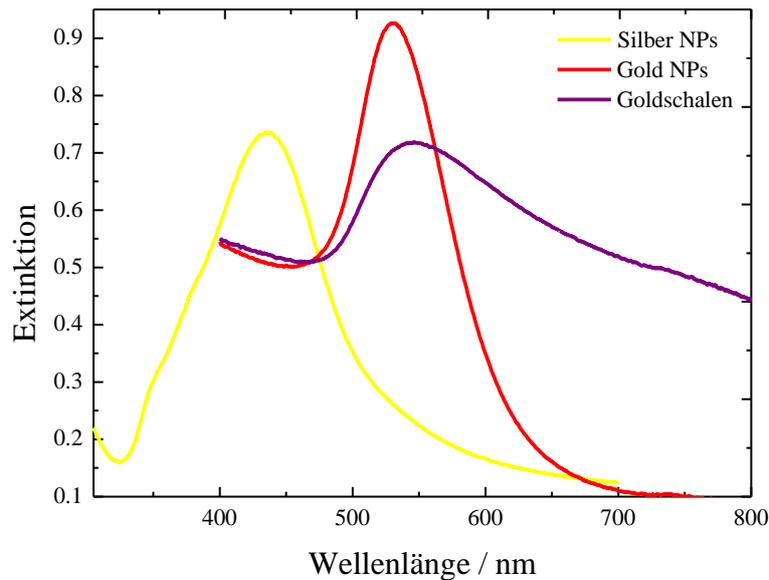
Mit Hilfe der NTA konnte ebenfalls ein Durchmesser von  $80 \pm 6$  nm bestimmt werden. Die nachfolgenden Abbildungen stellen die Ergebnisse mit den Methoden der Dynamischen Lichtstreuung und der Nanoparticle Tracking Analysis dar.



**Abbildung 32:** Bestimmung der Größenverteilung der PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel durch die Dynamische Lichtstreuung; mit der DLS wurde ein Durchmesser von  $80 \pm 6$  nm bestimmt (*links*) und der Nanoparticle Tracking Analysis (*rechts*), mit der ein Durchmesser von  $80 \pm 6$  nm ermittelt wurde

### 3.2.6. UV-Vis-Spektren der Nanopartikel

Von den verwendeten metallischen Nanopartikeln wurden UV-Vis-Spektren zur Charakterisierung aufgenommen. Die UV-Vis-Spektren können ebenfalls einen Anhaltspunkt zur Größenverteilung der Nanopartikel (Haiss et al. 2007) und die Reproduzierbarkeit der einzelnen Chargen geben. In Abbildung 33 sind die UV-Vis-Spektren der hier verwendeten Nanopartikel dargestellt.

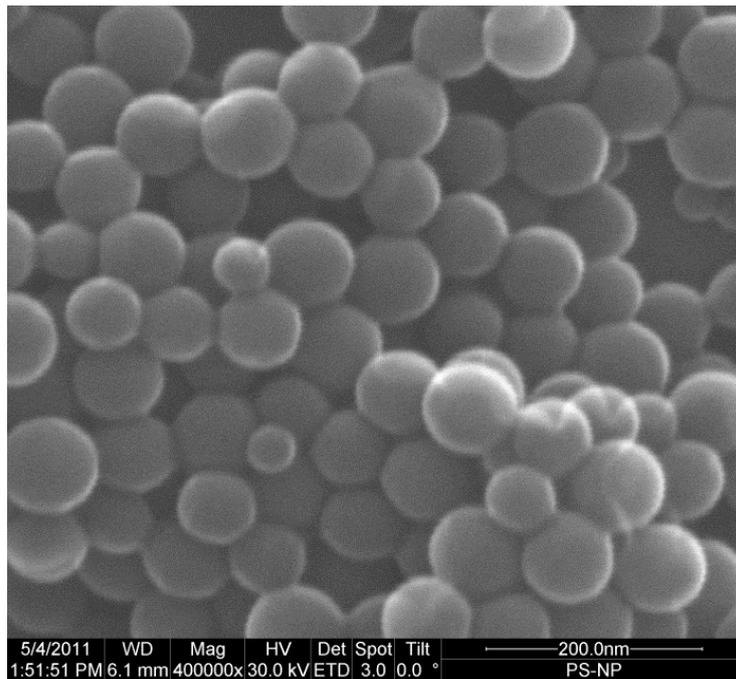


**Abbildung 33:** UV-Vis-Spektren der metallischen Nanopartikel, *gelb*: Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel, Extinktionsmaximum: 420 nm, *rot*: Citrat-stabilisierte Gold-Nanopartikel, Extinktionsmaximum: 540 nm, *lila*: Gold-Nanoschalen, Extinktionsmaximum: 555 nm

Bei den Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln lag das Extinktionsmaximum bei 420 nm und ist vergleichbar mit dem von *Lee et al.* ermittelten Wert. Diese haben ein Extinktionsmaximum von 420 nm bestimmt (Lee und Meisel 1982). Bei den Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln lag das Extinktionsmaximum bei 540 nm. Hier bestimmten *Lee et al.* ein Extinktionsmaximum von 530 nm (Lee und Meisel 1982). Das Extinktionsmaximum der Gold-Nanoschalen lag bei 555 nm.

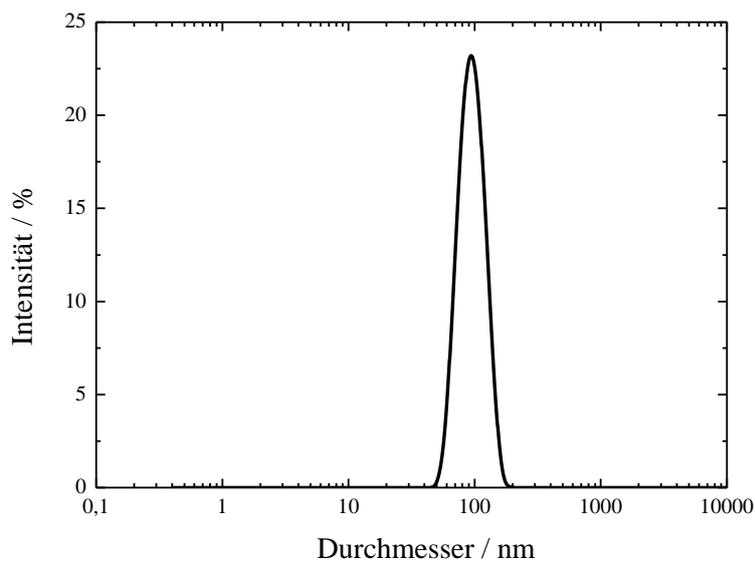
### 3.2.7. Polystyrol-Nanopartikel

Die Polystyrol-Nanopartikel wurden kommerziell erworben. Laut Hersteller besitzen die Nanopartikel einen Durchmesser von ca.  $100 \pm 15$  nm. Diese Nanopartikel wurden ebenfalls charakterisiert. In den Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen waren die Polystyrol-Nanopartikel  $90 \pm 11$  nm groß. Abbildung 34 zeigt eine exemplarische Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme.



**Abbildung 34:** Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von  $90 \pm 11$  nm

Da auch die Brown'sche Molekular Bewegung und die DLS Messung ebenfalls einen Durchmesser von ca. 90 nm ergaben, wurde für die weitere Auswertung dieser Wert verwendet. Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse aus der DLS Bestimmung.



**Abbildung 35:** Größenbestimmung der Polystyrol-Nanopartikel durch die Dynamische Lichtstreuung, es wurde ein Durchmesser von  $90 \pm 7$  nm ermittelt

### 3.2.8. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Größenbestimmung

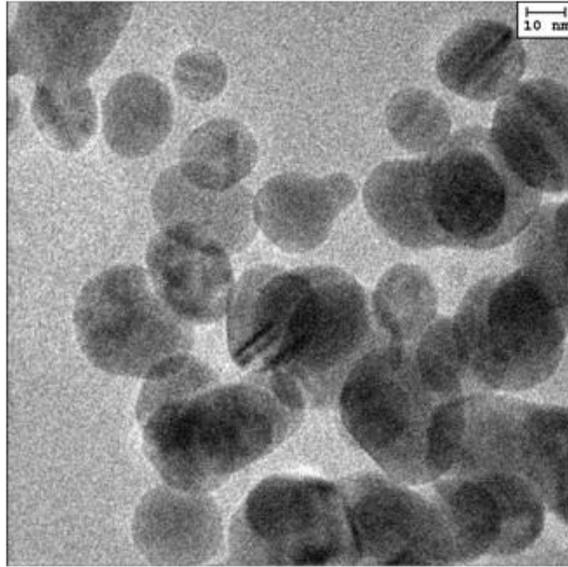
Im Folgenden sind die Ergebnisse der Größenbestimmung der Nanopartikel zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der Ergebnisse zur Größenbestimmung der verwendeten Nanopartikel, welche mit den verschiedenen analytischen Methoden erhalten wurden, TEM (Transmissionselektronenmikroskop), REM (Rasterelektronenmikroskop), DLS (Dynamische Lichtstreuung), DCS (Analytische Scheibenzentrifuge), NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), BM (Brown'sche Molekularbewegung)

Nanopartikel	TEM/SEM	DLS	Weitere Methode
Gold (Citrat)	13 ± 2 nm (SEM)	17 ± 2 nm	12 ± 2 nm (DCS)
Gold (PVP)	13 ± 2 nm (TEM)	39 ± 3 nm	9 ± 2 nm (DCS)
Silber (Citrat)	40 ± 10 nm (SEM)	45 ± 4 nm	45 ± 4 nm (NTA)
Silber (PVP)	70 ± 20 nm (TEM)	80 ± 6 nm	80 ± 6 nm (NTA)
Gold-Nanoschalen	50 ± 8 nm (ESEM)	-	-
Polystyrol	90 ± 11 nm	90 ± 7 nm	90 ± 5 nm (BM)

### 3.2.9. Silber-Nanopartikel (12 nm, Seed)

Die Synthese der Nanopartikel erfolgte bei Raumtemperatur in einem 30 mL Schnappdeckelglas. Zu 8.9 mL Reinstwasser wurden 0.25 mL einer 0.01 molaren Silbernitrat-Lösung hinzugegeben. Unter Schütteln erfolgte eine Zugabe von 0.25 mL Tri-Natriumcitrat-Dihydrat-Lösung. Die Lösung wurde wiederholt durchmischt und anschließend wurden 0.3 mL einer frisch angesetzten wässrigen 0.01 molaren Natriumborhydrid-Lösung schnell zugegeben und wiederholt geschüttelt. Die Lösung färbte sich sofort von farblos in goldgelb und bekommt nach einigen Minuten Schütteln eine dunkelgrüne Farbe. Diese Nanopartikel wurden auch als Wachstumskeim für die Synthese von größeren Nanopartikeln verwendet (Jana et al. 2001). Die Bestimmung des Nanopartikel-Durchmessers erfolgte durch die Auszählung der TEM-Aufnahmen. Folgende Abbildung zeigt ein exemplarisches TEM-Bild der 12 nm großen Seeds.



**Abbildung 36:** Exemplarische Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahme der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 12 nm

### 3.2.10. Silber-Nanopartikel (20-90 nm)

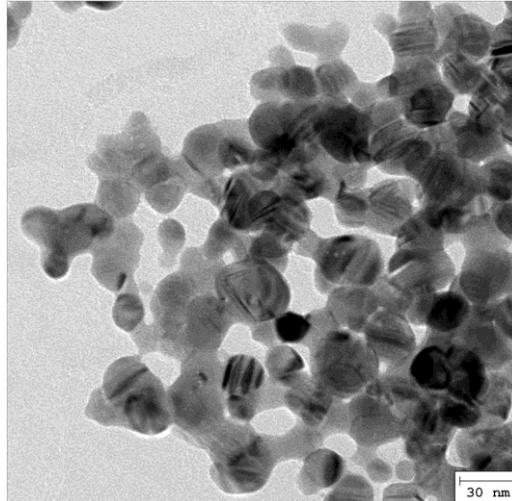
Die Synthesemethode der größenabhängigen Silber-Nanopartikel wurde durch Dr. Cornelia Damm (Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg) entwickelt und erfolgte im Rahmen eines Aufenthaltes an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg im Arbeitskreis von Prof. W. Peukert.

Die Silber-Nanopartikel mit definierter Größe zwischen 20 nm und 90 nm wurden mit einer „Kristallkeimwachstums-Methode“ synthetisiert. Dafür wurden die kleinen Nanopartikel (Seeds, 12 nm) oder andere kleinere Nanopartikel mit definierter Silberkonzentration als Wachstumskeime verwendet. Als Reduktionsmittel diente das schwache Reduktionsmittel Ascorbinsäure. Die Synthese erfolgte analog zu der Synthese der Seeds bei Raumtemperatur in einem 30 mL Schnappdeckelglas. Zu 5 mL einer 0.01 molaren Tri-Natriumcitrat-Dihydrat-Lösung wurden 0.125 mL einer 0.01 molaren Silbernitrat-Lösung gegeben und geschüttelt. Anschließend erfolgt eine Zugabe von 0.25 mL einer 0.1 molaren Ascorbinsäure-Lösung. Unter leichtem Schütteln wurde schnell eine Seed-Lösung hinzugefügt. Dabei wurde dessen Menge zwischen 0.25 mL und 2 mL variiert, um unterschiedliche Nanopartikel Größen zu erhalten. Mit Hilfe der Keimwachstumsmethode in der Ascorbinsäure als schwaches

## Methoden

Reduktionsmittel verwendet wurde, konnten Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel unterschiedlicher Größe synthetisiert werden (Malissek et al. 2013).

Die Größenbestimmung der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel im Größenbereich von 12 nm bis 90 nm erfolgte durch die TEM-Aufnahmen. Die Auswertung erfolgte durch die Auszählung der Nanopartikel.



**Abbildung 37:** Exemplarische transmissionsmikroskopische Aufnahme der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel mit einem durch Auszählung bestimmten Durchmesser von 27 nm

In Tabelle 3 sind die verwendeten Nanopartikel mit ihrem bestimmten Durchmesser und des verwendeten „Seeds“ mit der zugehörigen Mengenangabe zusammengefasst.

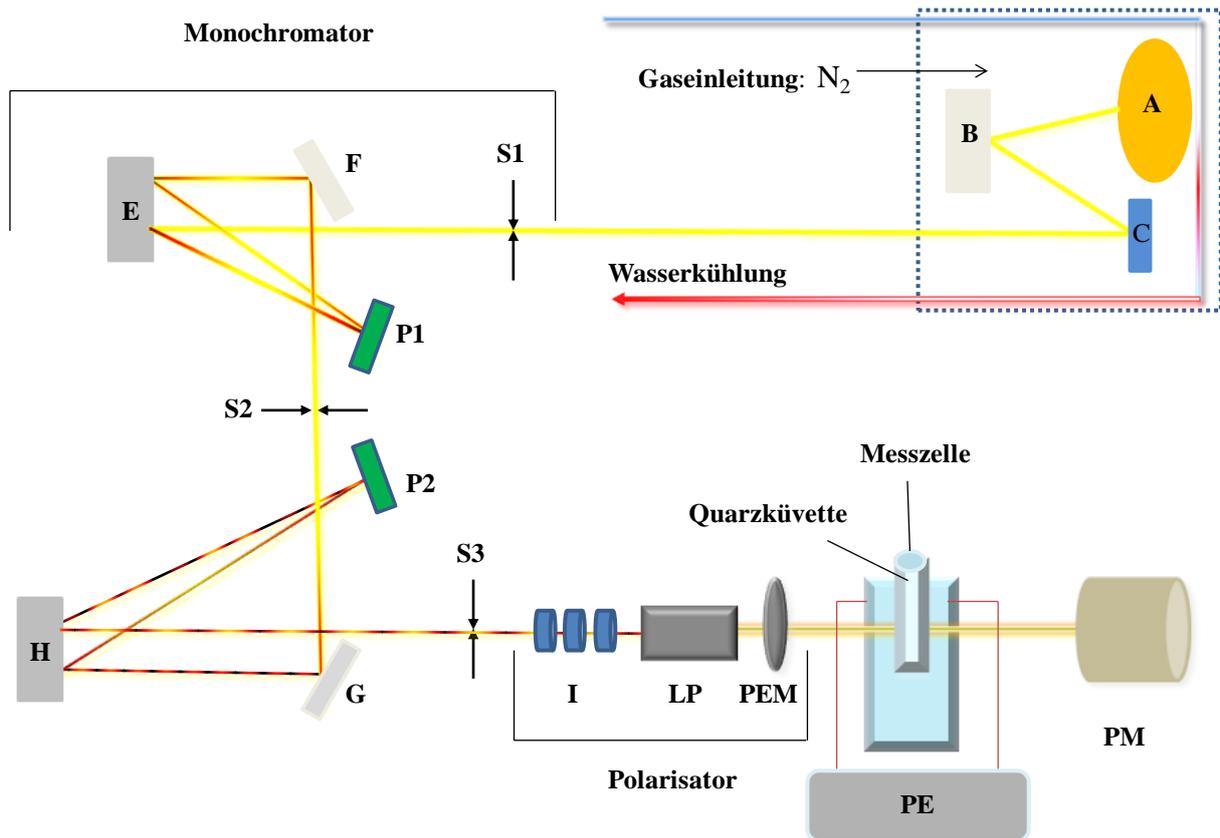
**Tabelle 3:** Größe des Silber-Nanopartikel für die größenabhängigen Untersuchungen und die zugegebene Menge des „Seeds“ (Jana et al. 2001).

Probennummer	Durchmesser / nm	verwendetes „Seed“	Menge der zugegebenen „Seed“ Lösung / mL
Ag-1	30	Ag-Seed	1
Ag-2	45	Ag-Seed	0.5
Ag-3	55	Ag-Seed	0.25
Ag-4	89	Ag-1	1
Ag-5	62	Ag-Seed	0.05
Ag-6	42	Ag-2	1
Ag-7	27	Ag-Seed	2

### 3.3. CD-Spektroskopie

#### 3.3.1. Aufbau der Apparatur

Zu dem optischen System des AVIV 62 DS CD-Spektrometers gehört eine Xenonlampe, die mit 450 Watt betrieben wird. Diese befindet sich in einer Lampenkammer die kontinuierlich gekühlt wird, um ein Überhitzen der Lampe zu vermeiden. Zusätzlich wird die Apparatur kontinuierlich mit Stickstoffgas umspült, damit sich kein Ozon bildet. Die von der Xenonlampe erzeugte elektromagnetische Strahlung wird mit einem Spiegel gebündelt und auf den Eingangsspalt des Monochromators fokussiert. Hier wird das polychromatische Licht in monochromatisches Licht zerlegt. Der Monochromator besteht aus zwei Quarz-Prismen. Durch diese erhält man eine bessere Auflösungen und weniger Streulicht. Der Monochromator arbeitet in einem Wellenlängenbereich von 175 bis 800 nm. Die Spaltbreite ist von 0.05 bis 2  $\mu\text{m}$  variierbar. Für die meisten Messungen erwies sich eine Spaltbreite von 1  $\mu\text{m}$  als die geeignetste Einstellung. Das monochromatische Licht gelangt durch einen Ausgangsspalt in den Polarisator. Es handelt sich um einen  $\text{MgF}_2$  Polarisator, welcher das Licht rechts- und links- circular polarisiert. Von dort aus gelangt das rechts- und links-circular polarisierte Licht in die Messzelle. Um eine konstante Temperatur zu gewährleisten, wurde ein wassergekühltes Peltier-Element in die Messzelle eingebaut. Alle CD-Spektren wurden bei Raumtemperatur (20 °C) aufgenommen. In der Messzelle befindet sich die Küvette mit der zu untersuchenden Probe. Abbildung 38 zeigt den Aufbau des CD-Spektrometers.



**Abbildung 38:** Schematische Darstellung des Circular Dichroismus-Spektrometers AVIV 62 DS, **A:** Xenonlampe, **B:** ellipsoidaler Spiegel, **C:** flacher Spiegel, **S1:** Eingangsspalt, **S2:** Zwischenspalt, **S3:** Ausgangsspalt, **E:** Kollimator Spiegel, **P1:** Prisma, **P2:** Prisma, **F, G:** flacher Spiegel, **H:** Kollimator, **I:** achromatische Linsen, **LP:** Linear-Polarisator, **PEM:** photoelastischer Modulator, **PM:** Photomultiplier, **PE:** Peltierelement zur Temperaturregelung

### 3.3.2. Probenpräparation

Für die Messungen wird zunächst eine Protein-Stammlösung in LoBind® Tubes frisch angesetzt und der Anzahl der Messungen entsprechende Aliquote hergestellt und mit Reinstwasser auf ein Volumen von 2 mL minus der entsprechenden Menge an Nanopartikeln aufgefüllt. Eine geeignete Konzentration wird durch Circular Dichroismus-Messungen und Berechnungen der Proteinanzahl pro eingesetzte Nanopartikel-Anzahl pro mL ermittelt. Nach Zugabe der Nanopartikel wird die Probe 3-4 Stunden bei Raumtemperatur (20 °C) in LoBind® Tubes inkubiert, wobei die Equilibrierungszeit sehr stark von der absoluten Nanopartikel- und Protein-Konzentrationen und dem relativen Verhältnis zueinander abhängt.

### 3.3.3. Messungen

Alle Messungen wurden in einer 1 mm Suprasil Quarzküvette durchgeführt. Nur mit einer Quarzküvette ist es möglich, noch eine Absorption in einem Wellenlängenbereich bis 190 nm zu messen. Andere Küvetten, wie z.B. Glasküvetten, absorbieren ab einem Wellenlängenbereich von 500 nm und sind deshalb ungeeignet, da der für Proteine relevante Bereich bei niedrigeren Wellenlängen liegt.

Vor jeder Messung wurde eine Basislinie aufgenommen, die später mit der Messung verrechnet wurde. Hierzu wurde ein Spektrum des Lösungsmittels vermessen. Alle Küvetten wurden mit einer Küvetten- Reinigungslösung (Hellmanex®, von Hellma) gereinigt, um zu gewährleisten, dass sich keine Protein- oder Nanopartikel-Rückstände in der Küvette befinden. Hierfür wurde eine 1 %ige Lösung der Reinigungslösung angesetzt und die Küvetten für 15 Minuten in der Hitze (50-60 °C) gereinigt und anschließend mit Reinstwasser gespült.

### 3.3.4. Bestimmung von Sekundärstrukturanteilen

Bei helixreichen Proteinen lässt sich der  $\alpha$ -Helix-Anteil anhand der CD-Spektren nach der Methode von *Lu et al.* berechnen (Lu et al. 1987). Die Methode findet in der Literatur eine breite Anwendung (Xiao et al. 2009; Shang et al. 2007; Ying et al. 2005; Wang et al. 2001). Um den  $\alpha$ -Helix-Anteil im Protein zu bestimmen, muss der Mess-Wert bei 208 nm, der charakteristisch für die  $\alpha$ -Helix ist, zunächst in die molare Elliptizität umgerechnet werden.

$$[\Theta] = \frac{\Theta_{208\text{nm}} \cdot M}{10 \cdot d \cdot N_{\text{AS}} \cdot c_{\text{Protein}}} \quad (45)$$

$\Theta_{208\text{nm}}$  = Elliptizität [mdeg]

$d$  = Schichtdicke Küvette [cm]

$M$  = Molare Masse Protein [ $\text{g mol}^{-1}$ ]

$N$  = Anzahl der Aminosäuren im Protein

Dieser Wert ist unabhängig von der Proteinkonzentration, der Anzahl der Aminosäuren im Protein und der Schichtdicke der Küvette. Die Berechnung des  $\alpha$ -Helix-Anteils erfolgt dann mit folgender Formel:

$$\text{Helix}[\%] = \left[ \frac{-[\Theta]_{208\text{nm}} - 4000 \text{ Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}}{33000 - 4000 [\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}]} \right] \cdot 100 \quad (46)$$

Dabei wird die molare Elliptizität für die reine  $\beta$ -Form, welche bei 4000 liegt von der reinen  $\alpha$ -Helix, welche ihren Messwert bei 3300 hat, subtrahiert.

Das CD-Spektrum eines Proteins setzt sich aus einer Linerarkombination verschiedener Sekundärstrukturanteile wie  $\alpha$ -Helix, paralleles und antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, Turns und ungeordneten Strukturen (Random Coil) zusammen. Für die quantitative Auswertung dieser Spektren ist eine Dekonvolution des Spektrums notwendig. Hierfür steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung wie zum Beispiel CDNN (Böhm 1996; Böhm et al. 1992; Perczel und Fasman 1992), SELCON3 (Johnson 1999), CONTIL/LL (Sreerama und Woody 2000), CDSSTR (Sreerama und Woody 2000; Böhm et al. 1992). Für die Ermittlung der Sekundärstruktur-Anteile wurde in dieser Arbeit die Methode von *Böhm et al.* gewählt, da die ermittelten  $\alpha$ -Helix-Anteile gut mit den berechneten  $\alpha$ -Helix-Anteilen nach der Methode von *Lu et al.* übereinstimmten (Böhm et al. 1992; Lu et al. 1987).

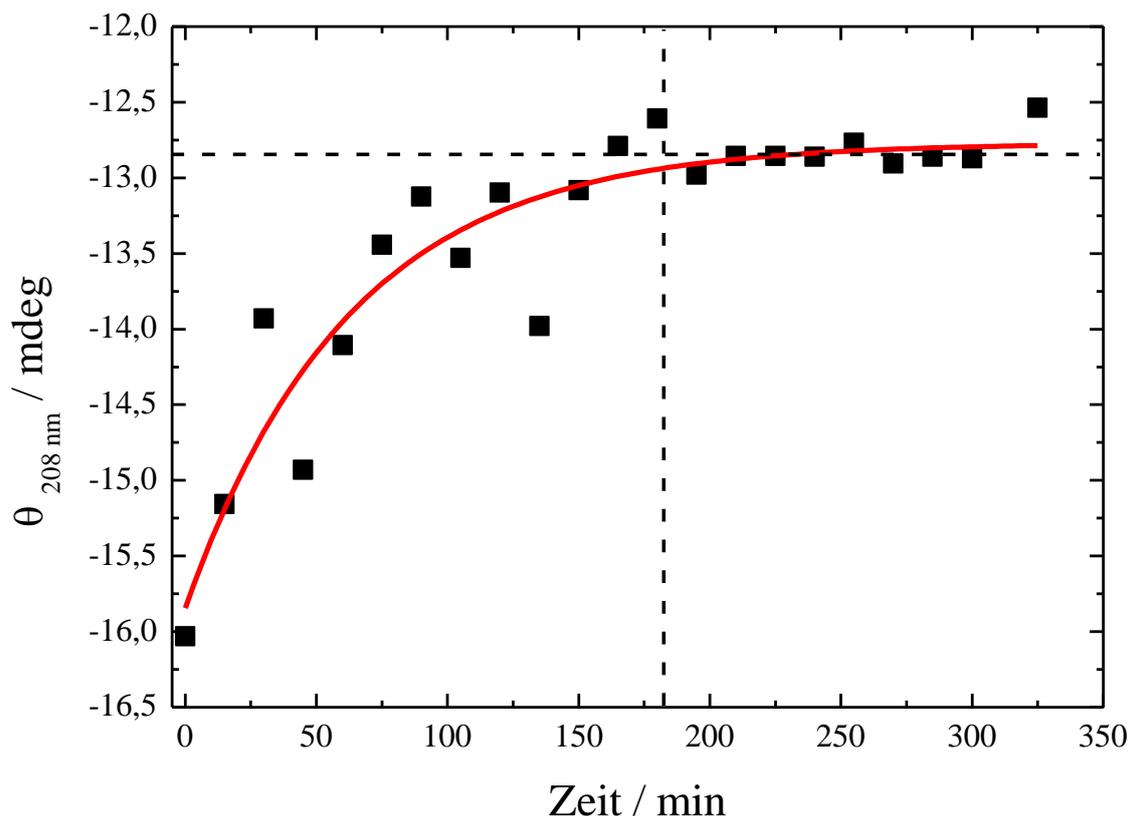
Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine nicht-algorithmische Methode. Diese basiert auf dem Modell eines neuronalen Netzwerkes. Hierfür werden die experimentellen Daten aus der CD-Messung im Wellenlängenbereich von 260 bis 180 nm einer Eingangsdatei zugeordnet, wobei jeder Wellenlänge exakt ein Neuron zugeordnet wird. Dabei wird jeder der Eingangswerte über eine Signalverknüpfung jedem Ausgangswert zugeordnet, d.h. jedes Ausgangsneuron enthält die Informationen aller Eingangsneuronen. Als Ausgangswert erhält man fünf Neuronen, die jeweils für die Sekundärstrukturanteile  $\alpha$ -Helix, paralleles-, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, Turns und Random Coil Anteile. Zwischen diesen beiden Ebenen gibt es noch eine weitere Zwischenebene. Hier werden die Daten von -1.0 bis 1.0 normiert und durch eine geeignete Funktion angepasst.

Die Methode des neuronalen Netzwerkes ist in der kommerziellen Software CDNN, welche von *Böhm et al.* entwickelt wurde, enthalten. Hier basiert die Zwischenebene im neuronalen Netzwerk auf einem Backpropagation-Netzwerk. Das bedeutet, dass die Software einen

Basissatz von Proteinen mit bekannten Proteinstrukturanteilen enthält und diese adaptiert hat. Dabei gilt, dass jeder Anteil einer der fünf Sekundärstrukturen  $k$  zwischen Null und Eins liegen muss und die Summe aller Sekundärstrukturanteile Eins ergibt.

### 3.3.5. Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten

Eine erste quantitative Beschreibung des Adsorptions-/Desorptionsprozesses von Proteinen auf Nanopartikel-Oberflächen erfolgte von Röcker *et al.* mittels Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie (Röcker *et al.* 2009). Nachteil dieser Methode ist, dass für die Ermittlung von  $K_D$ -Werten fluoreszierende Nanopartikel benötigt werden. Für die Untersuchung des Adsorptions-/Desorptionsprozesses von Proteinen mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurde zunächst im Rahmen von Vorversuchen die Dauer der Einstellung eines Adsorptions-/Desorptionsgleichgewichtes untersucht.



**Abbildung 39:** Zeitabhängiges CD-Signals bei 208 nm von Bovinem Serum-Albumin ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln ( $1.25 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ )

Mit Hilfe von konzentrationsabhängigen CD-Messungen und den bestimmten  $\alpha$ -Helix-Anteilen der Proteine in Interaktionsprozess mit der Nanopartikel-Oberfläche lassen sich Gleichgewichtskonstanten bestimmen (Treuel et al. 2010). Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden (Li et al. 2006) bildet sich eine Proteinhülle um das Nanopartikel, so dass man von einem Gleichgewicht ausgehen kann. Um die benötigte Zeit für die Gleichgewichtseinstellung zu testen, wurden zu einer BSA-Lösung Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel hinzugegeben. Die Lösung wurde gemischt und sofort in eine Quarzküvette gefüllt und alle 15 Minuten bei 208 nm gemessen (Abbildung 39).

Damit konnte die Denaturierung des Bovinen Serum-Albumins auf der Nanopartikel-Oberfläche beobachtet werden. Nach drei Stunden blieb das Signal konstant bei  $12.8 \pm 0.3$  mdeg. Damit kann man folgende Gleichung aufstellen:



*P = Proteine in Lösung*

*S = freie Nanopartikel-Oberflächenplätze*

*PS = auf der Nanopartikel-Oberfläche gebundene Proteine*

Durch diese Annahme kann man aus folgender Gleichung eine Gleichgewichtskonstante für den Desorptionsprozess erhalten:

$$K_D = \frac{[P] \cdot [S]}{[PS]} \quad (48)$$

Der Literatur nach (Jiang et al. 2010) bildet sich die Proteinhülle in einer Monolage aus. Die Anzahl der adsorbierten Proteine pro Nanopartikel lässt sich aus dem Oberflächenverhältnis des Nanopartikels zum Protein berechnen, d.h. Oberflächenplätze pro Nanopartikel. In einer monodispersen Nanopartikel-Lösung mit bekannter Konzentration lässt sich die Konzentration der Oberflächenplätze aus der Summe der Nanopartikel  $n_i$  mal der Anzahl der Proteine, die auf die Nanopartikel-Oberfläche adsorbieren, berechnen ( $N_{\max}$ ):

$$[S] = \frac{\sum_i n_i \cdot N_{\max}}{N_A} \quad (49)$$

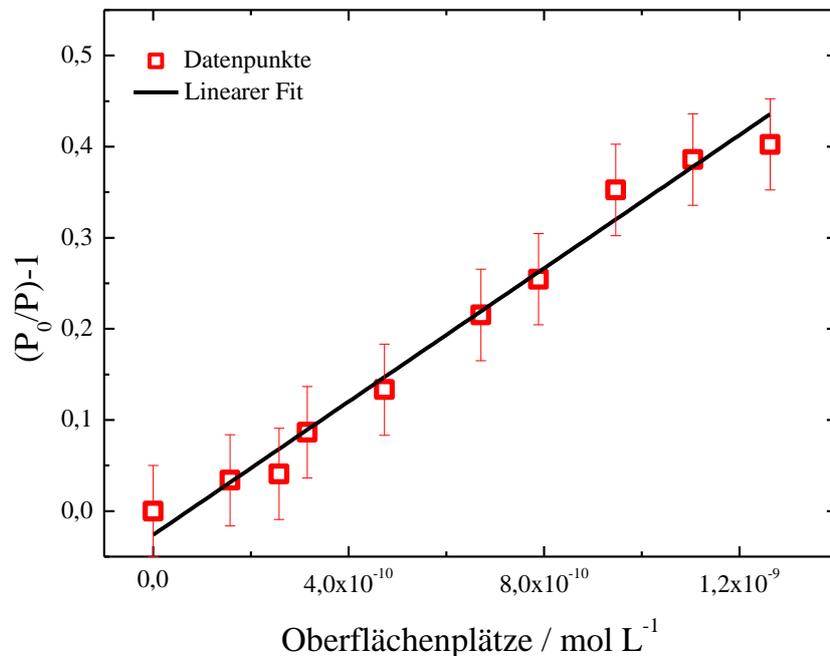
Die Menge der adsorbierten Proteine [PS] lässt sich durch Subtraktion der eingesetzten Proteinkonzentration [P<sub>0</sub>] und der freien Proteinkonzentration in der Lösung [P] berechnen:

$$[P_0] - [P] = [PS] \quad (50)$$

Durch Substitution von Gleichung (48) und Gleichung (50) erhält man folgenden Ausdruck:

$$\frac{[P_0]}{[P]} - 1 = [S] \cdot \frac{1}{K_D} \quad (51)$$

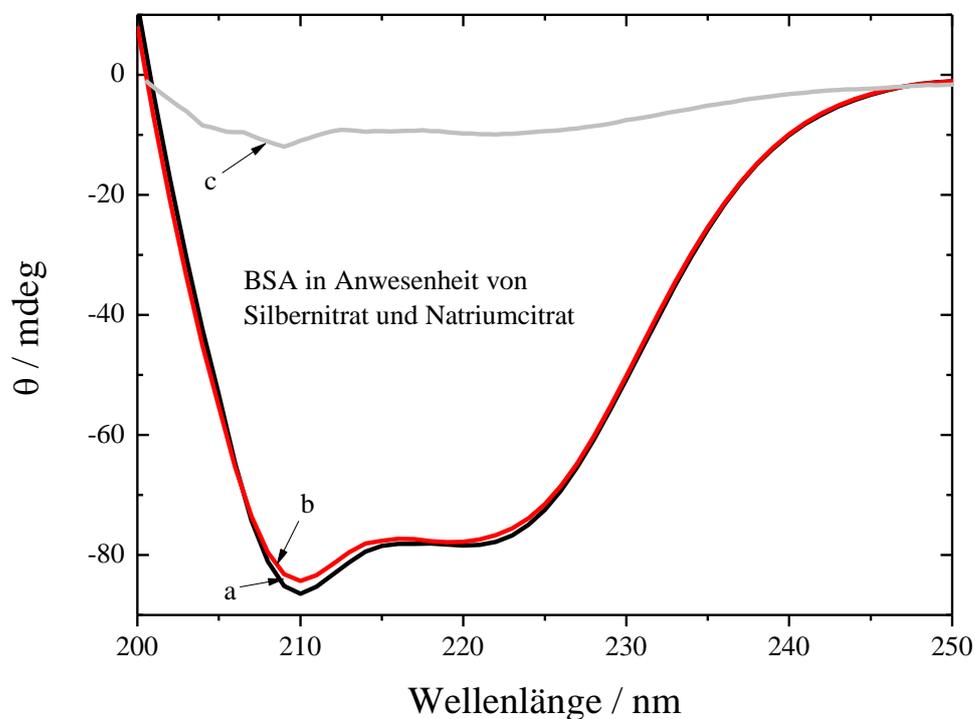
Durch die Auftragung von [P<sub>0</sub>]/[P]-1 gegen die Oberflächen-Konzentration [S] erhält man aus dem reziproken Wert der Steigung einen K<sub>D</sub>-Wert. Im Folgenden wird exemplarisch die Auswertung gezeigt.



**Abbildung 40:** Ermittlung eines K<sub>D</sub>-Wertes am Beispiel von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (90 nm)

### 3.4. CD-Messungen von Bovinem Serum-Albumin in Gegenwart von Ionen

Ein wichtiger Aspekt in der Untersuchung von Proteinstrukturen in Gegenwart von Nanopartikeln, ist der Einfluss von Ionen. In der Nanopartikel-Dispersion befinden sich noch Ionen, die entweder aus der Synthese stammen oder sich durch die Auflösung der Nanopartikel bilden. Es wurde die Proteinstruktur von Bovinem Serum-Albumin in Gegenwart der Edukte (Natriumcitrat und Silbernitrat) der Nanopartikel-Synthese untersucht. Die nachfolgende Abbildung zeigt CD-Spektren von Bovinem Serum-Albumin in Gegenwart der Ionen.



**Abbildung 41:** CD-Spektren von Bovinem Serum-Albumin  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln und den Edukten der Nanopartikel-Synthese, **a:** CD-Spektrum von Bovinem Serum-Albumin in Anwesenheit von Natriumcitrat ( $c(\text{NaCitrat}) = 0.19 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von Bovinem Serum-Albumin in Gegenwart von Silbernitrat, ( $c(\text{AgNO}_3) = 0.15 \text{ mg mL}^{-1}$ ) **c:** CD-Spektrum von Bovinem Serum-Albumin in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln ( $2 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ )

Die gewählten Konzentrationen des Silbernitrates und Natriumcitrates entsprechen den Edukt-Konzentrationen für die Nanopartikel-Synthese und sind demnach um ein Vielfaches höher als in der Nanopartikel-Dispersion. In Gegenwart des Natriumcitrates

( $c(\text{NaCitrat}) = 0.19 \text{ mg mL}^{-1}$ ) konnten keine Strukturänderungen des Bovinen Serum-Albumins festgestellt werden. Das Protein blieb im nativen Zustand. In Gegenwart des Silbernitrat ( $c(\text{AgNO}_3 = 0.15 \text{ mg mL}^{-1}$ ) konnte eine Strukturänderung des Bovinen Serum-Albumins festgestellt werden. In Gegenwart der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel konnte eine fast vollständige Denaturierung des Proteins bestimmt werden. Hierbei sei zu erwähnen, dass die Silbernitrat-Konzentration der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel und der Silbernitrat-Lösung identisch waren. Es konnte also gezeigt werden, dass die Denaturierung des Proteins im Wesentlichen aus der Interaktion mit der Nanopartikel-Oberfläche stammt und wenig durch Ionen beeinflusst wird.

### 3.5. Quantifizierung der Adsorption von Proteinen auf Nanopartikel-Oberflächen

Um die Adsorption von Proteinen auf die Nanopartikel-Oberfläche zu quantifizieren und die Methode zur Bestimmung von Affinitätskonstanten mittels der CD-Spektroskopie zu validieren, wurden Dialyseexperimente mit Nanopartikel-Protein-Konjugaten durchgeführt. Dieses diente dazu die auf der Nanopartikel-Oberfläche adsorbierten und freien Proteine voneinander zu trennen und sie anschließend mit einem Bradford-Protein-Assay zu quantifizieren (Bradford 1976).

#### 3.5.1. Dialyse

Unter Dialyse versteht man einen Stoffaustausch von Molekülen, wie etwa Proteinen oder Ionen in Lösung, durch eine Membran. Das Ziel ist, mit diesem konzentrationsgetriebenen Membranprozeß kleinere Moleküle / Ionen von größeren, die in der Membran zurückgehalten werden, quantitativ zu trennen. Dieser Vorgang wird als Osmose bezeichnet, dessen Triebkraft die unterschiedlichen chemischen Potentiale der Lösungen in und außerhalb des Dialyseschlauches sind. Die Dialyse findet Anwendung im Entsalzen oder Aufkonzentrieren von Proteinlösungen oder in der Entfernung von Kontaminationen z.B. aus Plasma oder Serum.

Für den Trennvorgang stehen Membranen mit unterschiedlichen Trenngrößen zur Verfügung, dem so genannten „molecular weight cutoff“ (MWCO). Der MWCO bezeichnet die Porengröße der Membran und damit auch die maximale Größe des Moleküls, das die Membran noch ungehindert passieren kann, wobei man insgesamt berücksichtigen muss, dass

es sich bei diesem Wert nur um eine Richtgröße handelt. Ursächlich dafür ist nicht nur die Variabilität der Poren im Herstellungsprozess, sondern auch die Ladung der Membran / Moleküle, der Diffusionsgradient und die Hydratisierung der Moleküle. Gerade bei Proteinen gibt es diese scharfe Trennung nicht, da einige Proteine z.B. aufgrund ihrer räumlichen Gestalt, Ladung, Neigung zu Dimerbildung etc. effizienter durch die Membran diffundieren als andere.

In dieser Arbeit wurde die Methode der Gleichgewichtsdialyse verwendet, d.h. die Dialyselösung wurde während der gesamten Dialyse nicht gewechselt, sondern ausschließlich bis zur Gleichgewichtseinstellung dialysiert. Zu beachten ist dabei eine ausreichende Dialysezeit. Die Diffusionsgeschwindigkeit  $v$  wird mit dem 1. Fick'schen Gesetz beschrieben (Moore 1990):

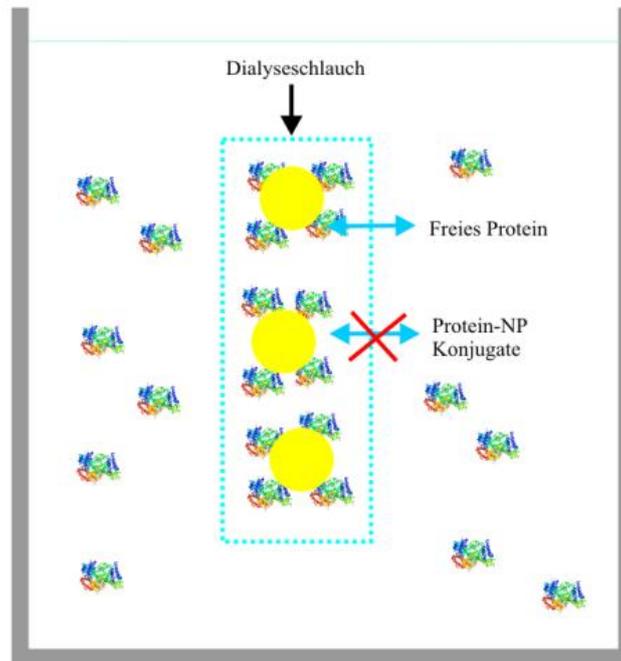
$$v = -D \cdot A \frac{dc}{dx} \quad (52)$$

$D$  ist in dieser Gleichung der Diffusionskoeffizient,  $A$  die Austauschfläche der Membran und der  $\frac{dc}{dx}$  Konzentrationsgradient. In Voruntersuchungen wurde nach einer Dialysezeit von 16 Stunden eine konstante Proteinkonzentration ermittelt.

### 3.5.2. Dialyse-Experimente

Die Dialyseexperimente wurden mit BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln durchgeführt. Alle Glasgeräte wurden vor den Experimenten mit 2 %igem Hellmanex® Reinigungskonzentrat gereinigt und anschließend mehrfach mit Reinstwasser gespült. Für die Dialyseexperimente wurde ein Dialyseschlauch aus Cellulose-Ester mit einem „molecular weight cut off“ (MWCO) von  $100.000 \text{ g mol}^{-1}$  (Spectrapor®) verwendet. Die Konzentration des Proteins betrug  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Die Konzentration der Nanopartikel wurde variiert. Alle Proben wurden 30 Minuten equilibriert, bevor sie in den Dialyseschlauch gefüllt wurden. 5 mL der vorbereiteten Probe wurden in den Schlauch gefüllt, der Dialyseschlauch mit Klammern verschlossen und die Gefäße mit Parafilm abgedichtet, um ein Verdunsten von Wasser auszuschließen. Anschließend wurden die Proben 16 Stunden bei Raumtemperatur ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) gegen 45 mL Reinstwasser dialysiert. Für jede Nanopartikel-Konzentration wurde

eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Das Prinzip der Dialyse wird anhand der nachfolgenden Grafik erläutert.



**Abbildung 42:** Aufbau und Prinzip des Dialyse Experimentes: nicht gebundene Proteine können durch die Dialysemembran hindurch diffundieren, während an die Nanopartikel-Oberfläche gebundene Proteine im Dialyseschlauch zurück bleiben

Abbildung 42 zeigt schematisch das Prinzip der Dialyse. Während freie BSA Moleküle noch durch die Cellulose-Ester-Membrane hindurch diffundieren können, verbleiben die Nanopartikel und Nanopartikel-Protein-Konjugate im Dialyseschlauch, so dass sich im Dialysat nur freie Proteine befinden.

### 3.5.3. Präparation des Coomassie Brilliant Blue G250 Farbstoffes

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 (Triphenylmethanfarbstoff) wurde für die Durchführung der Bradford-Protein-Assays benötigt. 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 wurden in 47 mL absolutem Ethanol gelöst. Es wurden 100 mL konzentrierte Phosphorsäure hinzugegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Reinstwasser auf 1 L aufgefüllt, die Lösung mit Hilfe eines Papierfilters (Whatmanfilter Nr. 1) abfiltriert und unter Lichtausschluss im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt (Eckert und Kartenbeck 1997).

### 3.5.4. Bradford-Protein-Assay

Der Bradford-Protein-Assay dient zur quantitativen Bestimmung von Proteinen in Lösung. Der dafür verwendete Triphenylmethanfarbstoff bindet an kationische und unpolare Seitenketten von Proteinen. Dabei geht die kationische Form des Farbstoffes, welche eine rote Farbe besitzt, in die ungebundene und anionische Form, welche durch eine Blaufärbung charakterisiert ist, über (Compton und Jones 1985). Dieses kann photometrisch erfasst und damit die Proteinmenge bestimmt werden.

Nach den Dialyseexperimenten wurden 100 µL Probe des Dialysats entnommen und mit 900 µL des Farbstoff Coomassie Brilliant Blau 5-10 Minuten inkubiert und anschließend ein UV-Vis-Spektrum aufgenommen und die Absorption bei 595 nm ermittelt (Eckert und Kartenbeck 1997; Holtzhauer 1997; Kruger 1994). Für alle Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung. Die UV-Vis-Spektren wurden in Einmalküvetten aufgenommen.

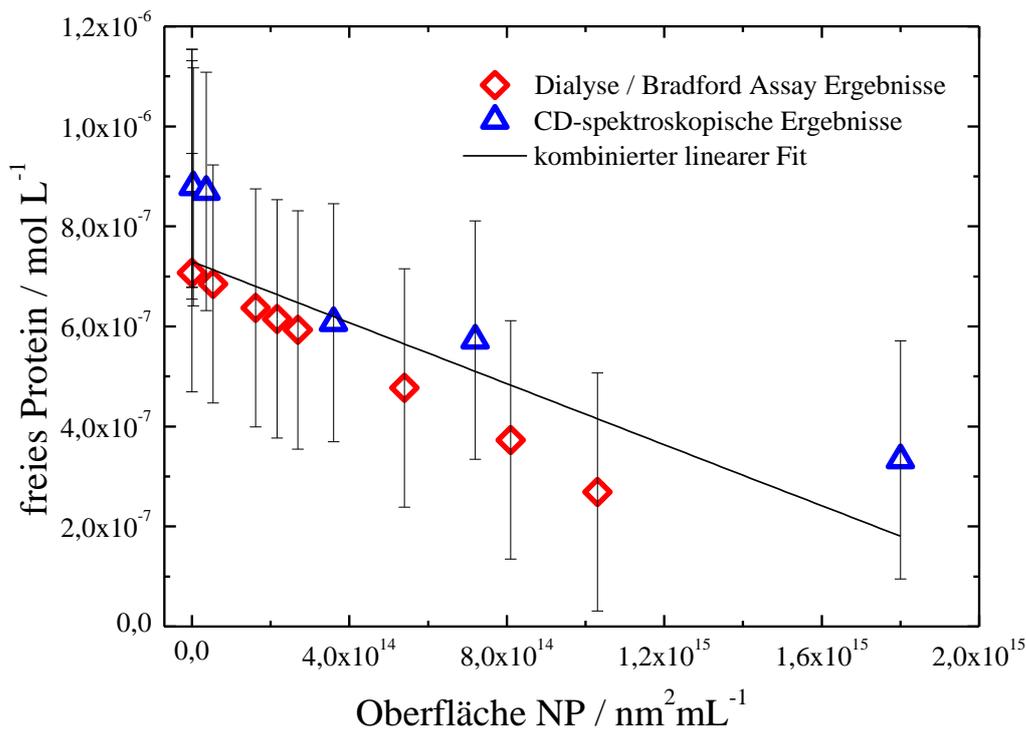
### 3.5.5. Validierung mit Dialyse / Bradford-Protein-Assay

Anhand der CD-Messungen wurde vermutet, dass das Bovine Serum-Albumin vollständig auf der Nanopartikel-Oberfläche denaturiert. Für diese Annahme müsste die Menge des denaturierten Proteins, welche im CD-Spektrum ermittelt wurde mit der Menge des adsorbierten Proteins übereinstimmen. Bei der Auswertung der CD-Spektren wurde angenommen, dass der Anteil an nativem Protein sich in Lösung befindet und der denaturierte Anteil auf der Nanopartikel-Oberfläche adsorbiert ist.

Deshalb wurden Dialyseexperimente von BSA und Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln durchgeführt um zu testen, ob diese Annahmen stimmen. Die Dialyse-Experimente wurden nach der in Abschnitt 3.5.2. beschriebenen Versuchsanleitung durchgeführt und die Proteinmenge im Dialysat mit einem Bradford-Protein-Assay bestimmt.

Abbildung 43 bestätigt die getätigten Annahmen. Die Auftragung zeigt die ermittelte Proteinmenge im Dialysat aufgetragen gegen die verwendete Nanopartikel-Konzentration. Als Vergleich wurde die ermittelte freie Proteinmenge in der CD-Spektroskopie gegen die entsprechende Nanopartikel-Konzentration aufgetragen.

Die Proteinmenge im Dialysat stimmt mit den ermittelten Werten aus den CD-Daten überein. Das heißt, dass das Bovine Serum-Albumin vollständig auf der Nanopartikel-Oberfläche denaturiert.



**Abbildung 43:** Vergleich der Dialyse Ergebnisse mit den Circular dichroismus-Messungen, die Fehlerbalken wurden entsprechend der Standardabweichung ermittelt

### 3.6. Fluoreszenzspektroskopie

#### 3.6.1. Apparatur

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde ein fluorimetrischer Assay mit einem fluoreszierenden Substrat verwendet. Dieser beruht auf der Abspaltung des Farbstoffes ( z.B. 4-Methyl-Cumarin) vom Peptid. Die Spaltung erfolgt im aktiven Zentrum des Enzyms. Für die Messungen wurde ein Cary Eclipse Fluoreszenz-Spektrometer (Varian Instruments) mit Microplate Reader (Nunc, 96-Mikrotiterplatten, weiß) verwendet. Die Anregungswellenlänge betrug 380 nm und die Emissionswellenlänge 460 nm (Ex. Slit 10 nm, Em. Slit 20 nm, Detektor 450 V).

### 3.6.2. Messungen

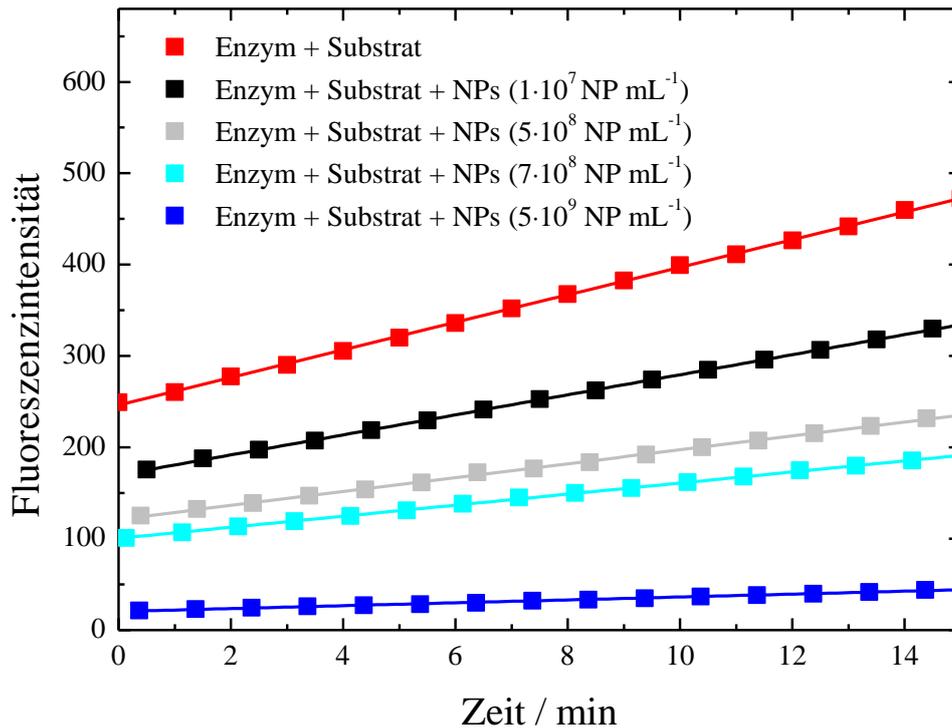
Es wurde die Aktivität von Enzymen in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von positiv- und negativ- geladenen Gold-Nanopartikeln bestimmt. Zu 5  $\mu\text{L}$  einer Enzym-Stammlösung wurden Acetatpuffer (pH 7) und verschiedenen Mengen an Nanopartikeln zugefügt, so dass das Gesamtvolumen 195  $\mu\text{L}$  betrug. Die Enzym Konzentration wurde in allen Aktivitätsmessungen konstant gehalten. Alle Proben wurden jeweils 3 h bei Raumtemperatur equilibriert. Anschließend wurde gleichzeitig zu allen Proben 5  $\mu\text{L}$  einer 1 M Substratlösung hinzugefügt und nach 2 min Equilibrierungszeit 15 min lang gemessen. Für jede Nanopartikel-Konzentration erfolgte eine Dreifachbestimmung.

### 3.6.3. Bestimmung der Enzymaktivität

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde die Steigung des Verlaufes der ersten 5 min berechnet. Die Aktivität des Enzyms wird mit Hilfe der Steigung der Auftragung der Fluoreszenz-Intensität gegen die Zeit ermittelt (Formel 53).

$$\text{Aktivität}[\%] = \frac{\text{Steigung (Enzym + Substrat + Nanopartikel)}}{\text{Steigung (Enzym + Substrat)}} \cdot 100 \quad (53)$$

Abbildung 44 stellt die Verläufe der Fluoreszenzintensität eines Enzyms in An- und Abwesenheit von Nanopartikeln in Abhängigkeit der Zeit am Beispiel von Trypsin und PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln dar.



**Abbildung 44:** Ermittlung der Hemmung des Enzyms mit Hilfe der Geradensteigung aus der Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit am Beispiel von Trypsin und PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln

### 3.6.4. Desorptionsexperimente mit Trypsin

Für die Desorptionsversuche wurden positiv und negativ geladene Gold-Nanopartikel mit Trypsin 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trypsin-Konzentration betrug  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  und entsprach dem relativen Verhältnis einer Monolage an adsorbierten Trypsin Molekülen auf die Nanopartikel-Oberfläche. Die Lösung wurde 60 min bei  $20^\circ\text{C}$  und  $10000 \text{ U min}^{-1}$  ab zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Enzymmenge mit Hilfe eines Bradford-Protein-Assays bestimmt und die Enzymaktivität gemessen. Die an die Nanopartikel gebundenen Enzyme wurden in 10 mL Reinstwasser dispergiert und 4 Stunden bei Raumtemperatur equilibriert. Anschließend wurden durch Zentrifugation (60 min,  $20^\circ\text{C}$ ,  $10000 \text{ U min}^{-1}$ ) die freien Enzyme von den an die Nanopartikel gebundenen getrennt und der Überstand durch einen 3 kD Celluloseester Filter bei 45 min bei  $14000 \text{ U min}^{-1}$  auf 1 mL aufkonzentriert. Die Menge der desorbierten Enzyme wurde mit einem Bradford-Protein-Assay quantifiziert und die Enzymaktivität bestimmt.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

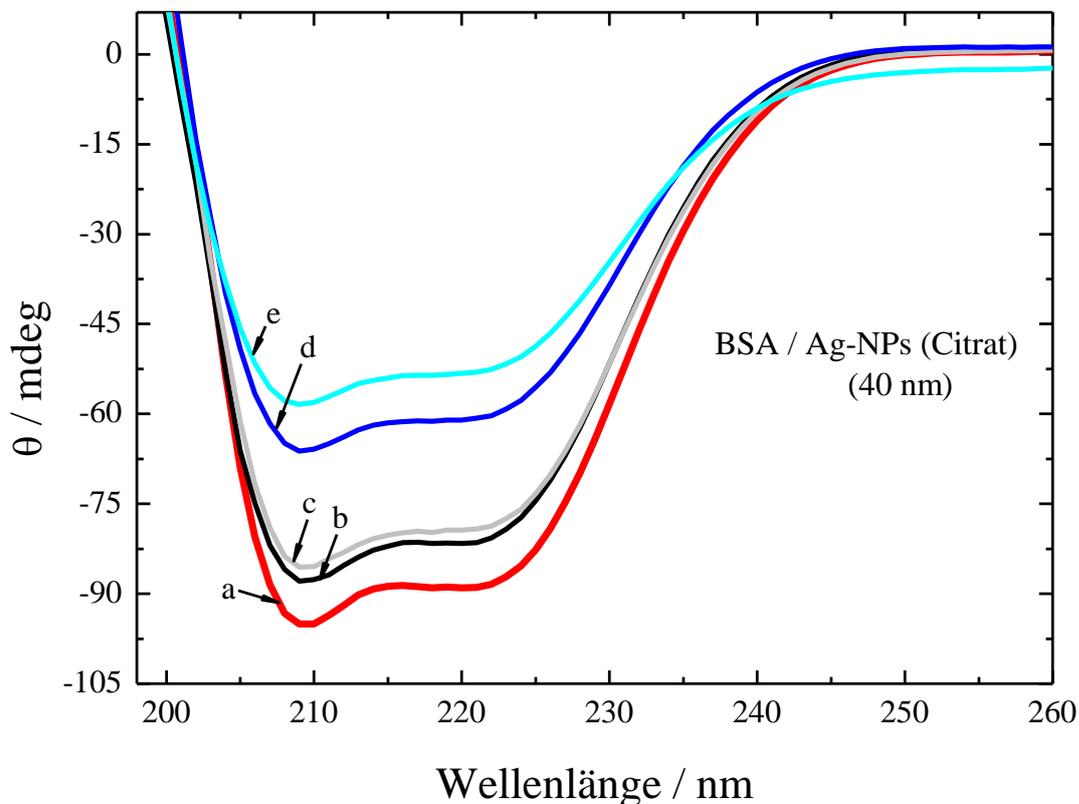
### 4.1. Einfluss der Oberflächen-Funktionalisierung auf die Proteinadsorption

Um den Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel im Interaktionsprozess mit Proteinen zu ermitteln, wurden CD-Messungen von BSA in Gegenwart von unterschiedlich funktionalisierten Gold- und Silber-Nanopartikeln durchgeführt. Zum einen wurden Citrat-stabilisierte Nanopartikel verwendet, bei denen die Proteine direkt mit der Metall-Oberfläche interagieren können und zum anderen wurden die gleichen Nanopartikel verwendet, die mit einer Polymerschicht aus (Poly)vinylpyrrolidon (PVP) funktionalisiert waren. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden kommerzielle Polystyrol-Nanopartikel (Polybead®, Polyscience Inc.) untersucht. Die Polystyrol-Nanopartikel enthalten laut Hersteller anionische Gruppen (Sulfatester) auf der Oberfläche. Des Weiteren wurden Siliziumdioxid-Nanopartikel mit verschiedenen Durchmessern und Quantenpunkte im Interaktionsprozess mit Bovinem Serum-Albumin untersucht.

#### 4.1.1. Wechselwirkung von Bovinem Serum-Albumin (BSA) mit metallischen Nanopartikeln

Für die Untersuchung der Interaktion von BSA mit metallischen Nanopartikeln wurden Citrat-stabilisierte Gold- und Silber-Nanopartikel verwendet. Hier kann das Protein direkt mit der Nanopartikel-Oberfläche interagieren. Die Citrat-stabilisierten Nanopartikel wurden nach der Synthese einmal mit Hilfe einer Zentrifugation und anschließendem Redispersieren von Ionen und Edukt-Resten getrennt. Die Silber- und Gold-Konzentration wurde mit einer Elementaranalyse bestimmt und in eine Nanopartikel-Konzentration umgerechnet. Für die Messungen wurde eine konstante Proteinkonzentration verwendet und die Nanopartikel-Konzentration variiert. Alle Proben wurden vor der Untersuchung 3 Stunden bei Raumtemperatur equilibriert und bei Raumtemperatur vermessen.

Folgende Abbildung zeigt eine Auswahl der konzentrationsabhängigen CD-Spektren von Bovinem Serum-Albumin in Gegenwart der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel.

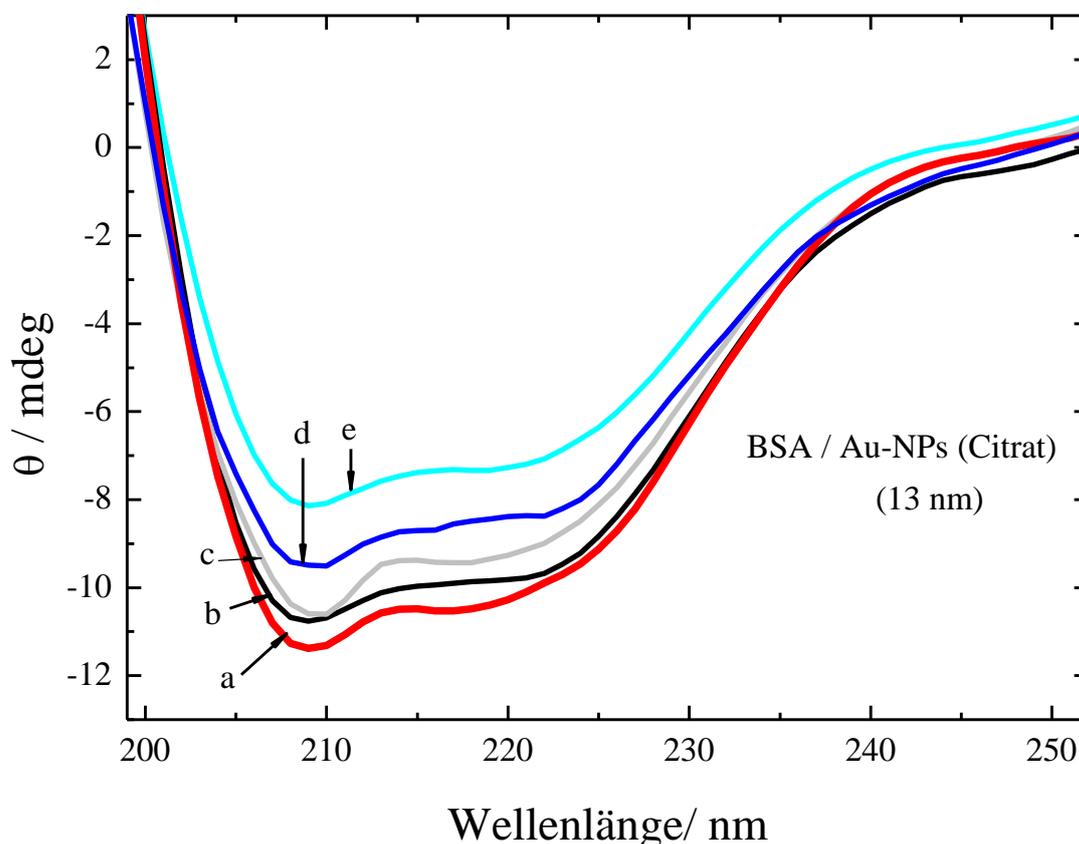


**Abbildung 45:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm), **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.52 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $1.7 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $3.4 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $5.1 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **e:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $6.5 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$

Die Proteinkonzentration betrug bei allen konzentrationsabhängigen CD-Messungen  $0.52 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $7.8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Für das reine BSA wurde ein Helix-Anteil von 63 % bestimmt. Die Nanopartikel-Konzentration wurde von  $3.4 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$  bis  $6.5 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$  variiert. Die CD-Spektren zeigen eine konzentrationsabhängige Denaturierung des Proteins. Bei der höchsten verwendeten Nanopartikel-Konzentration betrug der Helix-Anteil 31 %, d.h. die Hälfte der vorhandenen Proteinstrukturen ist in Gegenwart der Nanopartikel denaturiert. Die mit Hilfe der konzentrationsabhängigen Spektren bestimmte Gleichgewichtskonstante

betrug 20 nM. Dieser Wert zeigt eine hohe Affinität des Proteins, an die Nanopartikel-Oberfläche zu binden.

Die gleichen Experimente wurden mit Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln durchgeführt. Eine Auswahl der konzentrationsabhängigen CD-Spektren zeigt Abbildung 46.



**Abbildung 46:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (13 nm), **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.52 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (13 nm) mit einer Konzentration von  $2.3 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (13 nm) mit einer Konzentration von  $4.6 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (13 nm) mit einer Konzentration von  $2.1 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , **e:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (13 nm) mit einer Konzentration von  $2.7 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$

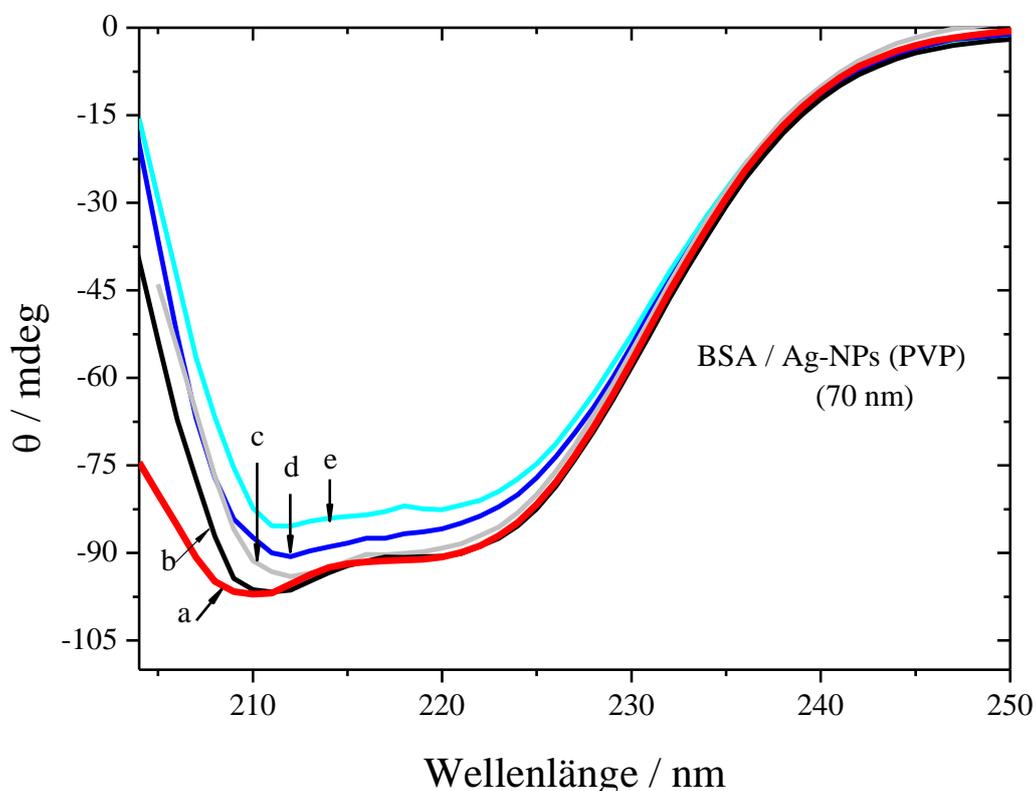
Die Konzentration des BSA betrug  $0.053 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $7.8 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ). Die Gold-Nanopartikel Konzentration wurde von  $2.3 \cdot 10^{10}$  bis  $4.5 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$  variiert. Für die höchste Nanopartikel-Konzentration wurde ein  $\alpha$ -Helix-Anteil von 45 % bestimmt. Die Berechnung der Gleichgewichtskonstante lieferte einen Wert von 33 nM und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie bei den Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln.

#### 4.1.2. Wechselwirkung von Bovinem Serum-Albumin (BSA) mit Polymer-funktionalisierten Nanopartikeln

Für die Untersuchung des Einflusses einer Oberflächenfunktionalisierung wurden die Gold- und Silber-Nanopartikel mit einer Polymerschicht umfunktionalisiert. Hierfür wurde (Poly)vinylpyrrolidon (PVP) verwendet.

Die CD-Messungen erfolgten bei einer konstanten Protein-Konzentration und unter Variation der Nanopartikel-Konzentration. Alle Proben wurden 3 Stunden bei konstanter Temperatur inkubiert und bei 20 °C vermessen.

In der folgenden Abbildung ist eine Auswahl der konzentrationsabhängigen CD-Spektren von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln gezeigt.



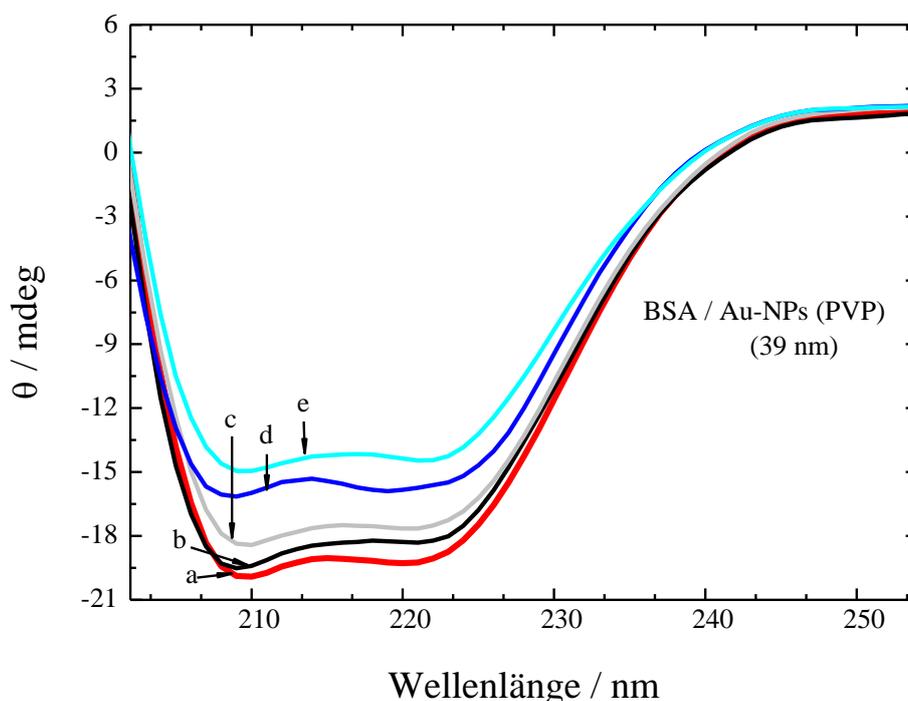
**Abbildung 47:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln (70 nm) in unterschiedlichen Konzentrationen, **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.52 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln (70 nm) mit einer Konzentration von  $2.4 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln (70 nm) mit einer Konzentration von  $1.4 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln (70 nm) mit einer Konzentration von  $1.7 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , **e:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln (70 nm) mit einer Konzentration von  $1.9 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$

## Ergebnisse und Diskussion

Die Konzentration des BSA betrug  $0.52 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $7.8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Die Nanopartikel-Konzentration wurde von  $2.4 \cdot 10^{10}$  bis  $4.8 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$  variiert. Bei der höchsten Nanopartikel-Konzentration betrug der  $\alpha$ -Helix-Anteil des Serum-Albumins 37 %. Die Gleichgewichtskonstante für den Adsorptions-/Desorptionsprozess des BSA auf die PVP-funktionalisierte Nanopartikel-Oberfläche betrug 500 nM und ist damit 25-mal größer als die Gleichgewichtskonstante von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln. Das BSA zeigt demnach eine erheblich geringere Affinität, auf die Polymer-funktionalisierte Nanopartikel-Oberfläche zu adsorbieren.

Es erfolgte ebenfalls eine Untersuchung des Adsorptions-/Desorptionsgleichgewichtes von BSA auf Gold-Nanopartikel-Oberflächen, welche mit dem PVP funktionalisiert waren.

Einige exemplarische CD-Spektren von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln sind in Abbildung 48 dargestellt.

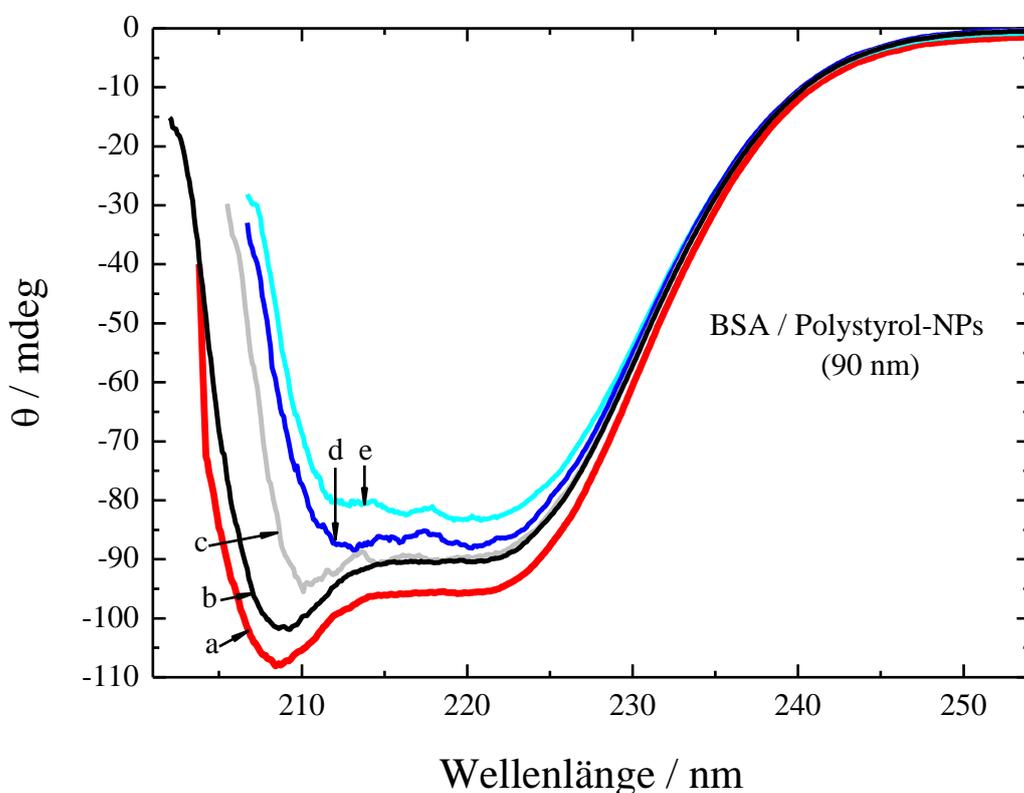


**Abbildung 48:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (39 nm) in unterschiedlichen Konzentrationen, **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.104 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (39 nm) mit einer Konzentration von  $8.9 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (39 nm) mit einer Konzentration von  $2.1 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (39 nm) mit einer Konzentration von  $2.4 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , **e:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (39 nm) mit einer Konzentration von  $2.7 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$

Die Untersuchung der Interaktion von BSA mit PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln erfolgte ebenfalls bei konstanter Protein-Konzentration und Variation der Nanopartikel-Konzentration. Die Inkubationszeit der Proben betrug 3 Stunden und die CD-Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Die Konzentration des BSA betrug  $0.104 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $1.56 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ). Die Gold-Nanopartikel Konzentration wurde von  $8.9 \cdot 10^{10}$  bis  $5.92 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$  variiert. Es wurde eine Gleichgewichtskonstante von 200 nM bestimmt. Auch hier wurde durch die Polymerschicht um das Nanopartikel, eine um das 10-fache höhere Gleichgewichtskonstante im Vergleich zu den Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln gefunden.

Abbildung 49 zeigt die CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Polystyrol-Nanopartikeln.



**Abbildung 49:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Polystyrol-Nanopartikeln (90 nm) bei unterschiedlichen Konzentrationen, **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.52 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Polystyrol-Nanopartikeln (90 nm) mit einer Konzentration von  $4.5 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Polystyrol-Nanopartikeln (90 nm) mit einer Konzentration von  $6.8 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Polystyrol-Nanopartikeln (90 nm) mit einer Konzentration von  $2.4 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , **e:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Polystyrol-Nanopartikeln (90 nm) mit einer Konzentration von  $9.1 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$

Um den Einfluss von Polymer-Schichten noch weiter zu untersuchen, wurde der Interaktionsprozess von BSA in Gegenwart von kommerziell erhältlichen Polystyrol-Nanopartikeln untersucht. Die Größe der Polystyrol-Nanopartikel wurde mit Hilfe der Brown'schen Molekularbewegung und TEM-Aufnahmen auf 90 nm bestimmt. Die Konzentration betrug  $4.55 \cdot 10^{14}$  NP mL<sup>-1</sup> (Angabe des Herstellers Polybead®) und wurde entsprechend mit Reinstwasser verdünnt. Die Probenvorbereitung und Vermessung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei den Citrat-stabilisierten und PVP-funktionalisierten Nanopartikeln. Folgende Abbildung zeigt einige der konzentrationsabhängigen CD-Spektren.

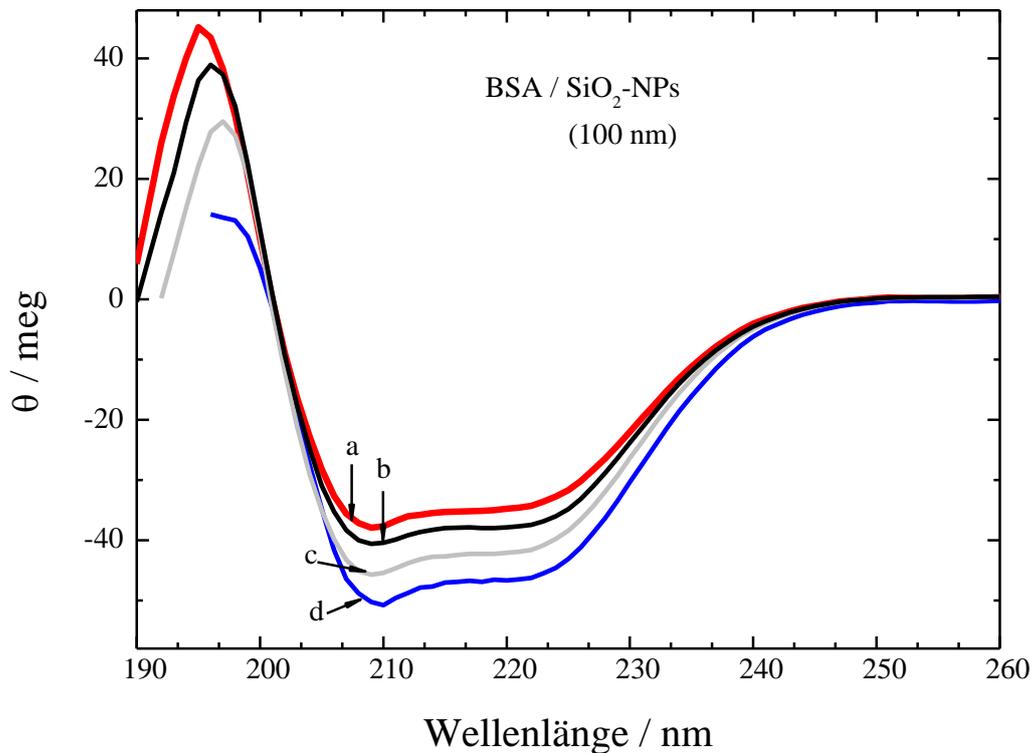
Die Konzentration des BSA betrug  $0.52 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $7.8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Die Polystyrol-Nanopartikel-Konzentration wurde im Bereich von  $2.28 \cdot 10^{10}$  bis  $5.92 \cdot 10^{11}$  NP mL<sup>-1</sup> variiert. Für die höchste Nanopartikel-Konzentration betrug der Helix Anteil 11 %. Die Gleichgewichtskonstante für den Adsorptions- / Desorptionsprozesses des Proteins auf die Nanopartikel-Oberfläche betrug  $1.2 \text{ } \mu\text{M}$ .

### **4.1.3. Wechselwirkung von Bovinem Serum-Albumin (BSA) mit Siliziumdioxid-Nanopartikeln**

Siliziumdioxid-Nanopartikeln werden biokompatible Eigenschaften zugesprochen (You et al. 2007). Das macht sie interessant für Anwendungen, bei denen die Nanopartikel in den menschlichen Körper gelangen. So findet man Siliziumdioxid-Nanopartikel unter anderem in Nahrungsergänzungsmitteln, da Siliziumdioxid-Nanopartikel die Rieselfähigkeit von pulverförmigen Lebensmitteln erhöhen (BUND 2008).

Es wurde die Interaktion von Bovinem Serum-Albumin mit Siliziumdioxid-Nanopartikeln verschiedener Größen untersucht. Die Siliziumdioxid-Nanopartikel wurden nach dem Stöber Verfahren synthetisiert und mit einem Perylenfarbstoff fluoreszenzmarkiert (Blechinger et al. 2010; Stöber et al. 1968). Die Nanopartikel wurden 10 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Konzentration des BSA betrug in allen Proben  $0.26 \text{ mg mL}^{-1}$ . Die BSA-Nanopartikel Proben wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Wellenlängenbereich von 260 bis 190 nm im CD-Spektrometer vermessen. Die Spaltbreite betrug  $1 \text{ } \mu\text{m}$  und der Scanschritt 1 nm. Die Konzentration der Siliziumdioxid-Nanopartikel wurde von  $2.5 \cdot 10^{11}$  bis  $3.0 \cdot 10^{12}$  NP mL<sup>-1</sup> variiert.

Exemplarische konzentrationsabhängige CD-Spektren von BSA in Gegenwart der Siliziumdioxid-Nanopartikel werden im nachfolgenden gezeigt (Abbildung 50).



**Abbildung 50:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Siliziumdioxid-Nanopartikeln (100 nm) bei unterschiedlichen Konzentrationen, **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.26 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Siliziumdioxid-Nanopartikeln (100 nm) mit einer Konzentration von  $5.0 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Siliziumdioxid -Nanopartikeln (100 nm) mit einer Konzentration von  $2.0 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Siliziumdioxid-Nanopartikeln (100 nm) mit einer Konzentration von  $3.0 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$

Tabelle 4 fasst alle bestimmten Gleichgewichtskonstanten von BSA in Gegenwart von Siliziumdioxid-Nanopartikeln zusammen.

**Tabelle 4:** Gleichgewichtskonstanten ( $K_D$ ) von BSA im Interaktionsprozess mit Siliziumdioxid-Nanopartikeln

Durchmesser / nm	Konzentration NP mL <sup>-1</sup>	Funktionalisierung	$K_D$ / $\mu$ M
25 ± 3	1·10 <sup>14</sup>	Perylenfarbstoff	15
28 ± 4	1·10 <sup>14</sup>	-	16
39 ± 5	1·10 <sup>14</sup>	Perylenfarbstoff	23
59 ± 8	1·10 <sup>14</sup>	-	39
100 ± 25	1·10 <sup>13</sup>	-	8
107 ± 37	1·10 <sup>13</sup>	Perylenfarbstoff	7
316 ± 19	1·10 <sup>14</sup>	-	15
318 ± 16	1·10 <sup>14</sup>	-	15

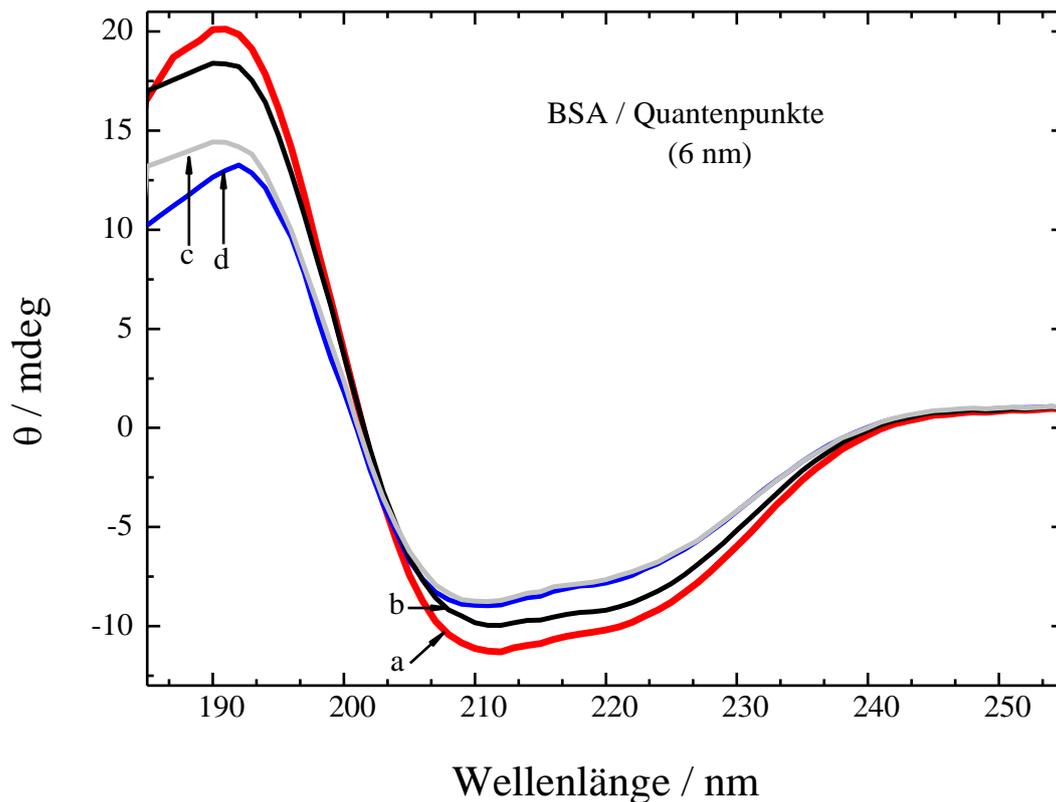
Die Konstanten des Adsorptions-/Desorptionsgleichgewichtes im Interaktionsprozess des BSA mit Siliziumdioxid-Nanopartikeln liegen alle im kleinen  $\mu$ M-Größenbereich. In diesem Größenbereich konnte keine Abhängigkeit vom Nanopartikel-Durchmesser festgestellt werden. Ebenfalls ließ sich keine Beeinflussung des Perylenfarbstoffes, welcher sich nur in einer sehr geringen Konzentration auf der Nanopartikel-Oberfläche befindet, feststellen.

#### 4.1.4. Wechselwirkung von Bovinem Serum-Albumin (BSA) mit Quantenpunkten

Neben der Anwendung in LEDs, Solarzellen und Diodenlasern haben Quantenpunkte (Quantum Dots) eine Anwendung in der Bioanalytik (Panda et al. 2011; Talapin et al. 2010; Rogach et al. 2008; Gill et al. 2008).

Die Quantenpunkte wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Eychmüller (Universität Dresden) synthetisiert und charakterisiert. Es handelt sich um einen Cadmium-Selenid reichen Kern und eine Zink-Selenid reiche Hülle. Die Synthese und Charakterisierung der CdZnSe Quantum Dots wurde bereits von *Panda et al.* beschrieben (Panda et al. 2011). Die Synthese erfolgt bei hohen Temperaturen (190 °C) unter Einsatz von CdSe-Precursoren. Die Nanopartikel besitzen einen Durchmesser von 6 nm und sind in Wasser dispergiert. Die Konzentration der Nanopartikel wurde mit  $6.52 \cdot 10^{15}$  NPs mL<sup>-1</sup> ermittelt. Als Protein wurde BSA verwendet. Die Konzentration von BSA betrug in allen Proben 0.052 mg mL<sup>-1</sup>. Die Konzentration der Quantenpunkte wurde von  $9.78 \cdot 10^{12}$  NPs mL<sup>-1</sup> bis  $6.52 \cdot 10^{13}$  NPs mL<sup>-1</sup>

variiert. Alle Proben wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur equilibriert und bei 20 °C vermessen. Die Spaltbreite im CD-Spektrometer betrug 1  $\mu\text{m}$  und die Integrationszeit während der Messung wurde auf 50 s festgelegt. Höhere Nanopartikel-Konzentrationen erwiesen sich als ungeeignet, da die Quantenpunkte Licht absorbieren. In Abbildung 51 sind die konzentrationsabhängigen CD-Spektren von BSA in Gegenwart der Quantenpunkte dargestellt.



**Abbildung 51:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart der Quantenpunkte (6 nm) bei unterschiedlichen Konzentrationen, **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von der Quantenpunkte (6 nm) mit einer Konzentration von  $9.8 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart der Quantenpunkte (6 nm) mit einer Konzentration von  $2.6 \cdot 10^{13} \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart der Quantenpunkte (6 nm) mit einer Konzentration von  $3.3 \cdot 10^{13} \text{ NP mL}^{-1}$

Die CD-Spektren zeigen einen Verlust von  $\alpha$ -Helix-Anteilen und ein Wachstum von  $\beta$ -Faltblatt und Random Coil. Mit Hilfe der Methode von *Lu et al.* wurde für reines BSA ein Helix-Anteil von 68.7 % ermittelt. Bei der höchsten hier vermessenen Nanopartikel Konzentration betrug der  $\alpha$ -Helix Anteil nur noch 48.2 %. Für den Adsorptions- / Desorptionsprozess wurde eine Gleichgewichtskonstante von 1.3  $\mu\text{M}$  ermittelt.

**4.1.5. Zusammenfassung**

Tabelle 5 fasst die bestimmten Größen und die bestimmten Gleichgewichtskonstanten für den Adsorptions-/Desorptionsprozess von BSA mit den Nanopartikel-Oberflächen zusammen.

**Tabelle 5:** Ergebnisse  $K_D$ -Werte: Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung

Nanopartikel	Durchmesser / nm	$K_D$
Au (Citrat)	13	33 nM $\pm$ 3.2 nM
Ag (Citrat)	40	20 nM $\pm$ 1.1 nM
Au (PVP)	39	0.2 $\mu$ M $\pm$ 0.05 $\mu$ M
Ag (PVP)	70	0.5 $\mu$ M $\pm$ 0.05 $\mu$ M
Polystyrol	90	1.2 $\mu$ M $\pm$ 0.25 $\mu$ M

Die in der Tabelle zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass es eine deutliche Abhängigkeit in der Oberflächenfunktionalisierung gibt. Während Polystyrol- und Polymerfunktionalisierte Nanopartikel Gleichgewichtskonstanten im  $\mu$ M Bereich besitzen, zeigen die metallischen Nanopartikel  $K_D$ -Werte im nM Bereich. Dieses zeigt, dass die Affinität des Serum-Albumins zu metallischen Oberflächen wesentlich größer ist, als die Interaktion mit dem Polymer. Für den Fall der metallischen Nanopartikel, kann die Citrat-Stabilisierung verdrängt werden und das Bovine Serum-Albumin interagiert direkt mit der Metalloberfläche. Die Interaktion des Proteins mit der Nanopartikel-Oberfläche findet hauptsächlich durch die Carboxygruppen der Peptidgruppe und den Schwefelgruppen von Disulfidbrücken statt (Fass 2012; Garrido et al. 2010). Durch das Aufbrechen von Disulfidbrücken im Protein verändert sich die Konformation des Proteins. Demnach könnten Strukturbereiche des Proteins (kryptische Epitope) für andere Biomoleküle z.B. Antigene zugänglich werden (Klein 2007). Diese könnten eine Immunreaktion auslösen. Das unterschiedliche Affinitätsverhalten des Serum-Albumins wirkt sich also auf die Protein-Corona aus. Bei den PVP-funktionalisierten Nanopartikeln erfolgt kein Kontakt des Bovinen Serum-Albumins mit der metallischen Nanopartikel-Oberfläche, sondern mit der Polymerschicht. Hier finden wahrscheinlich vorrangig unspezifische Wechselwirkungen, wie

Van-der-Waals und Coulomb Anziehung, des Proteins mit dem Polymer statt (Treuel et al. 2012).

Trotz Funktionalisierung der Silber-Nanopartikel können dennoch Ionen aus dem Kern freigesetzt werden, die eine Zytotoxizität zur Folge haben (Kittler et al. 2010). Diese Experimente verdeutlichen, dass man mit der Änderung der Oberflächenfunktionalität z.B. den Transport der Nanopartikel in biologischen Medien beeinflussen könnte oder die Translokation in Zellen (Oberdörster et al. 2005; Kreyling et al. 2004), ohne ihre Eigenschaften zu ändern, da durch eine Polymerfunktionalisierung die Stabilität der Nanopartikel in biologischen Medien erhöht werden kann (Kittler et al. 2010).

*Röcker et al.* haben ebenfalls die Interaktion von Polymer-funktionalisierten Nanopartikeln mit Serum-Albumin untersucht (Röcker et al. 2009). Mit der Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie wurde eine Gleichgewichtskonstante von  $5.1 \pm 1.3 \mu\text{M}$  und mit kinetischen Studien eine Konstante von  $3.8 \pm 1.5 \mu\text{M}$  bestimmt. Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Gleichgewichtskonstanten bewegen sich im gleichen Größenbereich wie Literaturwerte. Serum Albumin besitzt im Interaktionsprozess mit Polymeren und polymer-funktionalisierten Nanopartikeln Gleichgewichtskonstanten im niedrigen Mikromolaren Bereich. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde die Adsorption von Humanem Serum-Albumin auf Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel mit Hilfe der Brown'schen Molekularbewegung untersucht. Hier wurde eine Gleichgewichtskonstante von  $71 \pm 17 \text{ nM}$  bestimmt (Gebauer et al. 2012). *Shang et al.* bestimmten für die Adsorption von Serum Albumin auf 1.4 nm große Gold-Nanocluster eine Gleichgewichtskonstante von  $0.9 \mu\text{M}$  (Shang et al. 2012). Wobei man hier beachten muss, dass diese Gold-Nanopartikel nicht im gleichen Größenbereich lagen und anstatt von Citrat, Dihydroliponsäure (DHLSA) als Stabilisierung verwendet wurde.

## 4.2. Einfluss des Proteins

### 4.2.1. Wechselwirkung von Nanopartikeln mit verschiedenen Proteinen

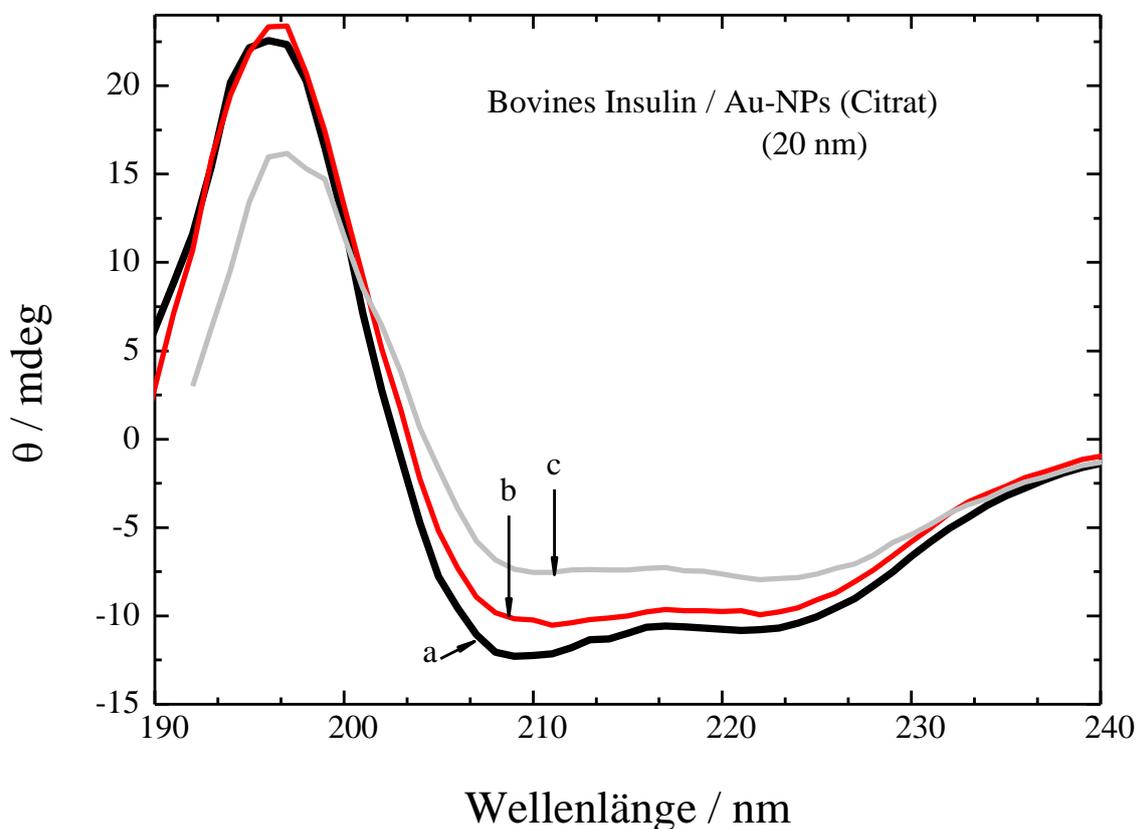
#### 4.2.2. Bovines Insulin

Um strukturelle Änderungen von Bovinem Insulin im Interaktionsprozess mit Gold-Nano-Oberflächen (Citrat-stabilisierte Gold-Nanopartikel und Gold-Nanoschalen) zu untersuchen,

## Ergebnisse und Diskussion

wurden konzentrationsabhängige CD-Spektren im fernen UV-Bereich (260-180 nm) und nahen UV Bereich (320 nm) durchgeführt. Der ferne UV-Bereich ist charakteristisch für Sekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Random Coil Anteile, während der nahe UV-Bereich Informationen über Disulfidbindungen, aromatische Aminosäuren und eine korrekte Faltung des Proteins (Tertiärstruktur) wiedergibt. Die Messungen im fernen UV-Bereich wurden nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden durchgeführt unter der Annahme, dass sich nach dieser Zeit eine Protein-Corona um die Nanopartikel gebildet hat.

Die Messungen im fernen UV-Bereich erfolgten bei einer Insulin-Konzentration von  $0.143 \text{ mg mL}^{-1}$  und einem pH Wert von 6. Alle Proben wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur equilibriert und anschließend im Wellenlängenbereich vom 260 bis 190 nm vermessen.



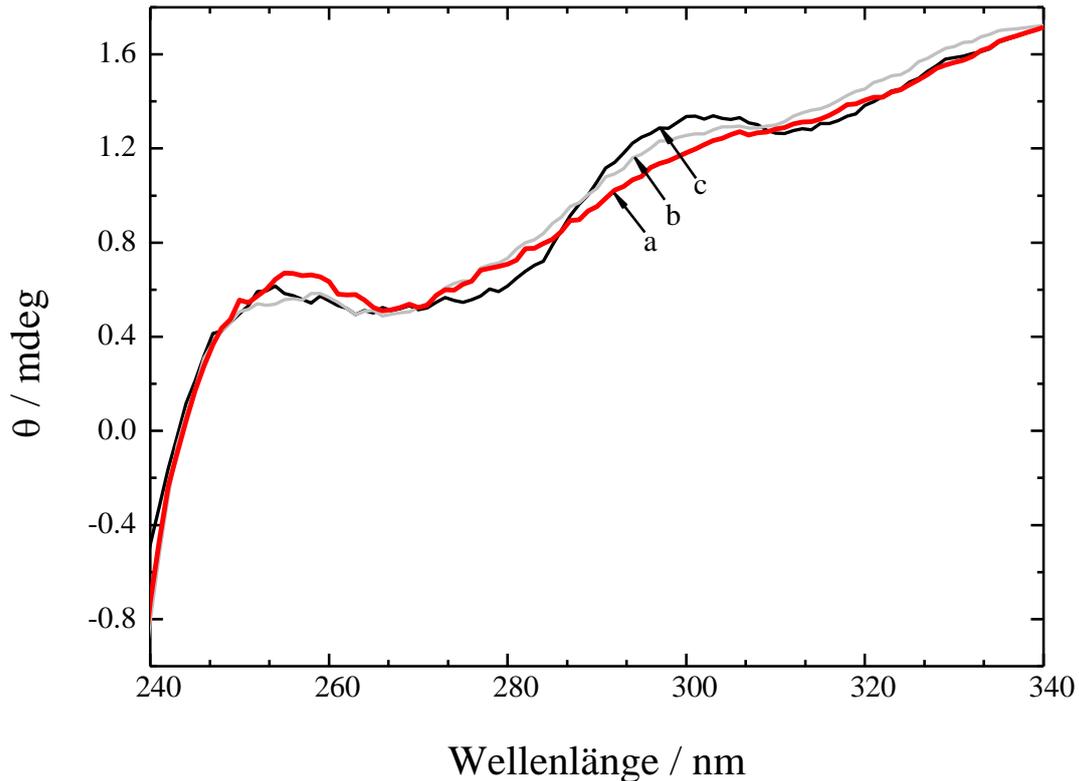
**Abbildung 52:** CD-Spektren des fernen-UV Bereichs von Bovinem Insulin in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (20 nm) bei unterschiedlichen Konzentrationen, **a:** CD-Spektrum von reinem Bovinem Insulin ( $0.143 \text{ mg mL}^{-1}$ ), pH 6, **b:** CD-Spektrum von Insulin in Gegenwart von Gold-Nanopartikeln (20 nm) mit einer Konzentration von  $8.8 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Gold-Nanopartikeln (20 nm) mit einer Konzentration von  $3.2 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$

**Tabelle 6:** Sekundärstrukturanteile von reinem Bovinem Insulin

<b>Struktur- Anteil</b>	<b>Reines Insulin (Pocker und Biswas 1980) / %</b>	<b>Reines Insulin (CD) / %</b>
$\alpha$ -Helix	36	33
$\beta$ -Faltblatt	16	18
Random Coil	48	34

Die obere Abbildung und Tabelle zeigen die Ergebnisse der CD-Messungen von Bovinem Insulin mit Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln. Es wurde eine konzentrationsabhängige Denaturierung der Insulinstruktur festgestellt, die sich in einer Abnahme der  $\alpha$ -Helix Struktur und eine Zunahme von  $\beta$ -Faltblatt und Random Coil Anteilen zeigte.

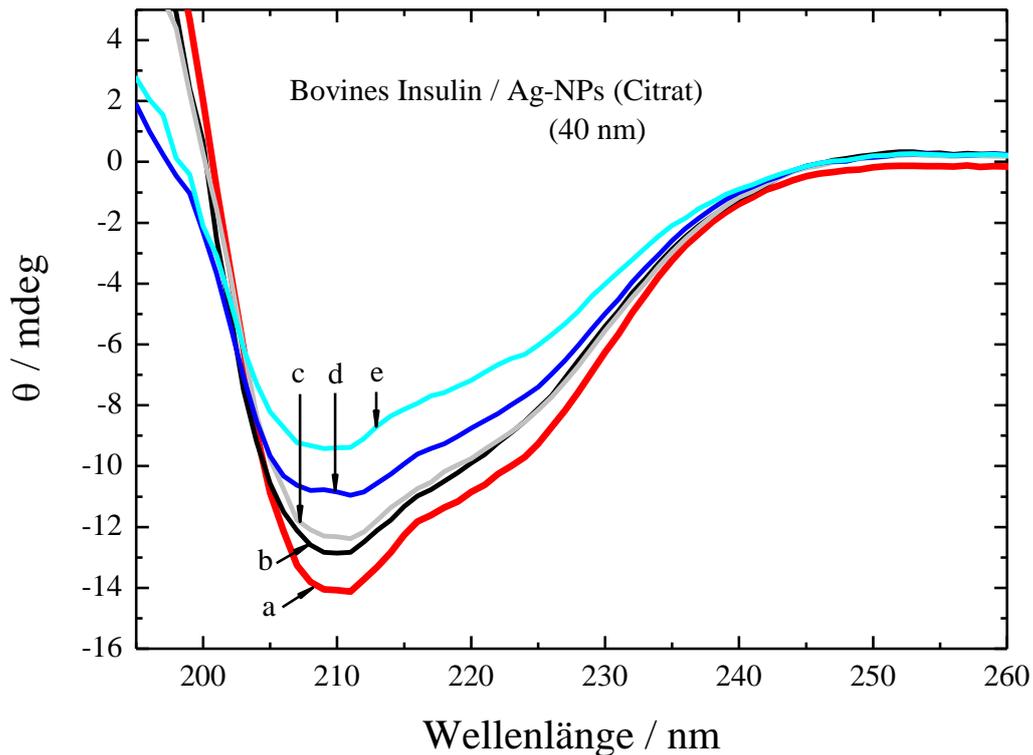
Zusätzlich wurden zeitabhängige CD-Messungen im nahen UV-Bereich durchgeführt, um Änderungen in der Tertiärstruktur während des Interaktionsprozesses mit Gold-Nano-Oberflächen zu beobachten. Die CD-Messungen wurden mit einer Spaltbreite von 1  $\mu\text{m}$  und einen Scanschritt von 1 nm durchgeführt. Die Konzentration des Bovinen Insulins betrug 0.133  $\text{mg mL}^{-1}$ . Der pH-Wert wurde auf pH 6 eingestellt. Die Insulin-Nanopartikel Probe wurde nach einer Inkubationszeit von 30 min und 3 Stunden vermessen.



**Abbildung 53:** Zeitanhängige CD-Spektren des nahen-UV Bereichs von Insulin in Gegenwart von Gold Nanoschalen, **a:** CD-Spektrum von reinem Insulin ( $0.133 \text{ mg mL}^{-1}$ ), pH 6, **b:** CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Gold-Nanoschalen nach einer Inkubationszeit von 30 min gemessen, **c:** CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Gold-Nanoschalen nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden gemessen.

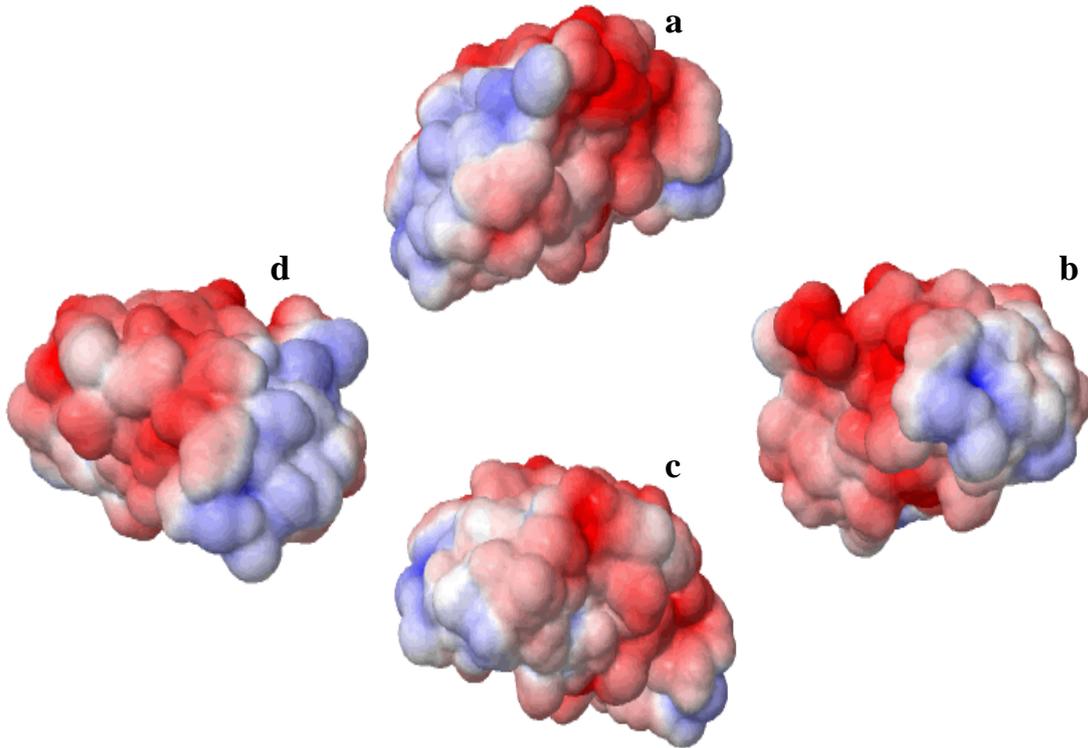
Zeitabhängige CD-Messungen im nahen UV-Bereich zeigen strukturelle Änderungen des Bovinen Insulins. Dabei wurden die Strukturänderungen im einen Zeitrahmen von 3 Stunden beobachtet, welche mit der Bildung der Protein-Corona zusammenhängen. Die zeitabhängigen CD-Spektren des nahen UV-Bereichs zeigen, dass sich das Protein auf der Nanopartikel-Oberfläche faltet. Zudem könnten in dieser Zeit auch Disulfidbrücken aufbrechen.

Es wurden ebenfalls CD-Messungen von Bovinem Insulin und Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln durchgeführt. Folgende Abbildung zeigt die CD-Spektren von Bovinem Insulin in Gegenwart dieser Nanopartikel:



**Abbildung 54:** CD-Spektren von Bovinem Insulin (pH 6) und Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln mit verschiedenen Konzentrationen, *a*: CD-Spektrum von reinem Bovinem Insulin (40  $\mu$ M), *b*: CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $2.5 \cdot 10^{10}$  NP mL<sup>-1</sup>, *c*: CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $5.0 \cdot 10^{10}$  NP mL<sup>-1</sup>, *d*: CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $7.5 \cdot 10^{10}$  NP mL<sup>-1</sup>, *e*: CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^{11}$  NP mL<sup>-1</sup>

Für den Adsorptions- / Desorptionsprozess des Bovinen Insulins auf Silber-Nanopartikel-Oberflächen wurde eine Gleichgewichtskonstante von  $5 \pm 2$  nM bestimmt. Die Gleichgewichtskonstante zeigt, dass die Interaktion des Bovinen Insulins mit der Silber-Nanopartikel-Oberfläche sehr stark ist und im Gleichgewicht die meisten der Insulin-Moleküle denaturiert auf der Nanopartikel-Oberfläche vorliegen. Für eine Interpretation dieser starken Interaktion, wurde die Oberflächenladung des Bovinen Insulin Moleküls berechnet. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Oberflächenladung des Bovinen Insulins aus vier Perspektiven:



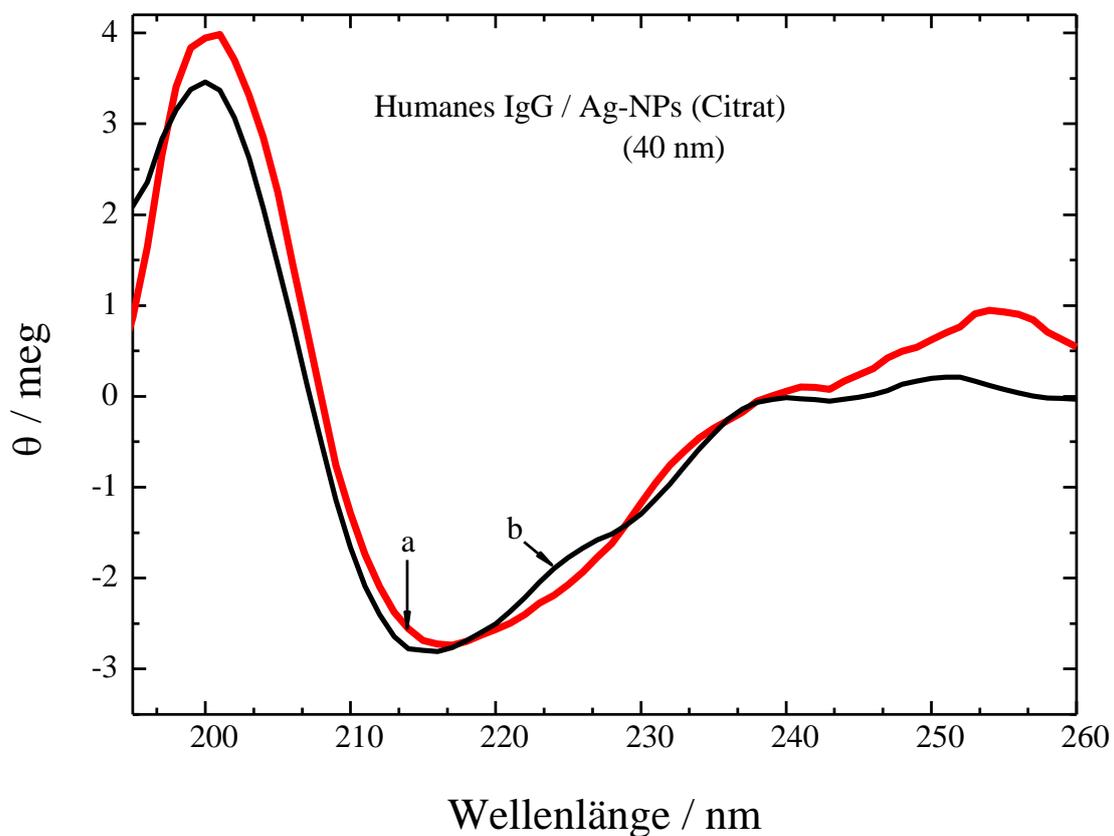
**Abbildung 55:** Oberflächenpotential von Bovinem Insulin, PDB-Code: 4INS, *rot*: negative Oberflächenladung, *blau*: positive Oberflächenladung, *a*: Frontalansicht des Bovinen Insulins, *b*: rechts, *c*: hinten, *d*: links, für pH 7, Bilder online erstellt mit <http://kryptonite.nbc.net/pdb2pqr> (Dolinsky et al. 2004)

Die Ergebnisse zeigen, dass das Bovine Insulin, sowohl Bereiche mit negativen, als auch mit positiven Oberflächenladungen besitzt. Dieses könnte die starke Interaktion mit der metallischen Nanopartikel-Oberfläche erklären. So zeigten *Maffre et al.*, dass nicht nur die Gesamtladung des Proteins eine Relevanz im Adsorptionsverhalten besitzt, sondern gerade geladene Bereiche im Protein eine entscheidende Rolle spielen (*Maffre et al. 2011*). So erhielten *Maffre et al.* in der Untersuchung das Adsorptionsverhalten von drei verschiedenen Proteinen (HSA, ApoA-I und Apo E4) auf FePt-Nanopartikel für die überwiegend negativ geladenen Proteine HSA und ApoA-I Gleichgewichtskonstanten im Mikromolaren Bereich. Das ApoE4 Protein enthält, ebenso wie das Bovine Insulin, abwechselnd positiv und negativ geladene Bereiche. Hier wurde eine Gleichgewichtskonstante von  $21 \pm 3$  nM bestimmt, die die eine sehr starke Affinität des Proteins zur FePt-Oberfläche verdeutlicht (*Maffre et al. 2011*).

#### 4.2.3. Humanes Immunglobulin (IgG)

Für die Untersuchung von Humanem IgG mit Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln, wurden konzentrationsabhängige CD-Spektren durchgeführt. Die Konzentration des IgG betrug  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  und die Konzentration der Nanopartikel wurde von  $5 \cdot 10^{10}$  bis  $2.5 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$  variiert. Alle IgG-Nanopartikel Proben wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur equilibriert und anschließend im Wellenlängenbereich von 260 bis 190 nm mit einer Spaltbreite von  $1 \mu\text{m}$  und einem Scanschritt von 1 nm vermessen.

Abbildung 56 stellt ein CD-Spektrum von reinem Humanem IgG und des Proteins in Gegenwart einer Silber-Nanopartikel-Konzentration von  $1.0 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$  dar.

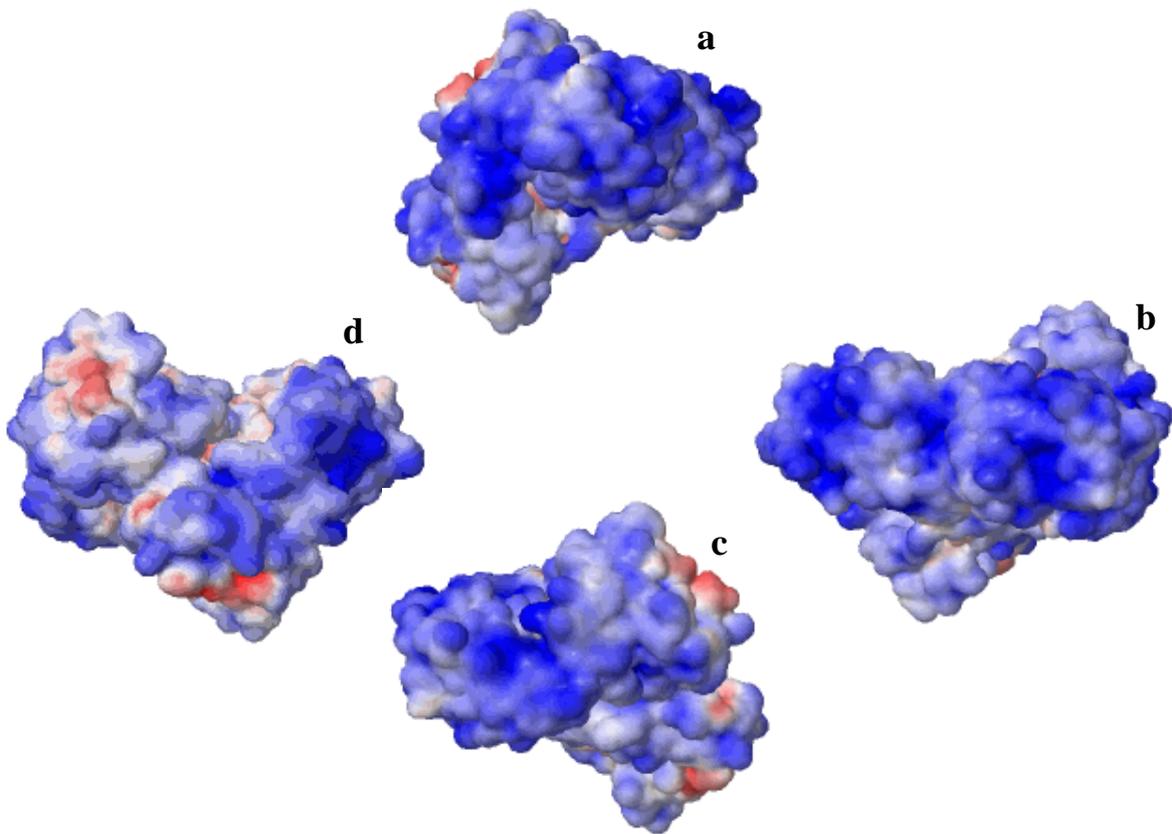


**Abbildung 56:** CD-Spektrum von Humanem IgG und IgG in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm), **a:** CD-Spektrum reinem Humanem IgG **b:** CD-Spektrum von Humanem IgG in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$

Insgesamt konnten nur geringe Änderungen im Sekundärstrukturbereich ermittelt werden. Der  $\alpha$ -Helix-Anteil des reinen IgG betrug 18.4 %. Bei der höchsten Silber-Nanopartikel-Konzentration wurde ein  $\alpha$ -Helix-Anteil von 17 % ermittelt.

Die Berechnung der Gleichgewichtskonstante ergab einen Wert von 200 nM. Somit zeigt Humanes IgG eine geringere Affinität auf die Nanopartikel-Oberfläche zu adsorbieren, als Bovines Insulin. *Tenzer et al.* untersuchten die Beschaffenheit der Protein Corona auf Silica-Nanopartikel-Oberflächen (Tenzer et al. 2011). Auch hier zeigte sich, dass IgG eine geringere Adsorptionsaffinität aufwies als z.B. Humanes Serum-Albumin.

Es wurde die Oberflächenladung von Humanem IgG bei einem pH-Wert von 7 berechnet. In Abbildung 57 ist die Oberflächenladung des Proteins aus vier Perspektiven dargestellt.



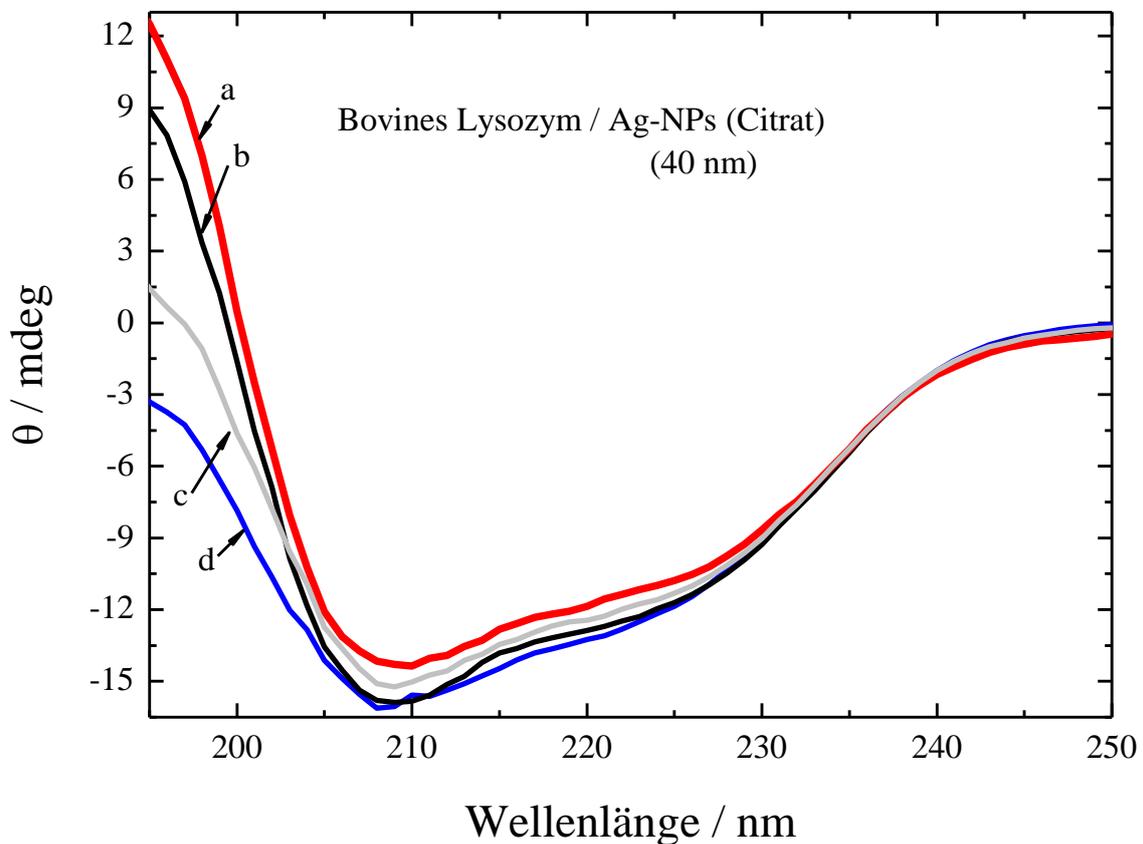
**Abbildung 57:** Oberflächenpotential von Humanem IgG, PDB-Code: 3FZU, *rot*: negative Oberflächenladung, *blau*: positive Oberflächenladung, *a*: Frontalansicht des Humanen IgG, *b*: rechts, *c*: hinten, *d*: links, für pH 7, Oberflächenladungen wurden unter <http://kryptonite.nbc.net/pdb2pqr> gerechnet (Dolinsky et al. 2004)

Das Humane IgG besitzt eine überwiegend positive Oberflächenladung. So findet man nur kleine Bereiche die negativ geladen sind. Da das Protein während der Adsorption die Citrat-Hülle verdrängt, interagiert es mit der metallischen Nanopartikel-Oberfläche. Hier scheint

eine Interaktion mit Carboxygruppen gegenüber basischen Aminosäuren und Aminen bevorzugt zu sein.

### 4.2.4. Bovines Lysozym

Die Konzentration des Bovinen Lysozyms wurde in allen Messungen konstant auf  $0.157 \text{ mg mL}^{-1}$  gehalten. Die Silber-Nanopartikel-Konzentration wurde von  $7.5 \cdot 10^{10}$  bis  $3.0 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$  variiert. Alle Proben wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und bei  $20^\circ\text{C}$  vermessen. Der Scanschritt betrug  $1 \text{ nm}$ , die Spaltbreite  $1 \mu\text{m}$  und die Integrationszeit wurde auf  $50 \text{ s}$  festgelegt. In folgender Abbildung sind die CD-Spektren dargestellt.



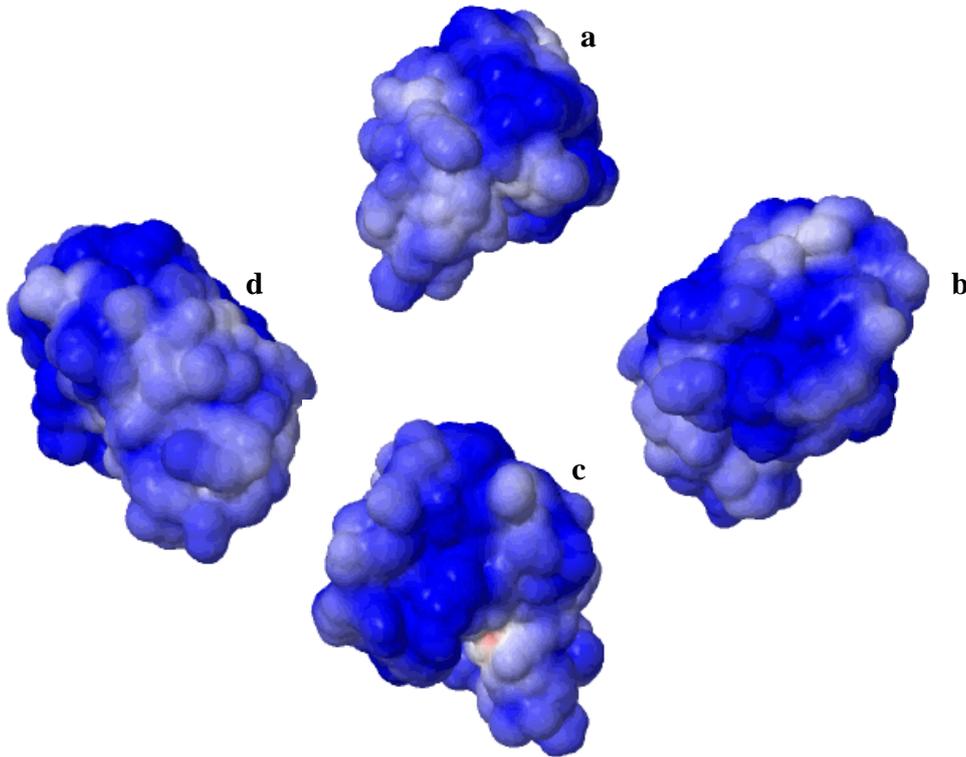
**Abbildung 58:** CD-Spektren von Bovinem Lysozym in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln, **a:** CD-Spektrum von reinem Bovinem Lysozym ( $0.157 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von Bovinem Lysozym in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln ( $40 \text{ nm}$ ) mit einer Konzentration von  $7.5 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$  **c:** CD-Spektrum von Bovinem Lysozym in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln ( $40 \text{ nm}$ ) mit einer Konzentration von  $2.5 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von Bovinem Lysozym in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln ( $40 \text{ nm}$ ) mit einer Konzentration von  $3.5 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$

## Ergebnisse und Diskussion

---

Die Interaktion des Lysozyms geht mit einem Verlust von  $\alpha$ -Helix-Anteilen und der Bildung von  $\beta$ -Faltblatt- und Random Coil-Anteilen einher. Bei der höchsten Silber-Nanopartikel Konzentration betrug der  $\alpha$ -Helix-Anteil nur noch 17 %.

Für das Lysozym wurde ebenfalls die Oberflächenladung berechnet. Die Ergebnisse sind in der nächsten Abbildung gezeigt.



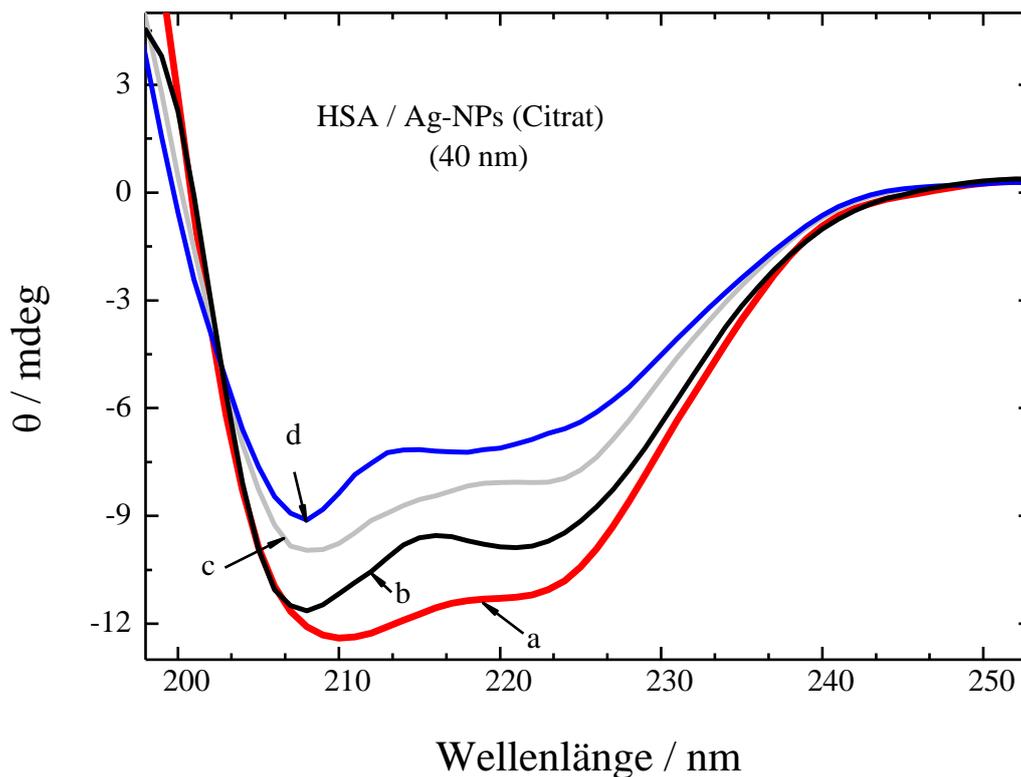
**Abbildung 59:** Oberflächenpotential von Bovinem Lysozym, PDB-Code:1LAA, *rot*: negative Oberflächenladung, *blau*: positive Oberflächenladung, *a*: Frontalansicht des Bovinen Lysozyms, *b*: rechts, *c*: hinten, *d*: links, für pH 7, Bilder online erstellt mit <http://kryptonite.nbc.net/pdb2pqr> (Dolinsky et al. 2004)

Das Bovine Lysozym ist bei einem pH-Wert von 7 fast komplett positiv geladen. Diese Tatsache könnte, die sehr geringe Bindungsaffinität zur metallischen Nano-Oberfläche erklären. Das Bovine Lysozym besitzt auf seiner Oberfläche viele basische Aminosäuren, die unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen sind. Man findet die gleichen Bedingungen wie bei Humanen IgG vor. So bindet das Protein bevorzugt mit Carboxygruppen auf der metallischen Nanopartikel-Oberfläche. Dieses könnte die schwächere Bindungsaffinität erklären. Ein weiterer Faktor für das schwache Adsorptionsverhalten, könnte die Entfaltungsenergie des Proteins sein. Die Ergebnisse zeigen, dass die Adsorption der hier vermessenen Proteine immer mit einer Denaturierung des

Proteins einhergeht. Das Lysozym besitzt eine sehr hohe Entfaltungsenthalpie von  $37 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Ahmad und Bigelow 1982). Insulin und Serum-Albumin dagegen besitzen dagegen kleinere Entfaltungsenthalpien von  $19 \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $20 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Krishnakumar und Panda 2002; Brems et al. 1991).

### 4.2.5. Humanes Serum-Albumin (HSA)

Die Konzentration des HSA betrug in allen CD-Messungen  $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ . Die Silber-Nanopartikel-Konzentration wurde von  $6.3 \cdot 10^{10}$  bis  $2.3 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$  variiert. Der Scanschritt während der Messungen betrug  $1 \text{ nm}$ , die Spaltbreite  $1 \mu\text{m}$  und die Integrationszeit wurde auf  $50 \text{ s}$  festgelegt. Für reines HSA wurde ein  $\alpha$ -Helix-Anteil von  $68 \%$  bestimmt. Bei der höchsten Nanopartikel-Konzentration von  $2.3 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$  betrug dieser  $36 \%$ . Folgende Abbildung zeigt die CD-Spektren von HSA in Gegenwart der Silber-Nanopartikel.



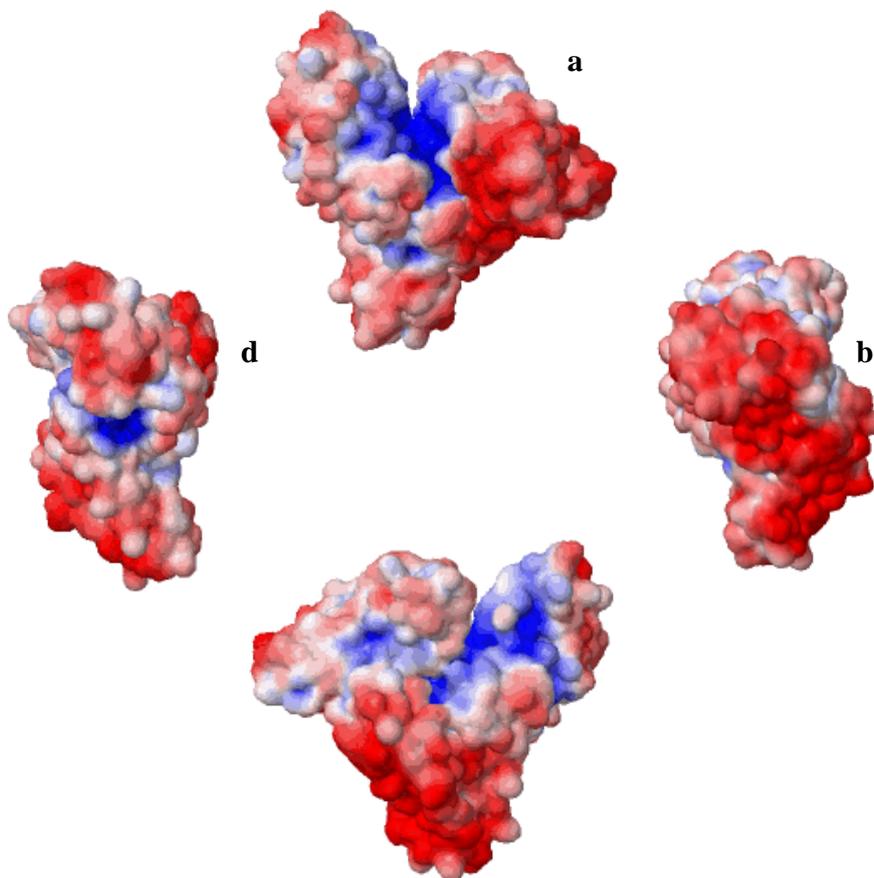
**Abbildung 60:** CD-Spektren von HSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln, **a:** CD-Spektrum von reinem HSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von HSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel (40 nm) mit einer Konzentration von  $2.2 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von HSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel (40 nm) mit einer Konzentration von  $5.6 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von HSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel (40 nm) mit einer Konzentration von  $7.4 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$  (Gebauer et al. 2012).

## Ergebnisse und Diskussion

---

Es wurde eine Gleichgewichtskonstante von  $33 \pm 11$  nM bestimmt. In diesem Fall wurde eine starke Affinität der HSA Moleküle auf die Silber-Nanopartikel-Oberfläche zu adsorbieren bestimmt. Für das gleiche System (HSA und Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel) wurde mit einer anderen Methode, in der die Adsorption des Proteins auf die Nanopartikel-Oberfläche betrachtet wurde ein  $K_D$ -Wert von  $71 \pm 17$  nM bestimmt (Gebauer et al. 2012). Unter Berücksichtigung der Fehlertoleranzen kann man beide Gleichgewichtskonstanten als übereinstimmend werten.

Auch hier wurden die Oberflächenladungs-Verhältnisse des Proteins bei einem pH-Wert von 7 untersucht.



**Abbildung 61:** Oberflächenpotential von Humanem Serum-Albumin, PDB-Code: 1AO6, *rot*: negative Oberflächenladung, *blau*: positive Oberflächenladung, *a*: Frontalansicht des Humanen Serum-Albumin, *b*: rechts, *c*: hinten, *d*: links, für pH 7, Bilder online erstellt mit <http://kryptonite.nbc.net/pdb2pqr> (Dolinsky et al. 2004)

Das Humane Serum-Albumin ist überwiegend negativ geladen. Es besitzt nur vereinzelt positive Bereiche. Insgesamt findet also eine starke Interaktion des überwiegend negativ geladenen Proteins mit der Oberfläche statt. Das Humane Serum-Albumin kann mit den

Carboxygruppen der Peptidgruppe mit der Metall-Oberfläche interagieren. Des Weiteren kann Serum-Albumin mit seinen 17 Disulfidbrücken sehr starke Sulfidbindungen ausbilden. Wie bereits in Kapitel 4.2.2. diskutiert hat das Serum-Albumin eine geringe Entfaltungsentnergie. Diese könnte ebenfalls einen Einfluss auf die starke Adsorptionsaffinität haben.

### 4.2.6. Zusammenfassung

In biologischen Medien können Nanopartikel mit zahlreichen Proteinen interagieren. Dabei kann die Affinität zur Adsorption auf die Nanopartikel-Oberfläche für die einzelnen Proteine untereinander variieren. Deshalb wurde die Interaktion von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln und unterschiedlichen Proteinen (HSA, Lysozym, Insulin und IgG) untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen Proteine eine unterschiedliche Affinität zur Nanopartikel-Oberfläche aufweisen.

**Tabelle 7:** Gleichgewichtskonstanten von vier ausgewählten Proteinen im Interaktionsprozess mit Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln

Protein	$K_D$
HSA	$33 \pm 11$ nM
Insulin	$5 \pm 2$ nM
Lysozym	$333 \pm 45$ nM
IgG	$200 \pm 57$ nM

Während HSA und Insulin Gleichgewichtskonstanten in nM Bereich besitzen, haben Immunoglobulin und Lysozym einen um eine Zehnerpotenz größeren  $K_D$ -Wert. Die Gleichgewichtskonstanten können durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Ein Grund für die unterschiedliche Adsorptionsaffinität ist die Gesamtladung des Proteins. Humanes Serum-Albumin hat eine überwiegend negative Gesamtladung. Während Humanes IgG mit einem isoelektrischen Punkt von 8 eine insgesamt positive Gesamtladung aufweist. Neben der Gesamtladung, können aber auch geladene Bereiche in einem Protein einen erheblichen Faktor in der Bindungsaffinität von Proteinen darstellen. So besitzt das Insulin mit seinen positiv und negativ geladenen Oberflächenbereichen kleinste Gleichgewichtskonstante und damit das stärkste Adsorptionsverhalten gegenüber Silber-

Nano-Oberflächen. Sowohl die Gesamt-Oberflächenladung des Proteins als auch kleine geladene Bereiche, stellen einen sehr wichtigen Faktor im Adsorptionsverhalten dar. Des Weiteren hat auch der Energieaufwand, der für die Entfaltung des Proteins auf der Nanopartikel-Oberfläche benötigt wird, einen Einfluss auf das Adsorptionsverhalten. So wurde bei Proteinen mit einer kleineren Entfaltungseenergie eine stärkere Adsorptionsaffinität bestimmt.

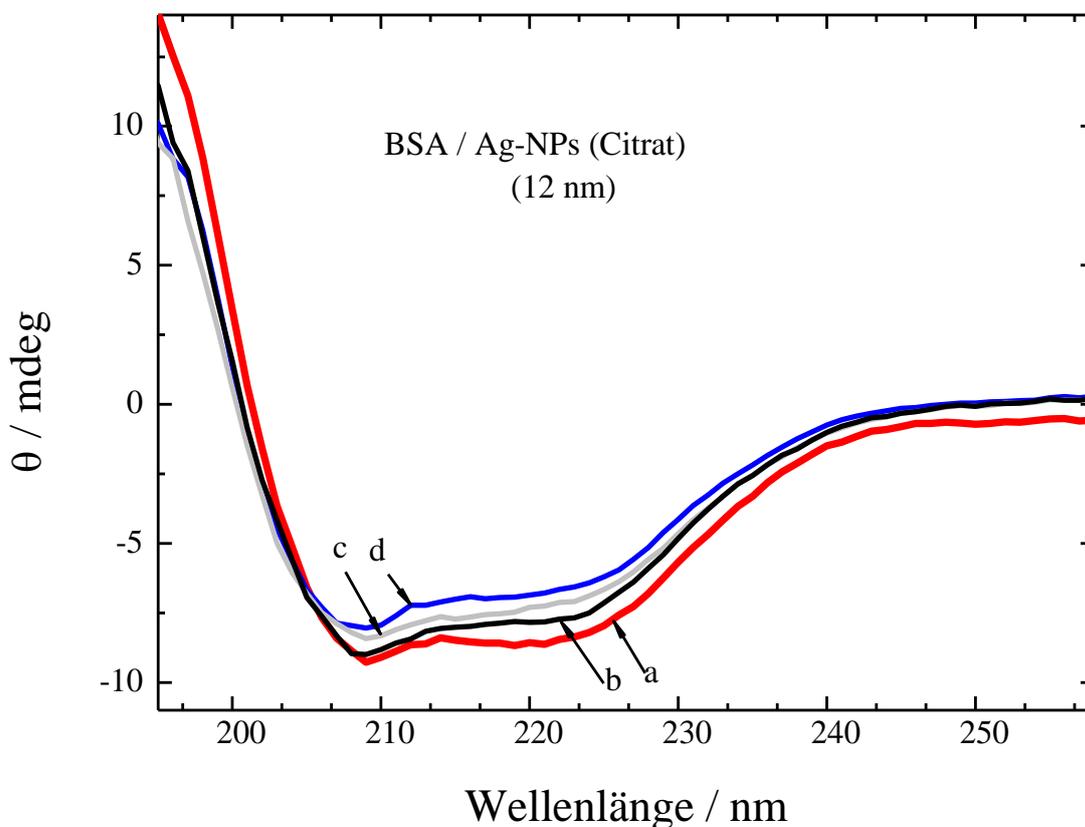
### **4.3. Einfluss der Nanopartikel-Größe auf die Proteinadsorption**

Neben der Ladung und Oberflächenfunktionalisierung, hat auch die Nanopartikel-Größe eine entscheidende Rolle in der Bildung der Protein Corona unter physiologischen Bedingungen (Tenzer et al. 2011; Casals et al. 2010). Auch die Aufnahme von Nanopartikeln in die Zelle und die daraus resultierenden biologischen Mechanismen sind abhängig von der Nanopartikel-Größe (Jiang et al. 2008; Pan et al. 2007; Rejman et al. 2004), deshalb ist die Untersuchung der Interaktion von Proteinen mit Nanopartikeln verschiedener Größe sehr bedeutend um diese Prozesse genauer verstehen zu können.

#### **4.3.1. Wechselwirkung von Bovinem Serum-Albumin mit Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln unterschiedlicher Größe (12-90 nm)**

Für die Untersuchung der Größenabhängigkeit der Nanopartikel im Interaktionsprozess mit Bovinem Serum-Albumin wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Peukert (Universität Erlangen-Nürnberg) Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel synthetisiert, welche sich ausschließlich in ihrer Größe unterschieden, so dass ein Einfluss aufgrund einer Ladungsänderung oder Oberflächenfunktionalisierung ausgeschlossen werden konnte. Die Größe der Nanopartikel wurde durch die Auszählung von transmissionselektronischen Aufnahmen ermittelt. Alle BSA-Nanopartikel Proben wurden bei 20 °C präpariert und 3 Stunden vor der Vermessung bei Raumtemperatur inkubiert. Die BSA Konzentration betrug in allen CD-Messungen konstant 0.052 mg mL<sup>-1</sup>. Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco J-815 CD-Spektrometer in 0.1 nm Intervallen, einer Scangeschwindigkeit von 20 nm / min im Wellenlängen-Bereich von 260-180 nm aufgenommen. Das Lösungsmittel war immer Wasser und die Spektren wurden zweimal

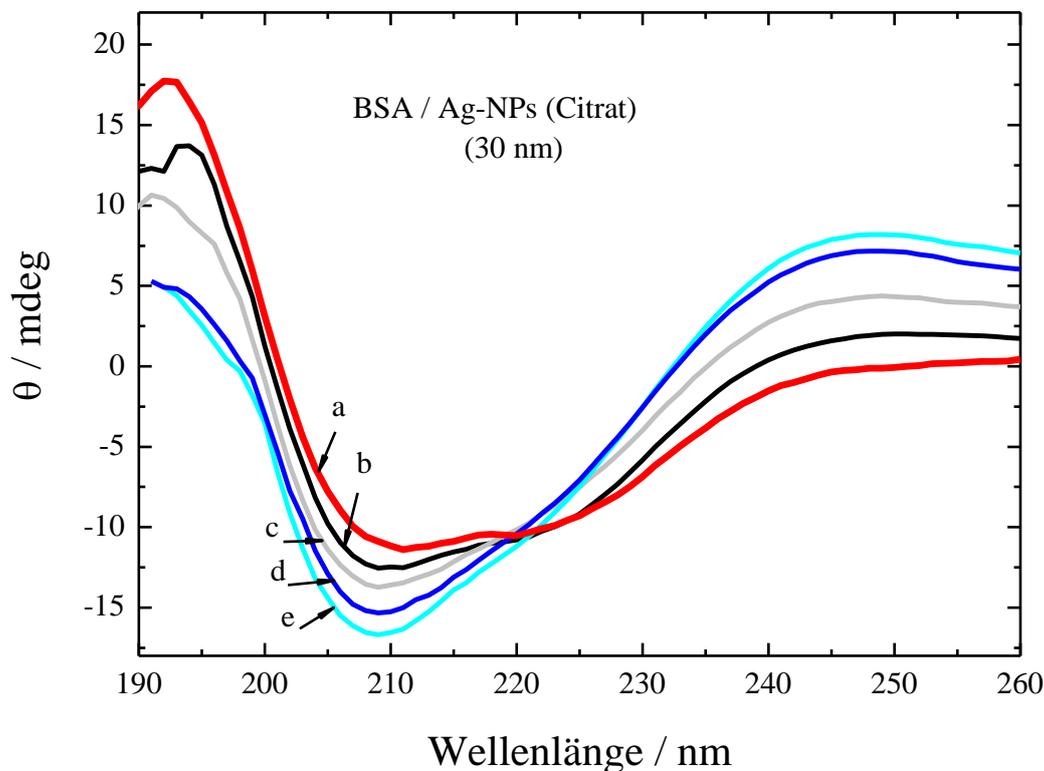
akkumuliert. Abbildung 62 zeigt die Ergebnisse für BSA im Interaktionsprozess mit den kleinsten Nanopartikeln (12 nm).



**Abbildung 62:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (12 nm), **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (12 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (12 nm) mit einer Konzentration von  $1.2 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (12 nm) mit einer Konzentration von  $1.4 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$

Die Konzentration des Bovinen Serum-Albumins betrug bei allen CD-Messungen  $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ . Die Silber-Nanopartikel-Konzentration wurde von  $1.0 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$  bis  $1.7 \cdot 10^{13} \text{ NP mL}^{-1}$  variiert. Die  $\alpha$ -Helix-Anteile wurden nach der Methode von *Lu et al.* berechnet (Shang et al. 2007; Lu et al. 1987). Für das reine Bovine Serum-Albumin wurde ein  $\alpha$ -Helix-Anteil von 67 % berechnet. In Gegenwart der höchsten Nanopartikel-Konzentration von  $1.7 \cdot 10^{13} \text{ NP mL}^{-1}$  betrug der  $\alpha$ -Helix-Anteil 31 %. Es wurde eine Gleichgewichtskonstante von  $143 \pm 21 \text{ nM}$  bestimmt.

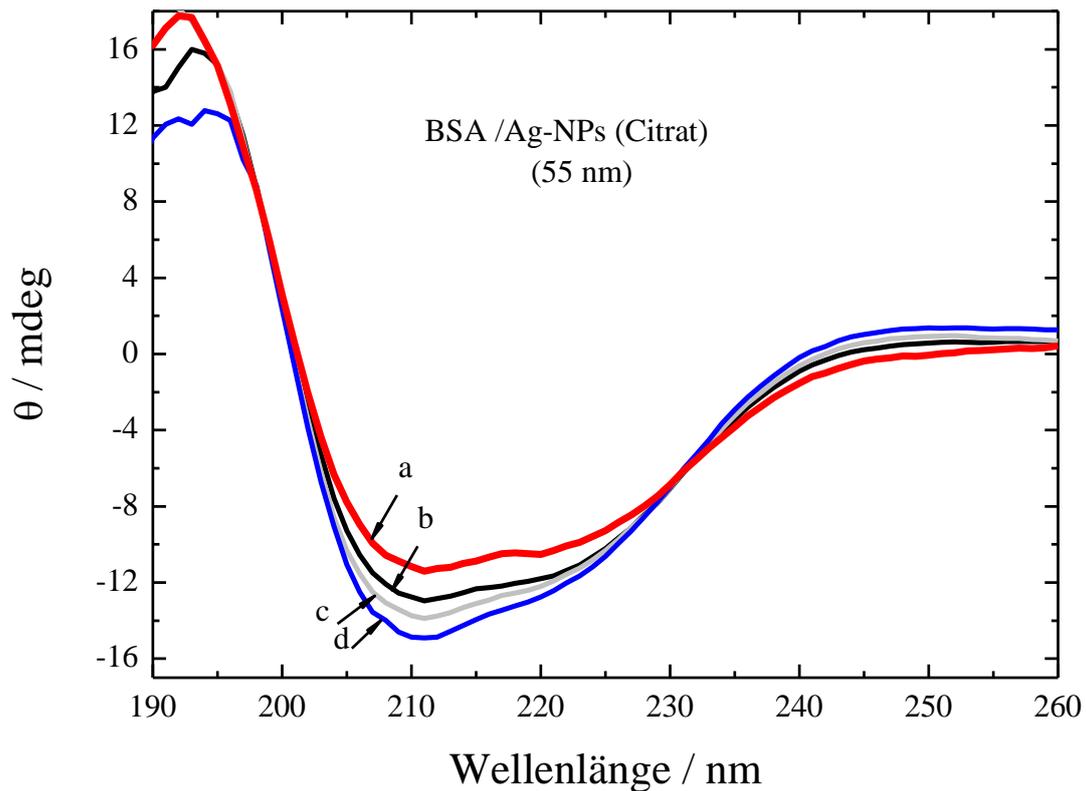
Abbildung 63 zeigt eine Auswahl der CD-Spektren von BSA in Gegenwart der 30 nm großen Nanopartikel.



**Abbildung 63:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (30 nm), *a*: CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *b*: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (30 nm) mit einer Konzentration von  $2.1 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *c*: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (30 nm) mit einer Konzentration von  $5.5 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *d*: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $9.6 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *e*: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (30 nm) mit einer Konzentration von  $1.1 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$

Die Konzentration des Bovinen Serum-Albumins betrug hier  $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$  und wurde bei allen CD-Messungen konstant gehalten. Die Nanopartikel-Konzentration wurde von  $2.8 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$  bis  $1.1 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$  variiert. Bei der höchsten Konzentration wurde ein  $\alpha$ -Helix-Anteil von 53.6 % ermittelt. Die berechnete Gleichgewichtskonstante betrug  $25 \pm 2 \text{ nM}$ .

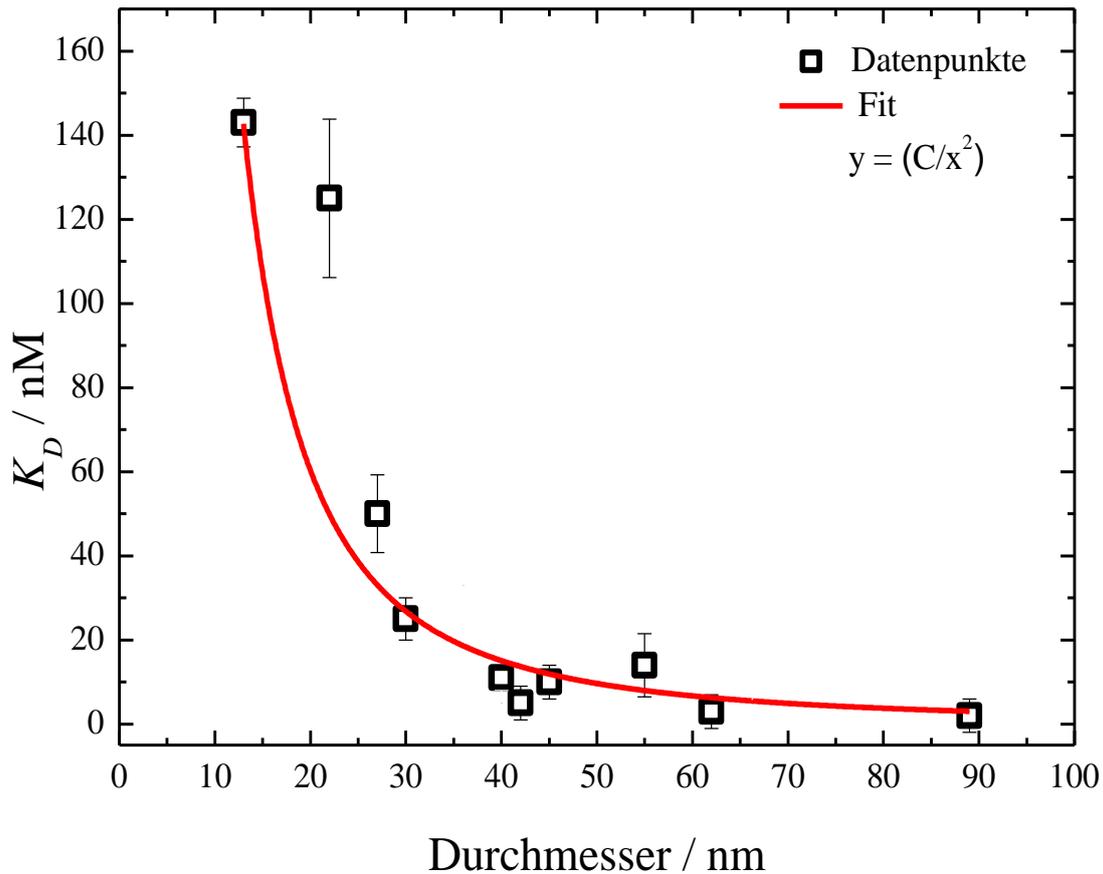
Die nachfolgende Abbildung zeigt die Ergebnisse, die für BSA im Interaktionsprozess mit den 55 nm großen Nanopartikeln erhalten wurden.



**Abbildung 64:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (55 nm), **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel (55 nm) mit einer Konzentration von  $7.9 \cdot 10^8 \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel (55 nm) mit einer Konzentration von  $1.2 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel (55 nm) mit einer Konzentration von  $2.8 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$

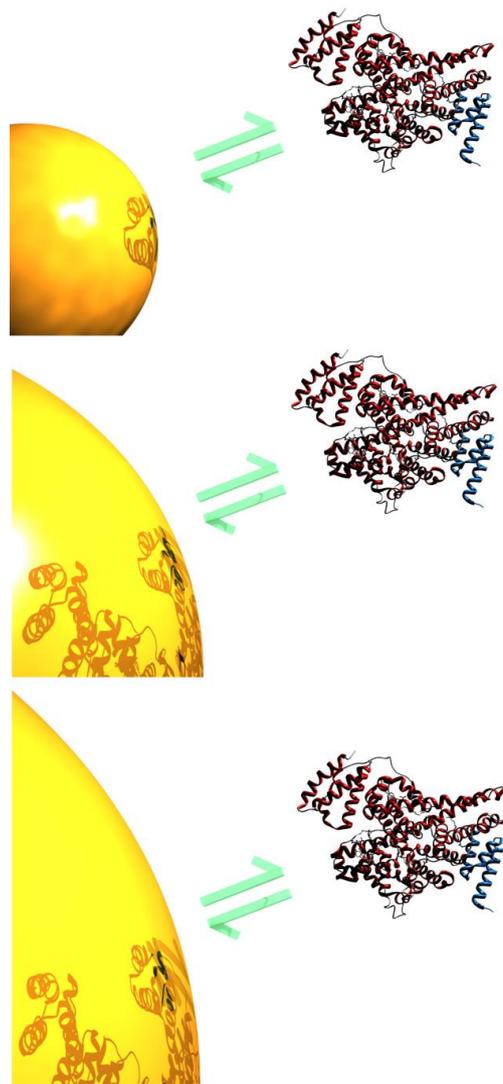
Die BSA Konzentration betrug  $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$  und die Silber-Nanopartikel Konzentration wurde von  $7.9 \cdot 10^8 \text{ NP mL}^{-1}$  bis  $4.5 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$  variiert. Bei der höchsten Nanopartikel-Konzentration wurde für BSA ein  $\alpha$ -Helix-Anteil von 38 % ermittelt. Die berechnete Gleichgewichtskonstante betrug  $14 \pm 2 \text{ nM}$  und ist kleiner als bei den 12 nm und 30 nm großen Nanopartikeln.

Insgesamt wurde das BSA mit zehn verschiedenen Nanopartikel-Größen vermessen. Die restlichen CD-Spektren befinden sich im Anhang. Die bestimmten Gleichgewichtskonstanten aus den CD-Messungen von BSA sind in folgender Abbildung aufgetragen.



**Abbildung 65:** Ergebnisse CD-Messungen von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln mit verschiedenen Durchmessern

Die bestimmten Gleichgewichtskonstanten für den Adsorptions-/Desorptionsprozess von Bovinem Serum-Albumin mit Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln wurden gegen die Nanopartikel-Durchmesser aufgetragen. Die Auftragung wurde mit der Gleichung  $y = (C/x^2)$  angepasst, welche der Krümmung eines Kreises mit dem Korrekturfaktor C entspricht. Der Fit hat einen exponentiellen Verlauf. Nanopartikel mit einem kleinen Durchmesser unter 40 nm besitzen größere Gleichgewichtskonstanten und weisen damit eine geringere Affinität zur Nanopartikel-Oberfläche auf. Bei Nanopartikeln die größer als 40 nm sind, wurden keine großen Unterschiede in den Gleichgewichtskonstanten festgestellt. Ursächlich dafür könnten die unterschiedlichen Größenverhältnisse zwischen dem Protein und dem Nanopartikel sein. Abbildung 66 spiegelt dieses wieder.



**Abbildung 66:** Schematische Darstellung der Größenverhältnisse von Serum-Albumin und 12 nm (*oben*), 40 nm (*mitte*) und 89 nm (*unten*) großen Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln

Bei Nanopartikeln, die größer als 40 nm sind, kann das Protein auf eine flache Oberfläche adsorbieren und dementsprechend auch mit mehr funktionellen Gruppen des Proteins mit der Nanopartikel-Oberfläche wechselwirken. Für große Nanopartikel hat deshalb nur noch die Gesamtoberfläche eine Relevanz, wie viel Protein adsorbiert. Kleinere Nanopartikel (12 nm) bewegen sich bereits im gleichen Größenbereich wie das BSA, das eine Kantenlänge von ungefähr 8 nm x 8 nm besitzt. Hier adsorbiert das Protein auf eine gekrümmte Oberfläche und kann entsprechend entweder mit weniger funktionellen Gruppen mit der Oberfläche interagieren oder müsste seine Tertiärstruktur stärker variieren. Dieses zeigt sich in größeren

Gleichgewichtskonstanten und einer geringeren Affinität zur Adsorption auf die Nanopartikel-Oberfläche. *De Paoli Lacerda et al.* untersuchten die Interaktion von Gold-Nanopartikeln unterschiedlicher Größe mit Blutplasma Proteinen, unter anderem HSA (De Paoli Lacerda et al. 2010). Diese fanden heraus, dass die Bindungsstärke des Proteins mit dem Nanopartikel-Durchmesser zunimmt. *Goy-López et al.* untersuchten mit Hilfe der Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) und Oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie (SERS) die Wechselwirkung von Humanen Serum-Albumin mit Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln in Abhängigkeit der Nanopartikel-Größe (Goy-López et al. 2012). Diese stellten eine unterschiedlich starke Adsorption und Bindungsstärke des Humanen Serum-Albumins in Bezug auf die Oberflächenkrümmung des Nanopartikels fest. Des Weiteren wurden während der Wechselwirkung des HSA mit den kleinen Nanopartikeln (< 40 nm) andere Sekundärstrukturänderungen des Proteins als mit großen Nanopartikeln bestimmt. *Cedervall et al.* untersuchte die Adsorption von Plasma Proteinen auf Nanopartikel im Größenbereich von 70 bis 700 nm. In diesem Größenbereich war das Adsorptionsmuster immer identisch und die Oberflächenkrümmung spielte ebenfalls keine Rolle mehr (Cedervall et al. 2007). *Teichroeb et al.* untersuchten die Denaturierung von Gold-Nanopartikeln im Größenbereich von 5 – 100 nm. Diese stellten fest, dass die Denaturierungsenergie vom Nanopartikel-Durchmesser abhängt (Teichroeb et al. 2008).

Durch die experimentell bestimmten Gleichgewichtskonstanten lassen sich mit der van't Hoff Gleichung Gibbs'sche Energien für den Desorptionsprozess für jede Nanopartikel-Größe bestimmen.

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (54)$$

$$T = 293.15 \text{ K}$$

$$R = 8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

Die berechneten Gibbs-Energien sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Berechnet man die Differenz der Gibbs'schen Energie der 89 nm und 12 nm großen Nanopartikel beträgt  $\Delta(\Delta G) = 10.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Die Energie, die für eine komplette Denaturierung von Serum-Albumin nötig ist, beträgt  $20.3 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 1.5 \text{ kJ mol}^{-1}$

(Krishnakumar und Panda 2002). Die Unterschiede in der Gibbs-Energie für die Desorption von der Nanopartikel-Oberfläche liegt demnach im Bereich einer Teilentfaltung von Serum-Albumin.

**Tabelle 8:** Zusammenfassung der  $K_D$ -Werte und die Berechnung der Gibbs'schen Energie  $\Delta G$  aus der van 't Hoff Gleichung für verschieden große Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel

Durchmesser / nm	$K_D$ / nM	$\Delta G$ / kJ mol <sup>-1</sup>
12	143 ± 21	38.4 ± 1.6
22	125 ± 20	38.7 ± 5.8
27	50 ± 9	40.9 ± 7.6
30	25 ± 2	42.6 ± 8.5
40	11 ± 2	44.7 ± 12.2
42	5 ± 2	44.6 ± 6.7
45	10 ± 2	44.9 ± 1.8
55	14 ± 2	44.1 ± 6.6
62	3.3 ± 1	47.6 ± 7.1
89	2 ± 1	48.8 ± 7.3

Die Untersuchungen der Bildung der Protein-Corona von BSA auf unterschiedlich großen Silber-Nanopartikeln zeigen einen Einfluss bei Nanopartikeln, die kleiner als 40 nm sind. Bei Nanopartikeln, die größer als 40 nm sind, adsorbiert das Protein auf eine flache Oberfläche. Bei der Interaktion von Nanopartikeln mit Proteinen spielt bei großen Nanopartikeln einzig die vorhandene Oberfläche eine Rolle. Bei kleineren Nanopartikel-Durchmessern sind Nanopartikel und BSA im gleichen Größenbereich. Das Protein kann nicht mehr auf eine quasi-flache Oberfläche adsorbieren. Die Folge ist, dass das Protein mit weniger funktionellen Gruppen an der Oberfläche gebunden ist.

#### **4.4. Einfluss auf die Enzym-Funktion**

In den vorherigen Kapiteln wurde mit Hilfe der Dialyse und dem Bradford-Protein-Assays gezeigt, dass Proteine in einer Monolage auf die Nanopartikel-Oberfläche adsorbieren. Des Weiteren zeigten CD-Messungen, dass Proteine bei der Adsorption auf die Nanopartikel-

Oberfläche denaturieren. Strukturänderungen im Protein haben einen Funktionsverlust zur Folge. Eine wichtige Fragestellung in der Untersuchung von Nanopartikel-Protein-Interaktionen ist, welchen Einfluss diese auf die Funktion der jeweiligen Proteine haben.

### **4.4.1. Aktivität von Enzymen in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln**

Die Untersuchungen der Enzymaktivität in Gegenwart von Nanopartikeln wurden mit drei relevanten Enzymen durchgeführt: Humanes Lysozym, Bovines Trypsin und Bovines Chymotrypsin. Als „Modell-Nanopartikel“ wurden PVP-stabilisierte Gold-Nanopartikel gewählt. Diese erwiesen sich am geeignetsten, sie auf Grund ihrer Polymer-Beschichtung im Puffer stabil sind.

### **4.4.2. Humanes Lysozym**

Die Aktivitätsbestimmung von Lysozym erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Assays. Für dieses Vorhaben musste das Substrat mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Hierzu wurden 24 mg Peptidoglycan und 11 mg Fluoresceinisothiocyanat (FITC) in 2.5 mL 0.5 molaren Natriumbicarbonat/Carbonatpuffer (pH 9.3) gegeben und 4 Stunden bei 37 °C gerührt. Anschließend wurde die Dispersion zweimal mit einem Natriumbicarbonat/Carbonatpuffer, dann jeweils einmal mit Reinstwasser, Aceton und Ethanol gewaschen und bei 2800 U min<sup>-1</sup> abzentrifugiert (Maeda 1980).

Es wurde zunächst eine wässrige Lysozym-Stammlösung von 0.015 g mL<sup>-1</sup> angesetzt. Die wässrige Stammlösung des Substrates betrug 1.2 mg mL<sup>-1</sup>. Von den PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln wurde eine Verdünnungsreihe mit verschiedenen Konzentrationen erstellt. Anschließend wurden jeweils zu 5 µL der Lysozym-Stammlösung 15 µL der PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikel verschiedener Konzentrationen hinzugefügt und 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von PBS-Puffer, so dass das Volumen 195 µL betrug und eine Zugabe von 5 µL (Mess-Konzentration 1.5 µM) des Substrates (PGN-FITC). Nach Durchmischen der Probe wurde diese sofort vermessen.

Durch die Auftragung der Hemmung, die der Oberflächenbedeckung der Nanopartikel-Oberfläche entspricht, gegen die logarithmische Oberflächenplätze-Konzentration, lässt sich eine Gleichgewichtskonstante mit Hilfe der Hill-Gleichung bestimmen. Mit der Hill-

Gleichung wurde ursprünglich die Adsorption von Liganden an ein Biomolekül beschrieben (Hill 1910). Es lässt sich ebenfalls die Adsorption von Proteinen auf die Nanopartikel-Oberfläche beschreiben (Gebauer et al. 2012; Jiang et al. 2010; Röcker et al. 2009). Dabei zeigt diese Anpassung den Verlauf der Sättigung bei der Adsorption von Enzymen auf die Nanopartikel-Oberfläche und man erhält eine Aussage über den Grad der Kooperativität (Goutelle et al. 2008; Jackson 2006). Die Hill-Funktion wird mit folgender Gleichung beschrieben (Goutelle et al. 2008):

$$\theta = \theta_{\max} \frac{1}{1 + \left( \frac{K_D}{[E]} \right)^n} \quad (55)$$

$\theta$  = Sättigung

$K_D$  = Gleichgewichtskonstante [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

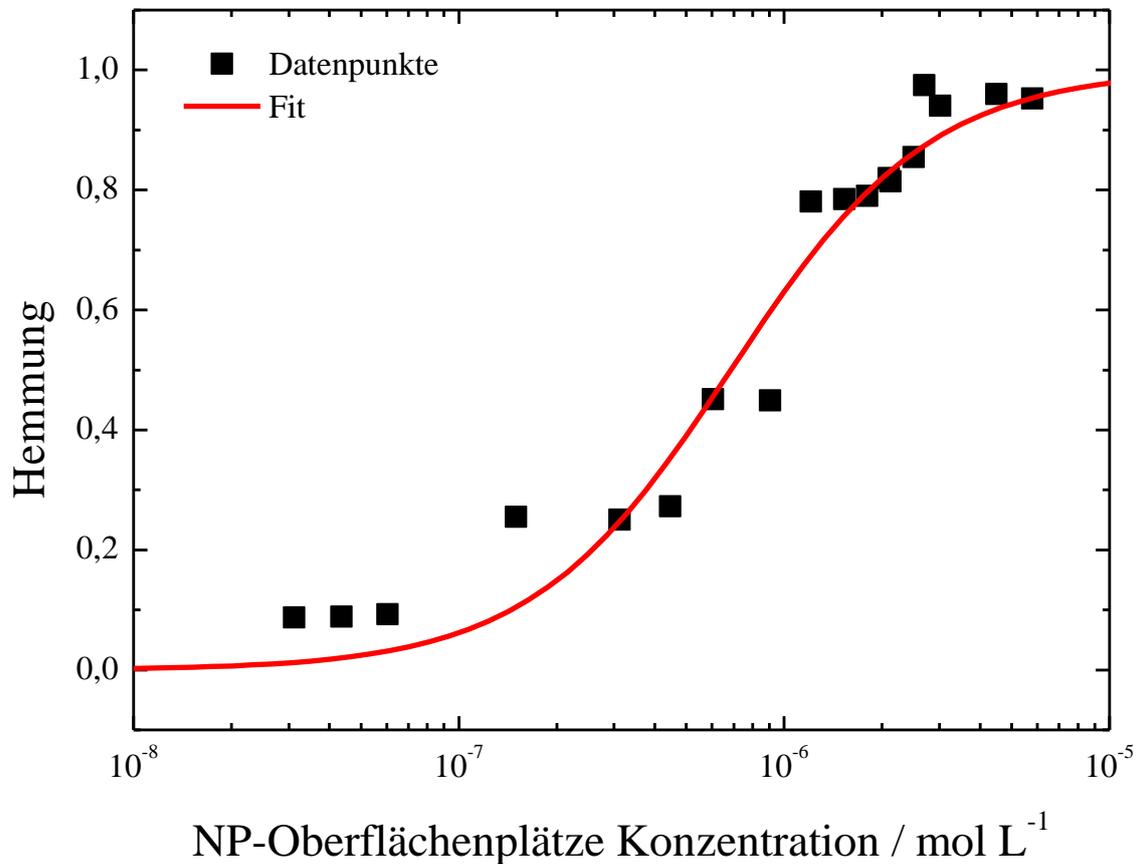
$n$  = Hill-Koeffizient

$[E]$  = Enzymkonzentration [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

Wenn der Hill-Koeffizient  $n = 1$  beträgt, dann ist die Adsorption nicht-kooperativ. Das bedeutet, dass die Adsorption von Enzymen unabhängig von den bereits adsorbierten ist. Bei einer positiven Kooperativität ( $n > 1$ ) wird die Adsorption durch die adsorbierten Enzyme begünstigt, während bei der negativen Kooperativität ( $n < 1$ ) eine weitere Adsorption ungünstig ist. Es wurde eine Gleichgewichtskonstante von 9.1 nM erhalten und mit  $n = 1$  ist die Adsorption der Lysozym-Moleküle auf die Nanopartikel-Oberfläche nicht-kooperativ.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine konzentrationsabhängige Hemmung der Lysozymaktivität stattfindet. Auch in der Literatur wurde die Hemmung von Lysozym in Gegenwart von Nanopartikel beschrieben (Vertegel et al. 2004). Die kleine Gleichgewichtskonstante von 9.1 nM spricht für eine große Affinität des Lysozyms auf die Nanopartikel-Oberfläche zu adsorbieren. In Kapitel 4.2.4. wurde bereits diskutiert, dass unter anderem Oberflächenladungen beim Adsorptionsverhalten des Proteins eine wichtige Rolle spielen. Da das Lysozym insgesamt eine positive Oberflächenladung besitzt, adsorbiert es bevorzugt auf die PVP-funktionalisierten Nanopartikel, die ein negatives Zeta-Potential besitzen.

Folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse. Es ist die Hemmung des Lysozyms gegen die Oberflächenplätze-Konzentration aufgetragen.



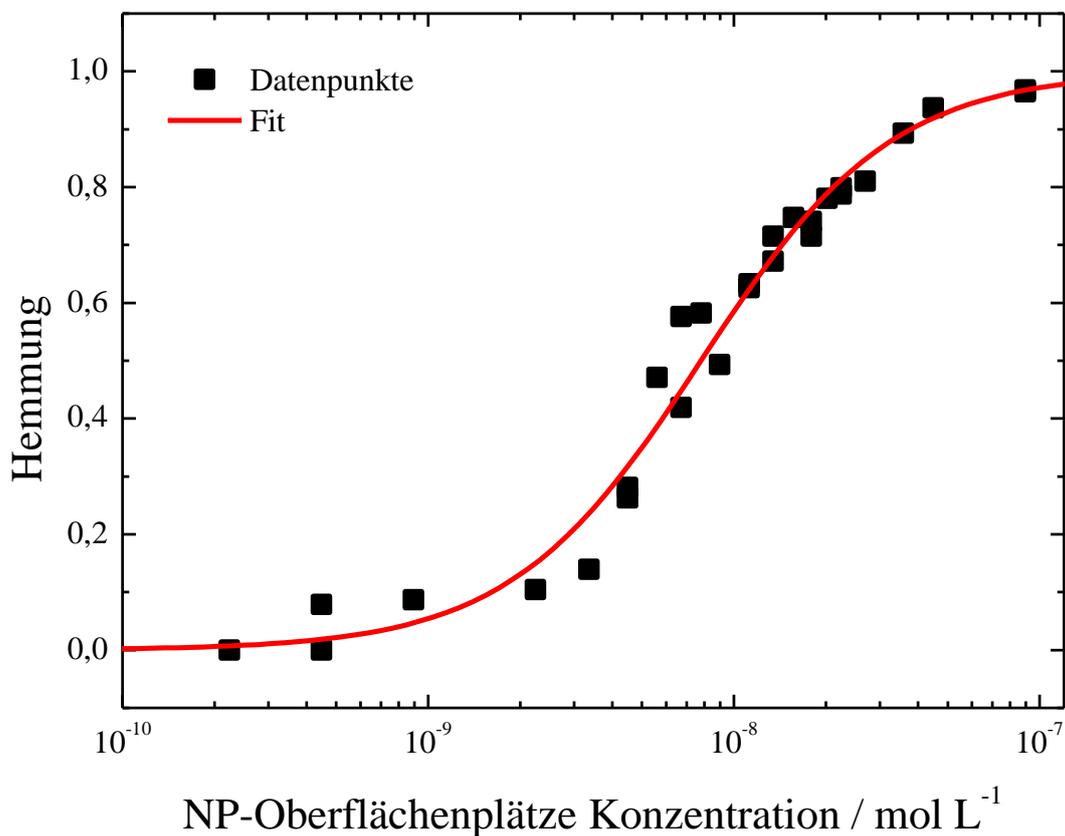
**Abbildung 67:** Bindungskurve aus der Hemmung der Enzymaktivität von Bovinem Lysozym in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (Goldkern 13 nm, Gesamtdurchmesser 50 nm), Zeta-Potential: - 30 mV, in rot: Hill-Fit mit  $n = 1.0$  und  $K_D = 9.1$  nM

### 4.4.3. Bovines Trypsin

#### 4.4.3.1. Enzymaktivität von Trypsin in Gegenwart von negativ geladenen PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln

Die Enzymaktivität von Trypsin in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln erfolgte nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden. Nach der Inkubationszeit erfolgte eine Zugabe von Acetatpuffer pH 7 und des fluoreszenzmarkierten Substrates. Für den Trypsin-Assay wurde Z-Phe-Arg-AMC als Substrat verwendet. Die Konzentration des

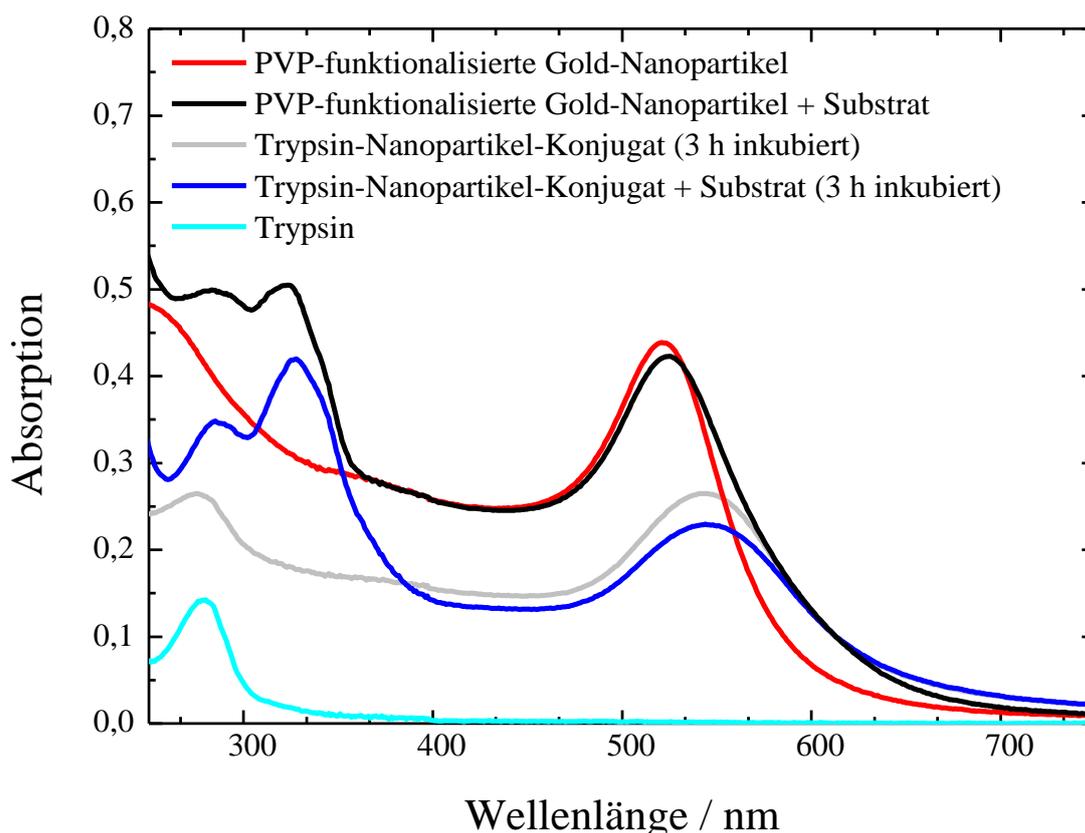
Substrates betrug  $1 \mu\text{M}$ . Die Mess-Konzentration des Trypsins betrug  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Die PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikel hatten einen Gesamtdurchmesser von  $50 \text{ nm}$ , wobei der Durchmesser des Goldkerns  $13 \text{ nm}$  betrug. Eine Bestimmung des Zeta-Potentials ergab einen Wert von  $-30 \text{ mV}$ . Abbildung 68 zeigt die Ergebnisse der Aktivitäts-Messungen von Trypsin in Gegenwart der Gold-Nanopartikel mit verschiedenen Konzentrationen.



**Abbildung 68:** Bindungskurve aus der Hemmung der Enzymaktivität von Trypsin in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (Goldkern  $13 \text{ nm}$ , Gesamtdurchmesser  $50 \text{ nm}$ ), Zeta-Potential:  $-30 \text{ mV}$ , Hill-Fit mit  $n = 1.5$  und  $K_D = 7.5 \text{ nM}$  (rot)

Der Verlauf der Hemmung in Abhängigkeit der Nanopartikel-Konzentration ergab eine Bindungskurve, die nach Hill angepasst wurde. Damit konnte eine Gleichgewichtskonstante von  $7.5 \text{ nM}$  bestimmt werden. Für  $n$  wurde ein Wert von  $1.5$  bestimmt, was einer positiv kooperativen Bindung des Trypsin auf die Gold-Nanopartikel-Oberfläche entspricht (Jackson 2006). Dieses bedeutet, dass durch die Adsorption des Trypsins auf die Nanopartikel-Oberfläche eine weitere Adsorption von Trypsin-Molekülen begünstigt wird.

Eine Fragestellung, welche vor der Interpretation der Aktivitätsmessungen geklärt werden musste war, ob das Substrat durch die Gegenwart der Nanopartikel beeinflusst wird. So könnte dieses ebenfalls auf die Nanopartikel-Oberfläche adsorbieren. Deshalb wurden von allen Komponenten UV-Vis-Spektren gemacht. Alle Proben wurden vor der Vermessung 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und die Konzentration des Trypsins entsprach einer berechneten Monolage auf der Gold-Nanopartikel-Oberfläche (Abbildung 69).



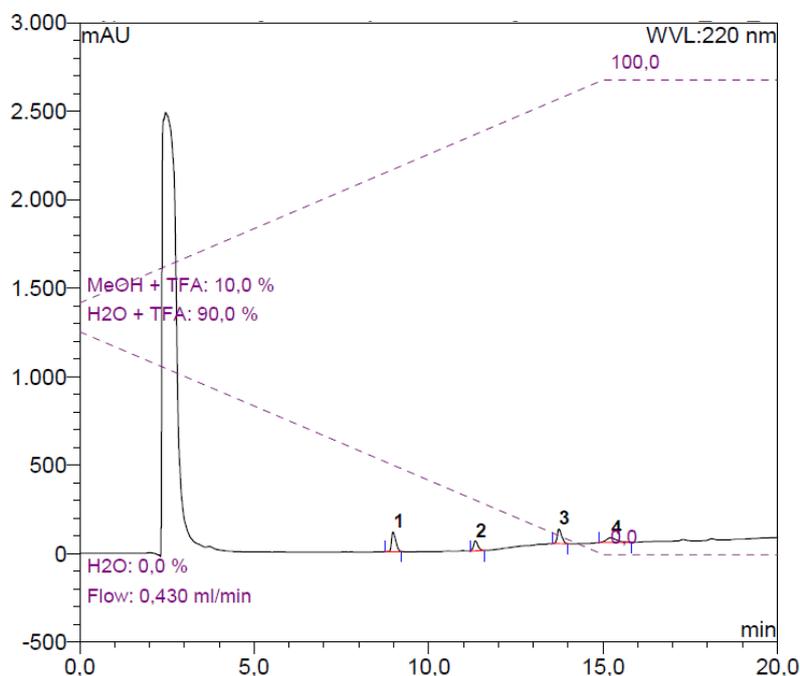
**Abbildung 69:** UV-Vis-Spektren der PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikel, des Trypsins und des Substrates, in einem Acetatpuffer (pH 7) aufgenommen

Die UV-Vis-Spektren zeigten eine Verschiebung des Maximums für die Gold-Nanopartikel Absorption in Langwellige, welche bei einer Adsorption von Trypsin-Molekülen auf die Gold-Nanopartikel-Oberfläche eintritt. In Abwesenheit einer Trypsin-Monolage konnte bei der Zugabe von Substrat, ebenfalls eine leichte Verschiebung ins Langwellige beobachtet werden. Dieses findet in Anwesenheit der Protein-Corona nicht statt. Man erhält demnach einen Hinweis darauf, dass das Substrat in Gegenwart von Gold-Nanopartikeln mit einer

## Ergebnisse und Diskussion

umgebenden Protein-Corona, nicht auf die Nanopartikel-Oberfläche adsorbiert oder von dieser beeinflusst wird.

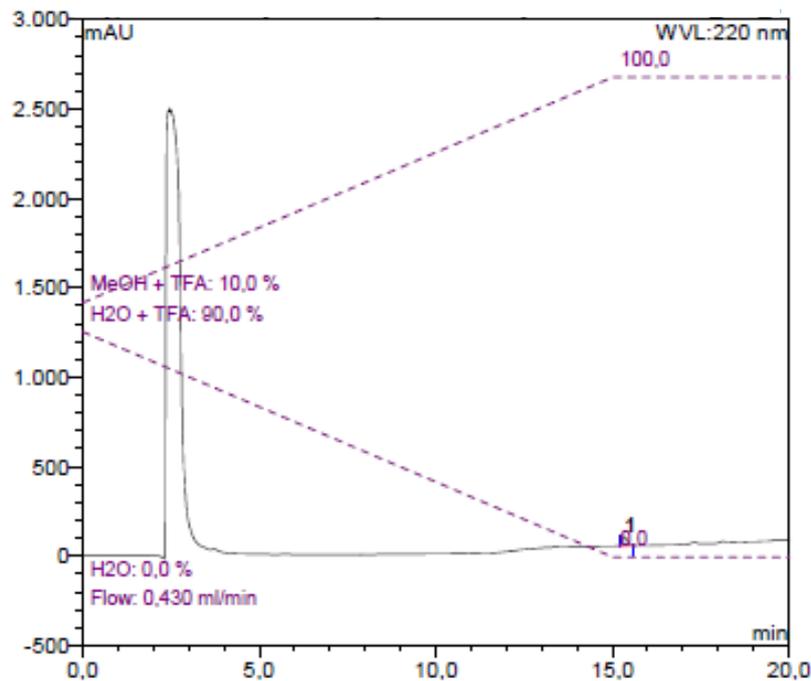
Es wurde ebenfalls mittels HPLC am Trypsin in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln überprüft, ob sich das Substrat in Gegenwart der Gold-Nanopartikel umsetzt. So konnte wie schon mit Hilfe der UV-Vis-Spektren die Möglichkeit der Adsorption des Substrates auf die Gold-Nanopartikel-Oberfläche ausgeschlossen werden. Bei dieser Variante wäre es ebenfalls zu einer geringen Steigung in der Fluoreszenzintensität beim Enzym-Assay gekommen. Folgende Abbildung zeigt die HPLC Ergebnisse von Trypsin in Gegenwart von PVP-stabilisierten Gold-Nanopartikeln und dem Substrat.



**Abbildung 70:** HPLC-Messung der Trypsin-Nanopartikel Konjugate in Gegenwart des Substrates, Säule: YMC ODS-A (150 x 3.0 mm, 5  $\mu$ m), Lösungsmittel: Methanol/Wasser (0.05 % TFA), Detektionswellenlänge 220 nm, Flussrate: 0.430 mL/min, Retentionszeit  $t_R$ : Peak 1: 8.98 min, Peak 2: 11.34 min, Peak 3: 13.74 min, Peak 4: 15.23 min.

Das Enzym ( $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) und die Gold-Nanopartikel ( $5 \cdot 10^{10}$  NPs  $\text{mL}^{-1}$ ) wurden vor der Zugabe des Substrates 3 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte 30 min vor der Messung eine Zugabe des Substrates ( $1 \mu\text{M}$ ). Bei Peak 1 bis 3 handelt es sich um das gesplante Substrat. HPLC-Messungen der einzelnen Komponenten und des umgesetzten Substrates in Abwesenheit der Nanopartikel befinden sich im Anhang. Eine HPLC Messung des Substrates

in Gegenwart von Gold-Nanopartikeln ohne weitere Zugabe des Enzyms zeigt, dass das Substrat hier ungespalten bleibt.

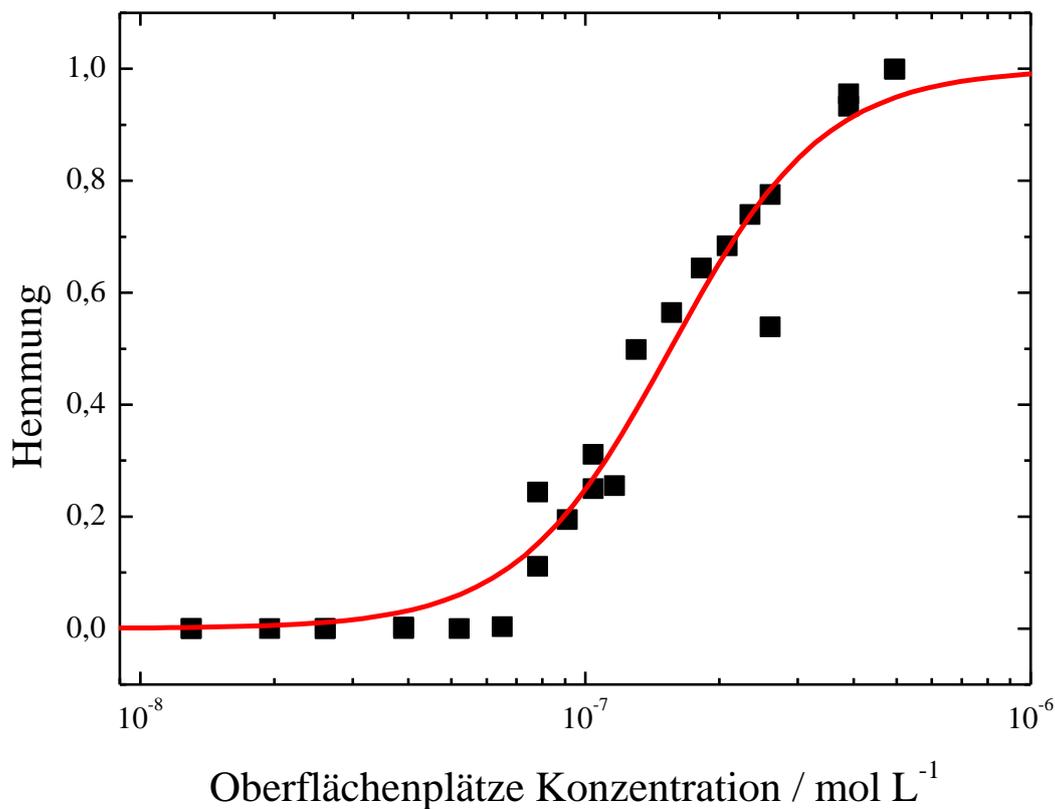


**Abbildung 71:** HPLC-Messung der Trypsin-Nanopartikel Konjugate in Gegenwart des Substrates, Säule: YMC ODS-A (150 x 3.0 mm, 5  $\mu$ m), Lösungsmittel: Methanol/Wasser (0.05 % TFA), Detektionswellenlänge 220 nm, Flussrate: 0.430 mL/min, Retentionszeit  $t_R$ : Peak 1: 15.34 min

#### 4.4.3.2. Enzymaktivität von Trypsin in Gegenwart von positiv geladenen PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln

Die Enzymaktivität von Trypsin in Gegenwart von positiv geladenen Gold-Nanopartikeln erfolgte wie bei den PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln mit einer negativen Ladung ebenfalls nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden. Diese Nanopartikel sind ebenfalls PVP-funktionalisiert, besitzen aber aufgrund der Reduktion mit Polyethylenimin (PEI) anstatt mit Citrat eine positive Oberflächenladung (Sun et al. 2005). Nach der Inkubation bei Raumtemperatur (20 °C) erfolgte eine Zugabe von Acetatpuffer (pH 7) und 2-3 Minuten vor der Messung die Substratzugabe (Z-Phe-Arg-AMC, 1  $\mu$ M). Die Konzentration des Trypsins in den Mikrowell-Platten betrug konstant 125  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Die PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikel besitzen einen Gesamtdurchmesser von 25 nm. Der Goldkern ist 13 nm groß. Es wurde ein positives Zeta-Potential von +30 mV bestimmt. In der nachfolgenden Abbildung

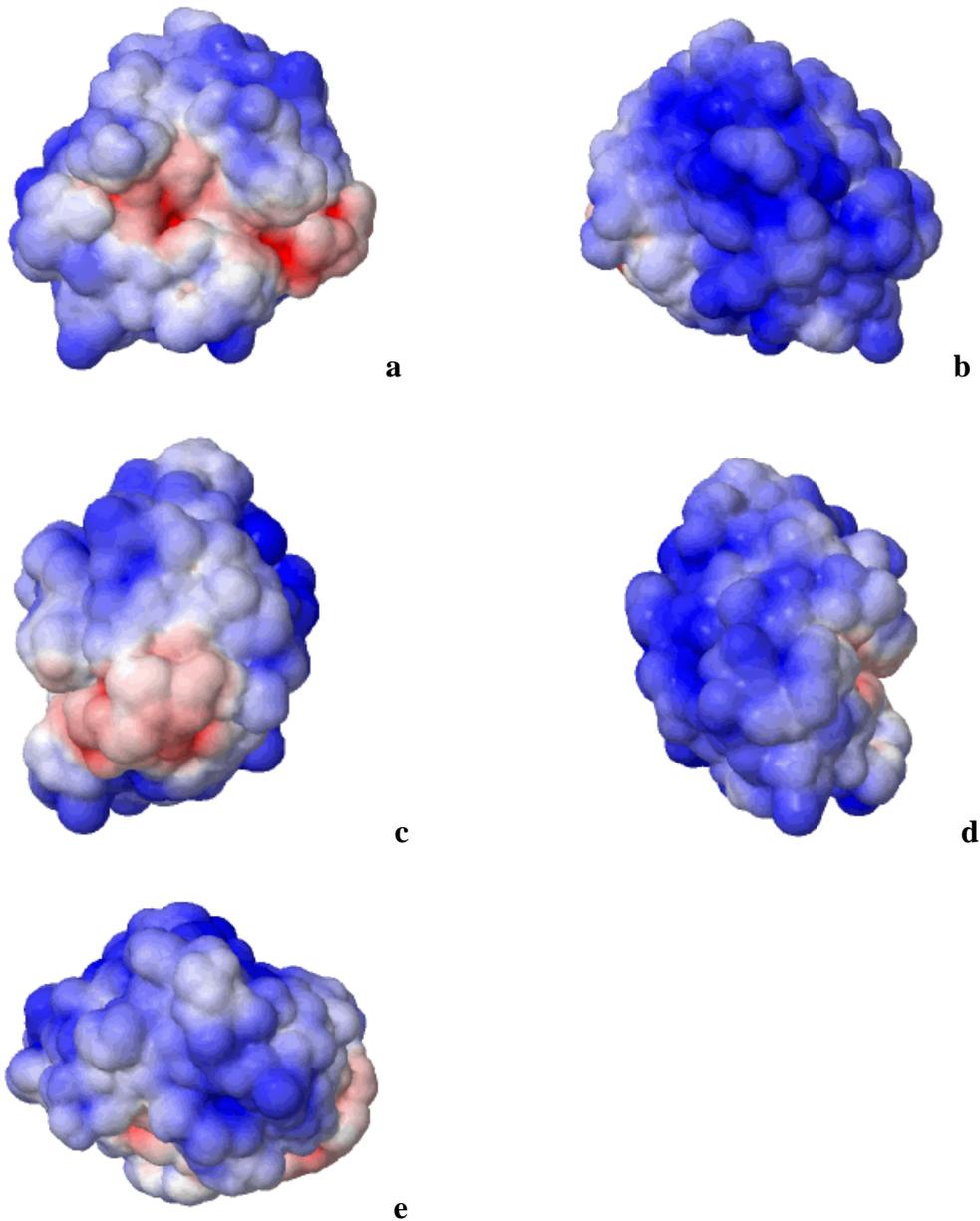
sind die Ergebnisse der Aktivitäts-Messungen gegen die Oberflächenplätze-Konzentration aufgetragen.



**Abbildung 72:** Bindungskurve aus der Hemmung der Enzymaktivität von Trypsin in Gegenwart von positiv geladenen Gold-Nanopartikeln (Goldkern 13 nm, Gesamtdurchmesser 25 nm), Zeta-Potential: + 30 mV, Hill-Fit mit  $n = 2.24$  und  $K_D = 154$  nM (rot)

Mit Hilfe der Hill-Anpassung wurde eine Gleichgewichtskonstante von 154 nM bestimmt. Die Adsorption der Trypsin-Moleküle ist positiv-kooperativ und hat einen stärker kooperativen Charakter als er für die Adsorption der Trypsin-Moleküle auf den negativ geladenen Gold-Nanopartikeln bestimmt wurde. Die Gleichgewichtskonstante verdeutlicht allerdings, dass die Affinität der Trypsin-Moleküle auf die positiv geladene Nano-Oberfläche zu adsorbieren, wesentlich schwächer ist, als für die negativ geladene Nanopartikel-Oberfläche. So ist die Gleichgewichtskonstante hier etwa um das 20-fache größer.

Um die Ursache für das unterschiedlich ausgeprägte Adsorptionsverhalten zu bestimmen, wurde das Oberflächenpotential des Enzyms berechnet. Für die Berechnungen wurde der pH-Wert von 7 angenommen, bei diesem auch die Aktivitätsmessungen stattfanden. Folgende Abbildung zeigt, die berechnete Ladung des Trypsins.



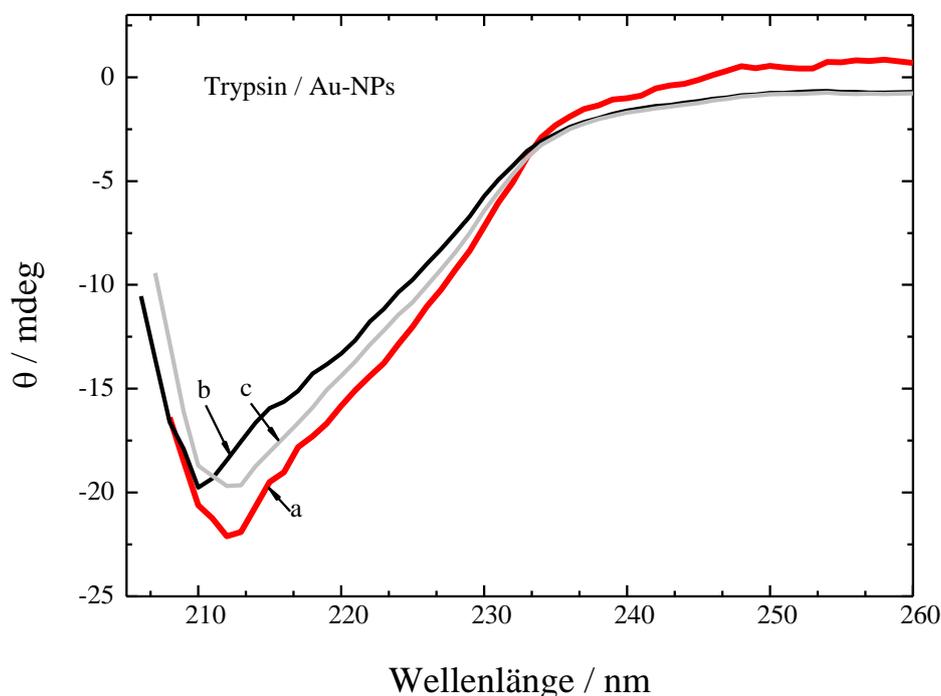
**Abbildung 73:** Oberflächenpotential von Bovinem Trypsin, PDB-Code: 3ATL, rot: negative Oberflächenladung, blau: positive Oberflächenladung, **a:** Frontalansicht des aktiven Zentrums, **b:** Rückansicht, aktives Zentrum hinten, **c:** Seitenansicht, aktives Zentrum links, **d:** Seitenansicht aktives Zentrum rechts, **e:** von oben, Ladungen erstellt für pH 7, Bilder online erstellt mit <http://kryptonite.nbcr.net/pdb2pqr> (Dolinsky et al. 2004)

Das Trypsin-Molekül hat insgesamt sehr viel positiv geladene Bereiche (Hildebrandt et al. 2006). Dieses erklärt, warum das Trypsin in den Aktivitätsmessungen stärker in Gegenwart der PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikel mit der negativen Ladung stärker gehemmt wird. Insgesamt wurde auch bei anderen negativ geladenen Nanopartikeln eine

Denaturierung der Trypsin Sekundärstruktur und Hemmung der Enzymaktivität bestimmt (Kondo et al. 1993).

### 4.4.3.3. Sekundärstruktur von Trypsin in Gegenwart von Gold-Nanopartikeln (PVP-funktionalisiert)

Um Änderungen in der Sekundärstruktur des Trypsins im Interaktionsprozess mit PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln zu untersuchen, wurden CD-Spektren von Trypsin und Trypsin in Gegenwart der Nanopartikel aufgenommen. Die Messungen fanden unter den gleichen Bedingungen wie die Messungen der Enzymaktivitäten statt. Es wurde bei pH 7 in einem frisch angesetzten Acetatpuffer gemessen. Die Konzentration des Trypsins betrug  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ , die Konzentration der positiv geladenen Nanopartikel  $4.5 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$  und der negativ geladenen  $9.3 \cdot 10^6 \text{ NP mL}^{-1}$ . Alle Proben wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur in Protein LoBind® Tubes inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) in einer 1 mm Quarzküvette bei einer Spaltbreite von  $1 \mu\text{m}$  und einem Scanschritt von  $1 \text{ nm}$  vermessen. Folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der CD-Messungen.



**Abbildung 74:** *a*: CD-Spektrum von reinem Trypsin ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in Acetatpuffer (pH 7), *b*: CD-Spektrum von Trypsin ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in Acetatpuffer (pH 7) in Gegenwart von positiv geladenen Gold-Nanopartikeln (Monolage), *c*: CD-Spektrum von Trypsin ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in Acetatpuffer (pH 7) in Gegenwart von negativ geladenen Gold-Nanopartikeln (Monolage)

Für reines Trypsin wurde ein  $\alpha$ -Helix-Anteil von 25 % ermittelt, welcher auch im Bereich des Literaturwertes liegt (Simon et al. 2001). Sowohl in der Gegenwart von positiv geladenen als auch der negativ geladenen PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikel konnten Strukturänderungen ermittelt werden. In Gegenwart der positiv geladenen Gold-Nanopartikel betrug der  $\alpha$ -Helix Anteil 14.8 % und der negativ geladenen Gold-Nanopartikel 14.7 %. Das Trypsin denaturiert in Gegenwart beider Gold-Nanopartikel Spezies. Die drei Aminosäuren Serin-195, Histidin-57 und Asparagin-102, welche das aktive Zentrum des Trypsins bilden, befinden sich in verschiedenen Domänen des Enzyms (Stroud 1974). Die nicht-native Faltung des Enzyms bewirkt offensichtlich, dass sich die katalytische Triade nicht mehr in der korrekten Konformation befindet. Diese Ergebnisse zeigen, dass das positiv geladene Trypsin bevorzugt auf die negativ geladenen Nanopartikel adsorbiert. Für die Hemmung sind wahrscheinlich, die mit der Adsorption verbundenen Strukturänderungen im Trypsin verantwortlich, die ebenfalls zu Strukturänderungen im aktiven Zentrum führen könnten.

#### **4.4.3.4. Desorptionsexperimente mit Trypsin von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln**

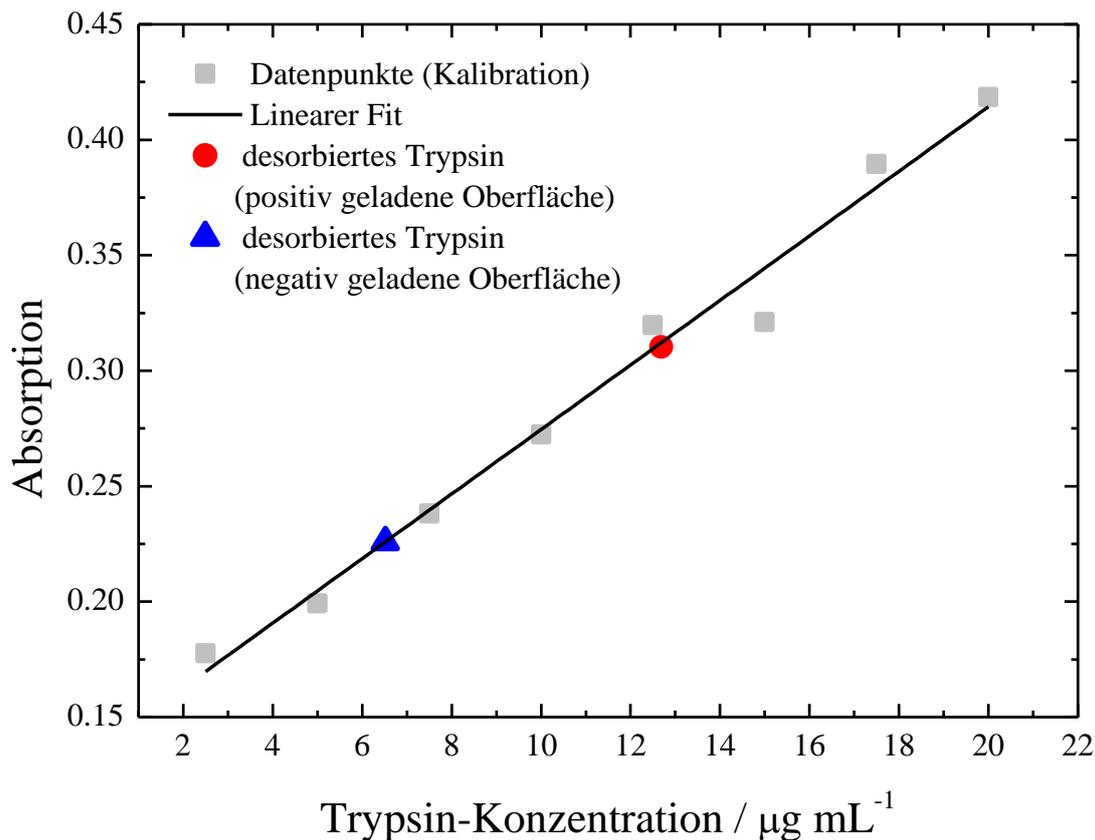
Eine weitere Fragestellung war, ob eine Desorption der Enzyme von der Nanopartikel-Oberfläche erfolgt und diese dann noch eine Aktivität vorweisen. Die Desorptionsexperimente wurden mit dem Enzym Trypsin durchgeführt. Hierzu wurde eine Konzentration von  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  verwendet und das Enzym mit einer Konzentration von  $1 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$  drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die gewählten relativen Verhältnisse entsprechen dabei einer berechneten Monolage an Enzym. Die Trennung von freien und adsorbierten Trypsin-Molekülen, erfolgte mit Hilfe der Zentrifugation, die eine in der Literatur anerkannte Methode zur Trennung von freien und adsorbierten Nanopartikeln darstellt (Oliva et al. 2003).

Die Nanopartikel-Enzymlösungen wurden jeweils 60 min bei  $10000 \text{ U min}^{-1}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Zu dem Feststoff wurden jeweils 10 mL Reinstwasser hinzugegeben und die Nanopartikel-Enzym Lösung redispergiert. Die Lösung wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) equilibriert. Anschließend wurde die Lösung erneut 60 min bei  $10000 \text{ U min}^{-1}$  zentrifugiert, um die desorbierten Trypsin Moleküle von den Nanopartikel-Enzym-Konjugaten zu trennen. Anschließend erfolgte eine

Quantifizierung des desorbierten Trypsin Gehaltes mit Hilfe eines Bradford-Protein-Assays und der UV-Vis-Spektroskopie.

### **4.4.3.5. Quantifizierungsexperimente mit dem Bradford-Protein-Assay und UV-Vis-Spektroskopie**

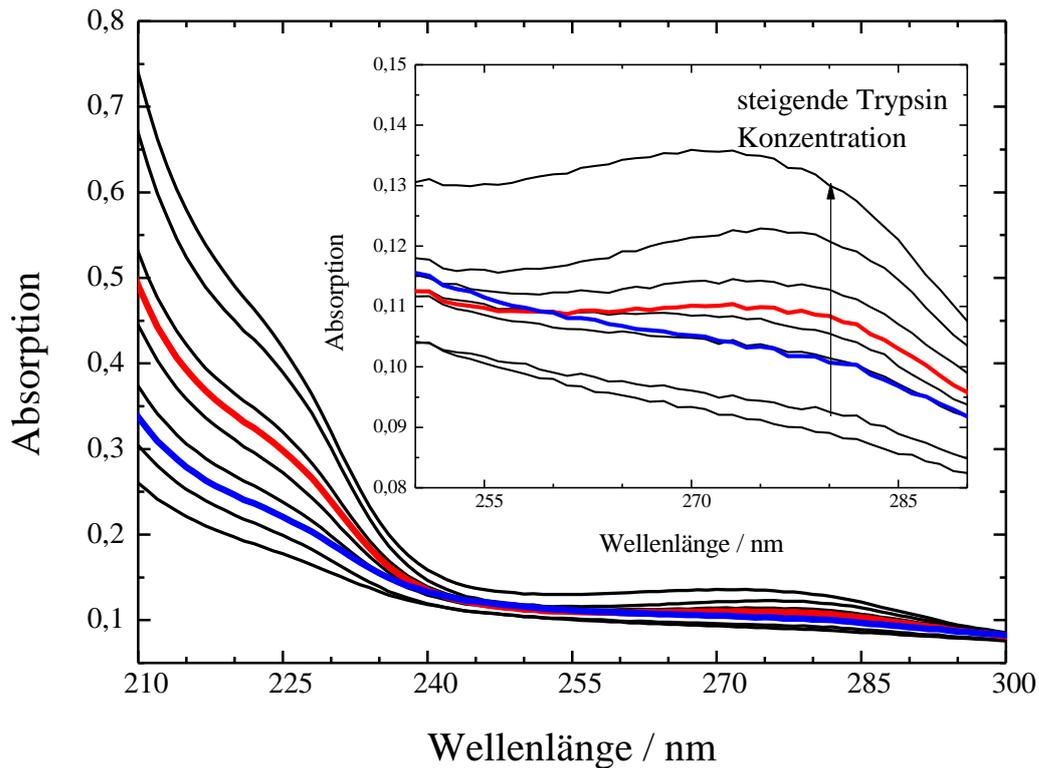
Die isolierten freien Trypsin Moleküle wurden mit Hilfe eines Cellulose-Ester-Filters mit einem „molecular weight cut off“ von 4000 D durch Zentrifugation auf 1 mL eingengt. Die Zentrifugationszeit betrug 45 min bei  $14000 \text{ U min}^{-1}$ . Die Aufkonzentration war nötig, damit sich die Trypsin-Konzentration im detektierbaren Bereich von 1 bis  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  befand. Die Quantifizierung von Proteinkonzentrationen wurde mit einem Bradford-Protein-Assay durchgeführt. Diese Methode ist in der Literatur gut beschrieben und wird häufig angewandt (Brown et al. 2001). Es wurde zunächst eine Kalibrationsgerade mit bekannten Trypsin Konzentrationen zwischen 0 und  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  aufgenommen. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  der Trypsin-Lösung, welche von der Nanopartikel-Oberfläche desorbiert sind, entnommen. Nach einer Zugabe von 900  $\mu\text{L}$  Farbstoff (Coomassie Brilliant Blue G 250) wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und mit Hilfe der Kalibrationsgeraden die Proteinmenge bestimmt. Die Bestimmung wurde für jede Konzentration dreimal durchgeführt. Folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse.



**Abbildung 75:** Quantitative Bestimmung der Trypsin-Konzentration mittels Bradford-Protein-Assay, *grau*: Datenpunkte der Kalibration, *rot*: desorbiertes Trypsin von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (Zeta-Potential + 30 mV), *blau*: desorbiertes Trypsin von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (Zeta-Potential – 30 mV)

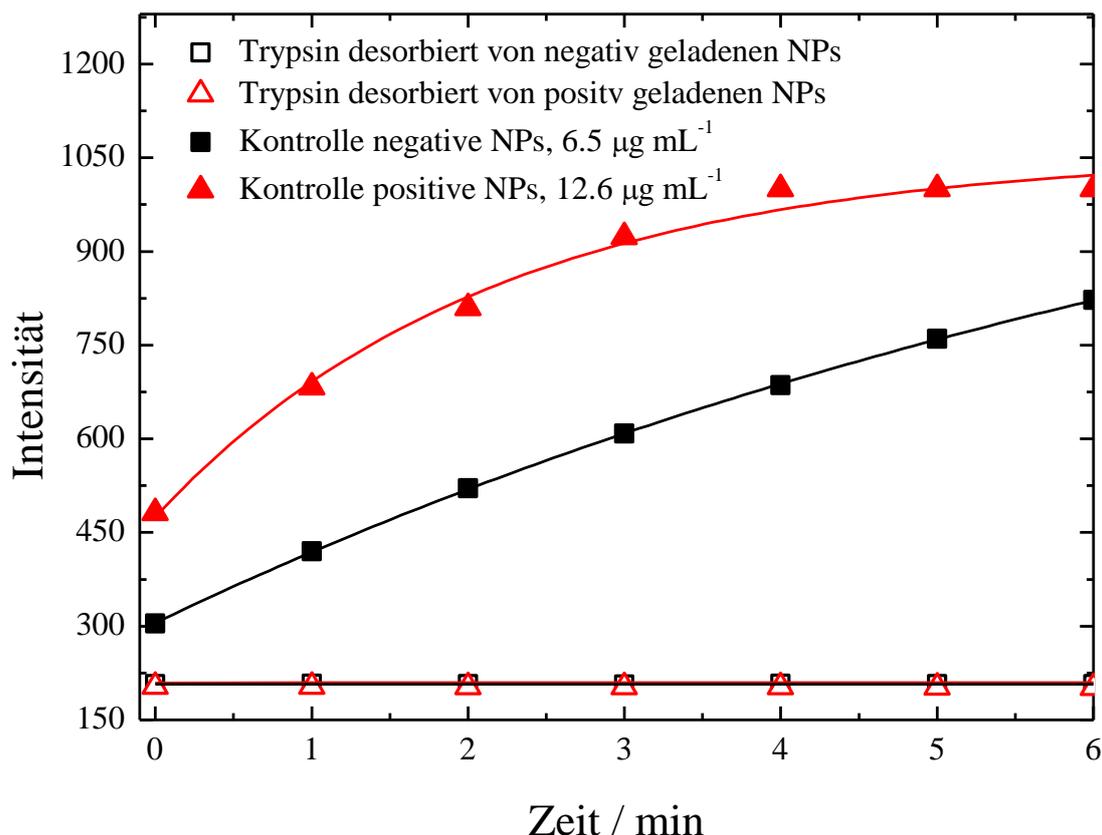
Für die von den PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikel mit einer positiven Oberflächenladung, desorbierten Trypsin Moleküle wurde eine Konzentration von  $12.6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ermittelt. Für die PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikel mit der negativen Oberflächenladung wurde eine Konzentration von  $6.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  bestimmt.

Es wurden ebenfalls UV-Vis-Spektren von den Trypsin-Moleküle aufgenommen, welche von der Gold-Nanopartikel-Oberfläche desorbiert sind. Für die Kalibrierung wurden Spektren von Trypsin-Lösung mit bekannten Konzentrationen im Bereich von 0 bis  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  aufgenommen. Es erfolgte eine Messung der Absorption bei 280 nm, welche typisch für die Absorption von aromatischen Aminosäuren im Protein ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 76 dargestellt.



**Abbildung 76:** Quantifizierung der Trypsin-Konzentration mittels UV-Vis-Spektroskopie, UV-Vis-Spektrum der von den PEI-funktionalisierten (*rot*) und PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (*blau*) desorbierten Trypsin-Moleküle und die entsprechenden Kalibrations-Spektren mit Trypsin-Konzentrationen von 0 bis 20 µg mL<sup>-1</sup> (*schwarz*)

Von den desorbierten Trypsin-Molekülen wurde anschließend die Enzymaktivität bestimmt. Die Durchführung erfolgte wie in den Kapiteln 3.5.2. und 3.5.3. beschrieben. Als Kontrolle wurde eine Trypsin-Lösung angesetzt und bei den gleichen Konzentrationen gemessen, wie mit der Bradford-Methode ermittelt wurde. Folgende Abbildungen zeigen die Ergebnisse.



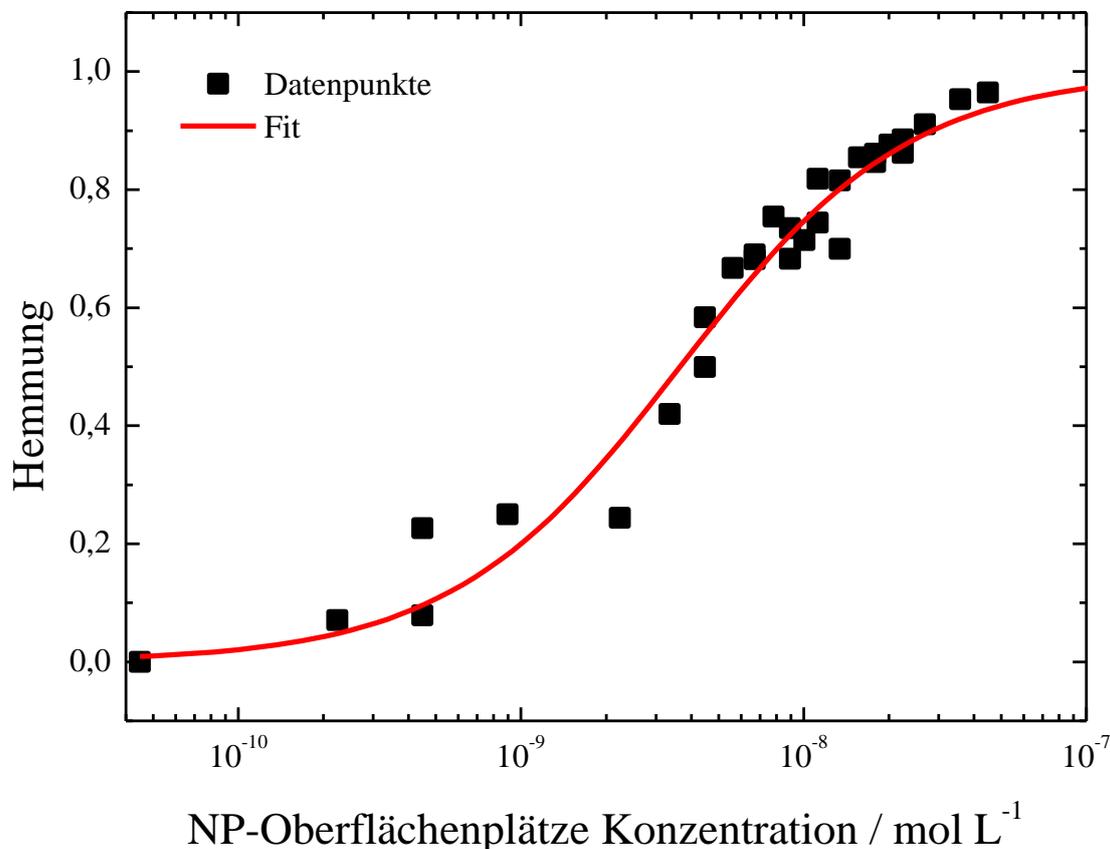
**Abbildung 77:** Bestimmung der Enzymaktivität der desorbierten Trypsin-Moleküle von den PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln mit einem von Zeta-Potential +30 mV (*rote Datenpunkte*), Kontroll-Messung einer Trypsin-Lösung ( $12.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ohne vorherigen Nanopartikel-Kontakt (*rote Datenpunkte*) und von den PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln mit einem Zeta-Potential -30 mV (*schwarze Datenpunkte*), Kontroll-Messung einer Trypsin-Lösung ( $6.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ohne vorherigen Nanopartikel-Kontakt (*schwarze Datenpunkte*)

Das Trypsin zeigte für beide Nanopartikel-Spezies nach der Desorption von der Oberfläche keine Aktivität mehr.

#### 4.4.4. Bovines Chymotrypsin

Es wurde ebenfalls die Enzymaktivität von Chymotrypsin in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln untersucht. Es wurde eine Enzymkonzentration von  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  gewählt. Die Konzentration der Nanopartikel wurde von  $4.5 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$  bis  $9.3 \cdot 10^6 \text{ NP mL}^{-1}$  variiert. Als Puffer diente ein Acetatpuffer, welcher frisch angesetzt und auf pH 7 eingestellt wurde. Die Messungen wurden nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden der

Enzym-Nanopartikel-Proben durchgeführt. Die Zugabe des Substrates erfolgte 2-3 Minuten vor der Messung. Folgende Auftragung zeigt die berechnete Hemmung aufgetragen gegen die Oberflächenplätze-Konzentration.



**Abbildung 78:** Bindungskurve aus der Hemmung der Enzymaktivität von Chymotrypsin in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (Goldkern 13 nm, Gesamtdurchmesser 50 nm), Hill-Fit mit  $n = 1$  und  $K_D = 4.3 \text{ nM}$  (rot)

Die Auftragung wurde mit einem Hill-Fit, welcher bei einer Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen verwendet wird, angepasst. Es wurde eine Gleichgewichtskonstante von 4.3 nM bestimmt, welcher für eine starke Affinität der Enzyme zur Nanopartikel-Oberfläche spricht. Die berechnete Gleichgewichtskonstante des Chymotrypsin lässt sich demnach mit der Gleichgewichtskonstante von Trypsin (7.5 nM) vergleichen. Dieses war auch zu erwarten, da sich die beiden Enzyme nicht wesentlich in ihrer räumlichen Struktur und Ladungsverteilung voneinander unterscheiden. Die Struktur und Enzymaktivität von Chymotrypsin in Gegenwart Nanopartikeln ist in der Literatur erwähnt. *You et al.* konnten ebenfalls eine Hemmung der Enzymaktivität von Chymotrypsin in Gegenwart von Gold-Nanopartikeln mit einer negativen Oberflächenladung bestimmen (You et al. 2006; You et al. 2005). Die Adsorption auf die

Nanopartikel-Oberfläche geht auch mit einer Denaturierung des Chymotrypsins einher (Wu et al. 2009; Hong et al. 2004; Bogan und Thorn 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hemmung der Enzymfunktion von drei relevanten Enzymen untersucht. Die Untersuchungen zeigen, dass PVP funktionalisierte Gold Nanopartikel die Aktivität der Enzyme Lysozym, Trypsin und Chymotrypsin hemmen. Die Hemmung ist abhängig von der Konzentration der Gold-Nanopartikel und korreliert mit einer Monolage von adsorbierten Enzymen auf die Nanopartikel-Oberfläche. Die Bildung der Protein-Corona führt zum Verlust der Enzymaktivität.

Dabei konnte gezeigt werden, dass in Bezug auf die Enzymaktivität die Oberflächenladung eine erhebliche Rolle spielt. Das überwiegend positiv geladene Trypsin adsorbiert bei den PVP-funktionalisierten Nanopartikeln vermehrt auf die Oberfläche. Bei den positiv geladenen Nanopartikeln sind erheblich größere Konzentrationen nötig, um die Aktivität des Enzyms herabzusetzen. Des Weiteren zeigen CD-Messungen, dass die Enzyme in Gegenwart von Gold-Nanopartikeln denaturieren. Die Hemmung der Enzymfunktion ist deshalb auf Strukturänderungen zurückzuführen, in dessen Folge ein Funktionsverlust auftritt. So könnte durch die Strukturänderungen das aktive Zentrum nicht mehr intakt sein. Des Weiteren wurde die Desorption von Trypsin von funktionalisierten Gold-Nanopartikeln untersucht. Hier zeigte sich, dass von der Nanopartikel-Oberfläche desorbierte Trypsin-Moleküle keine Enzymaktivität mehr besitzen. Diese Ergebnisse geben Hinweise auf eine schädigende Wirkung von Nanopartikeln in Bezug auf Enzyme. Aufgrund der Desorptionsexperimente kann man sagen, dass die Enzyme beim Eintritt in ein anderes biologisches Medium wieder von der Gold-Nanopartikel Oberfläche desorbieren. Trotzdem verlieren sie irreversibel ihre Funktion.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abbas, K., I. Cydzik, R. Del Torchio, M. Farina, E. Forti, N. Gibson, U. Holzwarth, F. Simonelli und W.G. Kreyling (2010). "Radiolabelling of  $TiO_2$  nanoparticles for radiotracer studies." *J. Nanopart. Res.* **12**(7): 2435-2443.
- Adam, G., P. Lauger und G. Stark (2009). *Physikalische Chemie und Biophysik*, Springer.
- Ahmad, F. und C.C. Bigelow (1982). "Estimation of the free energy of stabilization of ribonuclease A, lysozyme, alpha-lactalbumin, and myoglobin." *J. Biol. Chem.* **257**(21): 12935-12938.
- Aitken, R.J., M.Q. Chaudhry, A.B.A. Boxall und M. Hull (2006). "Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends." *Occup. Med.* **56**(5): 300-306.
- Alberts, B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberst und P. Walter (2001). *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag.
- Amzel, L.M. und R.J. Poljak (1979). "Three-dimensional structure of immunoglobulins." *Ann. Re. Biochem.* **48**: 961-997.
- Andersen, J.M., J. Hedstrom, E. Kemppainen, P. Finne, P. Puolakkainen und U.-H. Stenman (2001). "The ratio of trypsin-2-alpha(1)-antitrypsin to trypsinogen-1 discriminates biliary and alcoholinduced acute pancreatitis." *Clin. Chem.* **47**(2): 231–236.
- Anker, J.N., W.P. Hall, O. Lyandres, N.C. Shah, J. Zhao und R.P. Van Duyne (2008). "Biosensing with plasmonic nanosensors." *Nat. Mater.* **7**: 442-453.
- Anselmann, R. (2001). "Nanoparticles and monolayers in commercial applications." *J. Nanopart. Res.* **3**(4): 329-336.
- Arai, M. und K. Kuwajima (2000). "Role of the molten globule state in protein folding." *Adv Protein Chem.* **53**: 209-282.
- Ashwood, P., R.P.H. Thompson und J.J. Powell (2007). "Fine particles that adsorb lipopolysaccharide via bridging calcium cations may mimic bacterial pathogenicity towards cells." *Exp. Biol. Med.* **232**(1): 107-117.

- Aubin-Tam, M.-E. und K. Hamad-Schifferli (2005). "*Gold nanoparticle-cytochrome c complexes: The effect of nanoparticle ligand charge on protein structure.*" *Langmuir* **21**(26): 12080-12084.
- Aubin-Tam, M.-E. und K. Hamad-Schifferli (2008). "*Structure and function of nanoparticle-protein conjugates.*" *Biomed.Mater.* **3**: 1-17.
- Barnett Foster, D.E., K.J. Dorrington und R.H. Painter (1978). "*Structure and function of immunoglobulin domains: Studies on the structural requirements of human immunoglobulin G for granulocyte binding.*" *J. Immunol.* **20**(6): 1952-1956.
- Baron, M.H., M. Revault, S. Servagent-Noinville, J. Abadie und H. Quiquampoix (1999). "*Chymotrypsin adsorption on montmorillonite: Enzymatic activity and kinetic FTIR structural analysis.*" *J. Colloid Interface Sci.* **214**(2): 319–332.
- Bartlett, G.J., C.T. Porter, N. Borkakoti und J.M. Thornton (2002). "*Analysis of catalytic residues in enzyme active sides.*" *J. Mol. Biol.* **324**: 105-121.
- Bayraktar, H., S. Srivastava, C.-C. You, V.M. Rotello und M.J. Knapp (2008). "*Controlled nanoparticle assembly through protein conformational changes.*" *Soft Matter* **4**: 751-756.
- Beck-Broichsitter, M., T. Schmehl, W. Seeger und T. Gessler (2011). "*Evaluating the controlled release properties of inhaled nanoparticles using isolated, perfused, and ventilated lung models.*" *J. Nanomater.* **2011**(3): 1-16.
- Benachour, A., R. Ladjouzi, A. Le Jeune, L. Hébert, S. Thorpe, P. Courtin, M.-P. Chapot-Chartier, T.K. Prajsnar, S.J. Foster und S. Mesnage (2012). "*The lysozyme-induced peptidoglycan N-Acetylglucosamine deacetylase PgdA (EF1843) is required for enterococcus faecalis virulence.*" *J. Bacteriol.* **194**(22): 6066-6073.
- Bikle, D.D., P.K. Siiteri, E. Ryzen und J.G. Haddad (1985). "*Serum protein binding of 1,25-Dihydroxyvitamin D: A reevaluation by direct measurement of free metabolite levels.*" *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **61**(5): 969-975.
- Bisswanger, H. (2000). *Enzymkinetik - Theorie und Methoden.* Weinheim, Wiley.
- Biswas, R. und S.K. Pal (2004). "*Caging enzyme function:  $\alpha$ -chymotrypsin in reverse micelle.*" *Chem. Phys. Lett.* **387**: 221-226.

- Blechinger, J., R. Herrmann, D. Kiener, F.J. García-García, C. Scheu, A. Reller und C. Bräuchle (2010). "*Perylene-labeled silica nanoparticles: synthesis and characterization of three novel silica nanoparticle species for live-cell imaging.*" *Small* **6**(21): 2427–2435.
- Bogan, A.A. und K.S. Thorn (1998). "*Anatomy of hot spots in protein interfaces.*" *J. Mol. Biol.* **280**(1): 1-9.
- Böhm, G. (1996). "*New approaches in molecular structure prediction.*" *Biophys. Chem.* **59**: 1-32.
- Böhm, G., R. Muhr und R. Jaenicke (1992). "*Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neuronal networks.*" *Protein Eng.* **5**(3): 191-195.
- Böhnlein-Mauß, J., W. Sigmund, G. Wegner, W.H. Meyer, F. Heßel, K. Seitz und A. Roosen (1992). "*The function of polymers in the tape casting of alumina.*" *Adv. Mater.* **4**(2): 73-81.
- Borm, P.J.A., D. David Robbins, S. Haubold, T. Kuhlbusch, H. Fissan, K. Donaldson, R. Schins, V. Stone, W. Kreyling, L. Lademann, J. Krutmann, D. Warheit und E. Oberdörster (2006). "*The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC.*" *Part Fibre Toxicol.* **3**(11): 1-35.
- Bos, O.J.M., J.F.A. Labro, M.J.E. Fischer, J. Wilting und L.H.M. Janssen (1989). "*The molecular mechanism of the neutral-to-base transition of human serum albumin.*" *J. Biol. Chem.* **264**(2): 953-959.
- Bradford, M.M. (1976). "*A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.*" *Anal. Chem.* **7**(72): 248-254.
- Brandes, N., P.B. Welzel, C. Werner und L.W. Kroh (2006). "*Adsorption-induced conformational changes of proteins onto ceramic particles: Differential scanning calorimetry and FTIR analysis.*" *J. Colloid Interface Sci.* **299**: 56–69.
- Brange, J., G.G. Dodson, D.J. Edwards, P.H. Holden und J.L. Whittingham (1997). "*A model of insulin fibrils derived from the x-ray crystal structure of a monomeric insulin (despentapeptide insulin).*" *Proteins* **27**(4): 507-516.
- Brange, J. und L. Langkjoer (1993). *Insulin structure and stability.*

- Brange, J., D.R. Owens, S. Kang und A. Vølund (1990). "*Monomeric insulins and their experimental and clinical implications.*" *Diabetes Care* **13**(9): 923-954.
- Brems, D.N., P.L. Brown, S.H. Nakagawa und H.S. Tager (1991). "*The conformational stability and flexibility of insulin with an additional intramolecular cross-link.*" *J. Biol. Chem.* **266**(3): 1611-1615.
- Brown, D.M., M.R. Wilson, W. MacNee, V. Stone und K. Donaldson (2001). "*Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: A role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines.*" *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **175**: 191-199.
- BUND (2008). *Aus dem Labor auf den Teller: Die Nutzung der Nanotechnologie im Lebensmittelsektor.* Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland.
- Buzea, C., I.I. Pacheo Blandino und K. Robbie (2007). "*Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicology.*" *Biointerphases* **2**(4): MR17 - MR172.
- Callewaert, L. und C.W. Michiels (2010). "*Lysozymes in the animal kingdom.*" *J. Biosci.* **35**(1): 127-160.
- Campbell, C.T., S.C. Parker und D.E. Starr (2002). "*The effect of size-dependent nanoparticle energetics on catalyst sintering.*" *Science* **298**(5594): 811-814.
- Casals, E., T. Pfaller, A. Duschl, G.J. Oostingh und V. Puntès (2010). "*Time evolution of the nanoparticle protein corona.*" *ACS Nano* **4**(7): 3623–3632.
- Cedervall, T., I. Lynch, M. Foy, T. Berggård, S.C. Donnelly, G. Cagney, S. Linse und K.A. Dawson (2007). "*Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles.*" *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**: 5754-5756.
- Cedervall, T., I. Lynch, S. Lindman, T. Berggård, E. Thulin, H. Nilsson, K.A. Dawson und S. Linse (2007). "*Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles.*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(7): 2050-2055.
- Chithrani, D.B., M. Dunne, J. Stewart, C. Allen und D.A. Jaffray (2010). "*Cellular uptake and transport of gold nanoparticles incorporated in a liposomal carrier.*" *Nanomedicine* **6**(1): 161-169.

- Compton, S.J. und C.G. Jones (1985). "*Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay.*" *Anal. Biochem.* **151**(2): 369-374.
- Cramer, P., D.A. Bushnell, J. Fu, A.L. Gnatt, B. Maier-Davis, N.E. Thompson, R.R. Burgess, A.M. Edwards, P.R. David und R.D. Kornberg (2000). "*Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism.*" *Science* **288**: 640-649.
- Creighton, T.E. (1992). *Proteins: Structures and molecular properties*, Freeman and Company W. H.
- Dastjerdi, R. und M. Montazer (2010). "*A review on the application of inorganic-nanostrucutred materials in the modification on textiles: focus on anti-microbial properties.*" *Colloids Surf., B* **79**: 5-18.
- David, C., S. Foley, C. Mavon und M. Enescu (2008). "*Reductive unfolding of serum albumins uncovered by raman spectroscopy.*" *Biopolymers* **89**(7): 623-634.
- De Paoli Lacerda, S.H., J.J. Park, C. Meuse, D. Pristinski, M.L. Becker, A. Karim und J.F.D. Douglas (2010). "*Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins.*" *ACS Nano* **4**(1): 365-379.
- Des Rieux, A., V. Fievez, M. Garinot, Y.-J. Schneider und V. Pr at (2006). "*Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach.*" *J. Control. Release* **116**(1): 1-27.
- Dill, K.A. (1990). "*Dominant forces in protein folding.*" *Biochemistry* **29**(31): 7133-7155.
- Dockal, M., D.C. Carter und F. R ker (2000). "*Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH.*" *J. Biol. Chem.* **275**(5): 3042-3050.
- Dockal, M., D.C. Carters und F. R ker (1999). "*The three recombinant domains of human serum albumin.*" *J. Biol. Chem.* **274**(41): 29303-29310.
- Doig, A.J. und M.J.E. Sternberg (1995). "*Side-chain conformational entropy in protein folding.*" *Protein Science* **4**(11): 2247-2251.
- Dolinsky, T.J., J.E. Nielsen, J.A. McCammon und N.A. Baker (2004). "*PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations.*" *Nucleic Acids Research* **32**: W665-W667.

- Dugaiczky, A., S.W. Law und O.E. Dennison (1982). "Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human serum albumin mRNA." Proc. Natl Acad. Sci. USA **79**(1): 71-75.
- Eckert, W.A. und J. Kartenbeck (1997). *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie*. Heidelberg.
- El Kadi, N., N. Taulier, J.Y. Le Hu rou, M. Gindre, W. Urbach, I. Nwigwe, P.C. Kahn und M. Waks (2006). "Unfolding and refolding of bovine serum albumin at acid pH: ultasound and structural studies." Biophys J. **91**(9): 3397-3404.
- Fahlman, B.D. (2007). *Materials Chemistry*, Springer.
- Fasman, G.D. (1996). *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. New York.
- Fass, D. (2012). "Disulfide bonding in protein biophysics." Annu. Rev. Biophysics **41**: 63-79.
- Ferrer, M.L., R. Duchowicz, B. Carrasco, J. Garc a de la Torre und A.U. Acuna (2001). "The conformation of serum albumin in solution: A combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study." Biophysical Journal **80**: 2422–2430.
- Filipe, V., A. Hawe und W. Jiskoot (2010). "Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates." Pharm. Res. **27**(5): 796-810.
- Fillafer, C., D.S. Friedl, A.K. Ilyes, M. Wirth und F. Gabor (2009). "Bionanoprobes to study particle-cell interactions." J. Nanosci. Nanotechnol. **9**: 3239-3245.
- Francis, G.L. (2010). "Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications." Cytotechnology **62**(1): 1–16.
- Frauenfelder, H., F. Parak und R.D. Young (1988). "Conformational substates in proteins." Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. **17**: 451-479.
- Galindo-Rodr guez, S.A., E. Allemann, H. Fessi und E. Doelker (2005). "Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: A critical evaluation of in vivo studies." Crit. Rev. Ther. Drug. Carr. Syst. **22**(5): 419-464.
- Garrett, R.H. und C.M. Grisham (2013). *Biochemistry*. USA.

- Garrido, C., A.E. Aliaga, J.S. Gomez-Jeria, R.E. Clavijo, M.M. Campos-Vallette und S. Sanchez-Cortes (2010). "*Adsorption of oligopeptides on silver nanoparticles: surface-enhanced Raman scattering and theoretical studies.*" *J. Raman Spectrosc.* **41**(10): 1149-1155.
- Gatti, A.M. (2004). "*Biocompatibility of micro- and nano-particles in the colon. Part II.*" *Biomaterials* **25**: 385-392.
- Gebauer, J.S., M. Malissek, S. Simon, S.K. Knauer, M. Maskos, R.H. Stauber, W. Peukert und L. Treuel (2012). "*Impact of the nanoparticle-protein corona on colloidal stability and protein structure.*" *Langmuir* **28**(25): 9181-9906.
- Ghosh, P., G. Han, M. De, C.K. Kim und V.M. Rotello (2008). "*Gold nanoparticles in delivery applications.*" *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**(11): 1307-1315.
- Gill, R., M. Zayats und I. Willner (2008). "*Semiconductor quantum dots for bioanalysis.*" *Ang. Chem. Int. Ed.* **47**(40): 7602-7625.
- Goesmann, H. und C. Feldmann (2010). "*Nanopartikeläre Funktionsmaterialien.*" *Angew. Chem.* **122**: 2-38.
- González-Jiménez, J. und M. Cortijo (2002). "*Urea-induced denaturation of human serum albumin labeled with acrylodan.*" *J. Protein Chem.* **21**(2): 75-79.
- Goutelle, S., M. Maurin, F. Rougier, X. Barbaut, L. Bourguignon, M. Ducher und P. Maire (2008). "*The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling.*" *Fundam. Clin. Pharmacol.* **22**: 633–648.
- Goy-López, S., J. Juárez, M. Alatorre-Meda, E. Casals, V.F. Puentes, P. Taboada und V. Mosquera (2012). "*Physicochemical characteristics of protein-NP bioconjugates: the role of particle curvature and solution conditions on human serum albumin conformation and fibrillogenesis inhibition.*" *Langmuir* **28**(24): 9113-9126.
- Grabolle, M., M. Spieles, V. Lesnyak, N. Gaponik, A. Eychmüller und U. Resch-Genger (2009). "*Determination of the fluorescence quantum yield of quantum dots: suitable procedures and achievable uncertainties.*" *Anal. Chem.* **81**(15): 6285–6294.
- Graeser, M., E. Pippel, A. Greiner und J.H. Wendorff (2007). "*Polymer core-shell fibers with metal nanoparticles as nanoreactor for catalysis.*" *Macromolecules* **40**: 6032-6039.

- Greulich, C., S. Kittler, M. Epple, G. Muhr und M. Köller (2009). "*Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs)*." Langenbecks Arch. Surg. **394**(3): 495-502.
- Haiss, W., N.T.K. Thanh, J. Aveyard und D.G. Fernig (2007). "*Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra*." Anal. Chem. **79**: 4215-4221.
- Handy, R.D., R. Owen und E. Valsami-Jones (2008). "*The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledges gaps, challenges, and future needs*." Ecotoxicology **17**: 315-325.
- Hao, R., R. Xing, Z. Xu, Y. Hou, S. Gao und S. Sun (2010). "*Synthesis, Functionalization, and biomedical applications of multifunctional nanoparticles*." Adv. Mater. **22**: 2729-2742.
- Harata, K., M. Muraki, Y. Hayashi und Y. Jigami (1992). "*X-ray structure of Glu 53 human lysozyme*." Protein Sci. **1**(11): 1447-1453.
- Harris, J.M. und R.B. Chess (2003). "*Effect of pegylation on pharmaceuticals*." Nature Reviews **2**: 214-221.
- Harris, J.M., N.E. Martin und M. Modi (2001). "*Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics*." Clin. Pharmacokinet. **40**(7): 539-551.
- Harrison, P.M. und P. Arosio (1996). "*The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation*." Biochim. Biophys. Acta **1275**(3): 161-203.
- Hartmann, M. (2005). "*Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis*." Chem. Mater. **17**(18): 4577-4593.
- He, X.M. und D.C. Carter (1992). "*Atomic structure and chemistry of human serum albumin*." Nature **358**(6383): 209-214.
- Hesse, M., H. Meier und B. Zeeh (2005). *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Stuttgart, Thieme.
- Hildebrandt, A., R. Blossey, S. Rjasanow, O. Kohlbacher und H.-P. Lenhof (2006). "*Electrostatic potentials of proteins in water: a structured continuum approach*." Bioinformatics **23**(2): e99–e103.

- Hill, A.V. (1910). "*The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves.*" J. Phys. Chem. **40**: 4-7.
- Holtzhauer, M. (1996). *Methoden in der Proteinanalytik*, Springer.
- Holtzhauer, M. (1997). *Biochemische Labormethoden*, Springer.
- Hong, R., N.O. Fischer, A. Verma, C.M. Goodman, T. Emrick und V.M. Rotello (2004). "*Control of protein structure and function through surface recognition by tailored nanoparticle scaffolds.*" J. Am. Chem. Soc. **126**(3): 739-743.
- Horton, H.R., L.A. Moran, K.G. Scrimgeour, J.D. Rawn und M.D. Perry (2008). *Biochemie*.
- Houde, D., J. Arndt, W. Domeier, S. Berkowitz und J.R. Engen (2009). "*Characterization of IgG1 conformation and conformational dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry.*" Anal. Chem. **81**(7): 2644-2651.
- Huebers, H.A., B. Josephson, E. Huebers, E. Csiba und C.A. Finch (1984). "*Occupancy of the iron binding sites of human transferrin.*" Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 4326-4330.
- Israelachvili, J.N. (1991). *Intermolecular & Surface Forces* Academic press.
- Jackson, M.B. (2006). *Molecular and Cellular Biophysics*. Cambridge, University Press.
- Jana, N.R., L. Gearheart und C.J. Murphy (2001). "*Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio.*" Chem. Commun.(7): 617-618.
- Jiang, W., B.Y.S. Kim, J.T. Rutka und W.C.W. Chan (2008). "*Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent.*" Nat. Nanotechnol. **3**: 145-150.
- Jiang, X., J. Jiang, Y. Jin, E. Wang und S. Dong (2005). "*Effect of colloidal gold size on the conformational changes of adsorbed cytochrome c: Probing by circular dichroism, UV-visible, and infrared spectroscopy.*" Biomacromolecules **6**(1): 46-53.
- Jiang, X., S. Weise, M. Hafner, C. Röcker, F. Zhang, W.J. Parak und G.U. Nienhaus (2010). "*Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding*" J. R. Soc. Interface **7**(Suppl 1): S5-S13.
- Johnson, W.C. (1999). "*Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures.*" Proteins **35**(3): 307-312.
- Johnson, W.C.J. (1988). "*Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy.*" Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. **17**: 145-166.

- Jollès, P. (1969). "*Lysozym: Ein Kapitel Molekularbiologie.*" *Angew. Chem.* **81**(7): 244-256.
- Jung, S.-Y., S.-M. Lim, F. Albertorio, G. Kim, M.C. Gurau, R.D. Yang, M.A. Holden und P.S. Cremer (2003). "*The vroman-effect: a molecular level description of fibrinogen displacement.*" *J. Am. Chem. Soc.* **125**(42): 12782-12786.
- Kelly, K.L., E. Coronado, L.L. Zhao und G.C. Schatz (2003). "*The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment.*" *J. Phys. Chem. B.* **107**(3): 668-677.
- Kittler, S., C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller und M. Epple (2010). "*Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions.*" *Chem. Mater.* **22**(16): 4548-4554.
- Kittler, S., C. Greulich, J.S. Gebauer, J. Diendorf, L. Treuel, L. Ruiz, J.M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Zellner, M. Köller und M. Epple (2010). "*The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles.*" *J. Mater. Chem.* **20**(3): 512-518.
- Klare, J.P., I. Chizhov und M. Engelhard (2008). "*Microbial rhodopsins: scaffolds for ion pumps, channels, and sensors.*" *Results Probl. Cell. Differ. G. Schäfer und H.S. Penefsky.* **45**: 73-122.
- Klein, J. (2007). "*Probing the interactions of proteins and nanoparticles.*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(7): 2029-2030.
- Kondo, A., F. Murakami, M. Kawagoe und K. Higashitani (1993). "*Kinetic and circular dichroism studies of enzymes adsorbed on ultrafine silica particles.*" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**(6): 726-731.
- Kostarelos, K., A. Bianco und M. Prato (2009). "*Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics*" *Nat. Nanotechnol.* **4**(10): 627-633.
- Kreyling, W.G., M. Semmler und W. Moller (2004). "*Dosimetry and toxicology of ultrafine particles.*" *J. Aerosol Med.* **17**(2): 140-152.
- Krishnakumar, S.S. und D. Panda (2002). "*Spatial relationship between the prodan site, Trp-214, and Cys-34 residues in human serum albumin and loss of structure through incremental unfolding.*" *Biochemistry* **41**(23): 7443-7452.

- Kruger, N.J. (1994). *The Bradford method for protein quantitation*. Basic Protein and Peptide Protocols J.M. Walker, Springer. **32**: 9-15.
- Kühn, K. (1974). "Struktur und Biochemie des Kollagens." *Chemie in unserer Zeit* **8**(4): 97–103.
- Kuwajima, K. (1996). "The molten globule state of alpha-lactalbumin." *FASEB J.* **10**: 102-109.
- LaMer, V.K. und R.H. Dinegar (1950). "Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols." *J. Am. Chem. Soc.* **72**(11): 4847-4854.
- Lee, P.C. und D. Meisel (1982). "Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols." *J. Phys. Chem.* **86**(17): 3391-3395.
- Leroueil-Le Verger, M., L. Fluckiger, Y.I. Kim, M. Hoffman und P. Maincent (1998). "Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent." *Eur. J. Pharm. Biopharm* **46**(2): 137-143.
- Leszczynski, J. (2010). "Bionanoscience: Nano meets bio at the interface." *Nat. Nanotechnol.* **5**(9): 633-634.
- Levinthal, C. (1968). "Are there pathways for protein folding?" *Extrait du Journal de Chimie Physique* **65**(1): 44-45.
- Lewinski, N., V. Colvin und R. Drezek (2008). "Cytotoxicity of nanoparticles." *small* **4**(1): 26-29.
- Li, D., W.Y. Teoh, C. Selomulya, R.C. Woodward, R. Amal und B. Rosche (2006). "Flame-sprayed superparamagnetic bare and silica-coated maghemite nanoparticles: Synthesis, characterization, and protein adsorption-desorption." *Chem. Mat.* **18**(26): 6403-6413.
- Li, L., Q. Mu, B. Zhang und B. Yan (2010). "Analytical strategies for detecting nanoparticle-protein interactions." *Analyst* **135**(7): 1519-1530.
- Lu, Z.X., T. Cui und Q.L. Shi (1987). *Application of circular dichroism and optical rotatory dispersion in molecular biology*. Beijing, science press.
- Lundqvist, M., I. Sethson und B.-H. Jonsson (2004). "Protein adsorption onto silica nanoparticles: Conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability." *Langmuir* **20**(24): 10639-10647.

- Lundqvist, M., J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall und K.A. Dawson (2008). "*Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts.*" Proc. Natl. Acad. Sci. USA **105**(38): 14265-14270.
- Lunov, O., T. Syrovets, C. Loos, J. Beil, M. Delacher, K. Tron, G.U. Nienhaus, A. Musyanovych, V. Mailänder, K. Landfester und T. Simmet (2011). "*Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line.*" ACS Nano **5**(3): 1657-1669.
- Lynch, I. (2006). "*Are there generic mechanisms governing interactions between nanoparticles and cells? Epitope mapping the outer layer of the protein-material interface.*" Physica A **373**(1): 511-520.
- Lynch, I., K.A. Dawson und S. Linse (2006). "*Detecting cryptic epitopes created by nanoparticles.*" Sci. STKE **2006**(327): 14.
- Maeda, H. (1980). "*New lysozyme assay based on fluorescence polarization or fluorescence intensity utilizing a fluorescent peptidoglycan substrate.*" J. Biochem. **88**(4): 1185-1191.
- Maffre, P., K. Nienhaus, F. Amin, W.J. Parak und G.U. Nienhaus (2011). "*Characterization of protein adsorption onto FePt nanoparticles using dual-focus fluorescence correlation spectroscopy.*" Beilstein J. Nanotechnol. **2**: 374-383374.
- Mahl, D., J. Diendorf, W. Meyer-Zaika und M. Epple (2011). "*Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles.*" Colloid. Surface. A. **377**(1): 386-392.
- Malcolm, B.A., S. Rosenberg, M.J. Corey, J.S. Allen, A. De Baetselier und J.F. Kirsch (1989). "*Site-directed mutagenesis of the catalytic residues Asp-52 and Glu-35 of chicken egg white lysozyme.*" Proc. Natl. Acad. Sci. **86**: 133-137.
- Malissek, M., S. Wolfrum, C. Damm, W. Peukert und L. Treuel (2013). "*Size dependence of the protein corona formation around silver nanoparticles.*" to be submitted.
- Matsuura, K., T. Saito, T. Okazaki, S. Ohshima, M. Yumura und S. Iijima (2006). "*Selectivity of water-soluble proteins in single-walled carbon nanotube dispersions.*" Chem. Phys. Lett. **429**(4-6): 497-502.

- Maynard, A.D., R.J. Aitken, T. Butz, V. Colvin, K. Donaldson, G. Oberdörster, M.A. Philbert, J. Ryan, A. Seaton, V. Stone, S.S. Tinkle, L. Tran, N.J. Walker und D.B. Warheit (2006). "*Safe handling of nanotechnology.*" *Nature* **444**(7117): 267-269.
- Medintz, I.L., A.R. Clapp, H. Mattoussi, E.R. Goldman, B. Fisher und J.M. Mauro (2003). "*Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors.*" *Nat. Mater.* **2**: 630-638.
- Medintz, I.L., J.H. Konnert, A.R. Clapp, I. Stanish, M.E. Twigg, H. Mattoussi, J.M. Mauro und J.R. Deschamps (2004). "*A fluorescence resonance energy transfer-derived structure of a quantum dot-protein bioconjugate nanoassembly.*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**(26): 9612-9617.
- Min, Q., R. Wu, L. Zhao, H. Qin, M. Ye, J.-J. Zhu und H. Zou (2010). "*Size-selective proteolysis on mesoporous silica-based trypsin nanoreactor for low-MW proteome analysis.*" *Chem. Commun.* **46**(33): 6144-6146.
- Moffitt, W. (1956). "*Optical rotatory dispersion of helical polymers.*" *J. Phys. Chem.* **25**: 467-478.
- Monopoli, M.P., F.B. Bombelli und K.A. Dawson (2011). "*Nanobiotechnology: Nanoparticle coronas take shape.*" *Nat. Nanotechnol.* **6**(1): 11-12.
- Monopoli, M.P., D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F.B. Bombelli und K.A. Dawson (2011). "*Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles.*" *J. Am. Chem. Soc.* **133**(8): 2525-2534.
- Moore, W.J. (1990). *Grundlagen der Physikalischen Chemie*, de Gruyter.
- Mu, Q.X., W. Liu, Y.H. Xing, H.Y. Zhou, Z.W. Li, Y. Zhang, L.H. Ji, F. Wang, Z.K. Si, B. Zhang und B. Yan (2008). "*Protein binding by functionalized multiwalled carbon nanotubes is governed by the surface chemistry of both parties and the nanotube diameter.*" *J. Phys. Chem. C.* **112**(9): 3300-3307.
- Mullin, J.W. (2001). *Crystallization*, Butterworth-Heinemann.
- Murray, C.B., S. Sun, H. Doyle und T. Betley (2001). "*Monodisperse 3d transition-metal (Co,Ni,Fe) nanoparticles and their assembly into nanoparticle superlattices.*" *MRS Bulletin* **26**(12): 985-991.

- Nel, A., T. Xia, L. Mädler und N. Li (2006). "*Toxic potential of materials at the nanolevel*" Science **311**(5761): 622-627.
- Nel, A.E., L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E.M.V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova und M. Thompson (2009). "*Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface.*" Nat. Mater. **8**(7): 543-557.
- Nemmar, A., P.H.M. Hoet, B. Vanquickenborne, D. Dinsdale, M. Thomeer, M.F. Hoylaerts, H. Vanbilloen, L. Mortelmans und B. Nemery (2002). "*Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans.*" Circulation **105**: 411-414.
- Oberdörster, G., A. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpatrick, K. Ausman, J. Carter, B. Karn, W.G. Kreyling, D. Lai, S. Olin, N. Monteiro-Riviere, D. Warheit und H. Yang (2007). "*Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy.*" Part. Fibre Toxicol. **2**(8): 1-35.
- Oberdörster, G., E. Oberdörster und J. Oberdörster (2005). "*Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.*" Environ. Health Perspect. **113**(7): 823-839.
- Oliva, F.Y., L.B. Avalle, O.R. Cámara und C.P. De Pauli (2003). "*Adsorption of human serum albumin (HSA) onto colloidal TiO<sub>2</sub> particles, Part I.*" J. Colloid Interface Sci. **261**(2): 299-311.
- Olivieri, J.R. und A.F. Craievich (1995). "*The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle X-ray scattering.*" Eur. Biophys. J. **24**: 77-84.
- Olson, M.S. und P.L. Gurian (2012). "*Risk assessment strategies as nanomaterials transition into commercial applications.*" J. Nanopart. Res. **14**(4).
- Pace, C.N., S. Treviño, E. Prabhakaran und J.M. Scholtz (2004). "*Protein structure, stability and solubility in water and other solvents.*" Phil. Trans. R. Soc. Lond. B **359**: 1225-1235.
- Pan, Y., S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau und W. Jahnen-Dechent (2007). "*Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles.*" Small **3**(11): 1941 – 1949.

- Panda, S.K., S.G. Hickey, C. Waurisch und A. Eychmüller (2011). "*Graded alloyed CdZnSe nanocrystals with high luminescence quantum yield and stability for optoelectronic and biological applications.*" J. Mat. Chem. **21**(31): 11550-11555.
- Paoli, M., R. Liddington, J. Tame, A. Wilkinson und G. Dodson (1996). "*Crystal structure of T state haemoglobin with oxygen bound at all four haems.*" J. Mol. Biol. **256**(4): 775-792.
- Pauling, L., R.B. Corey und H.R. Branson (1951). "*The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain.*" Proc. Nati. Acad. Sci. USA **37**(4): 205-211.
- Perczel, A. und G.D. Fasman (1992). "*Convex constraint analysis: A natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins.*" Protein Eng. **4**: 669-679.
- Pocker, Y. und S.B. Biswas (1980). "*Conformational dynamics of insulin in solution. Circular dichroic studies.*" Am. Chem. Soc. **19**(22): 5043-5049.
- Power, S., M.M. Slattery und M.J. Lee (2011). "*Nanotechnology and its relationship to interventional radiology. Part II: Drug delivery, thermotherapy, and vascular Intervention.*" Cardiovasc. Intervent. Radiol. **34**: 676–690.
- Prager, E.M. und A.C. Wilson (1988). "*Ancient origin of lactalbumin from lysozyme: analysis of DNA and amino acid sequences.*" J. Mol. Evol.(27): 326-335.
- Prasad, N.K. (2011). *Enzyme Technology : Pacemaker of Biotechnology*, Phi Learning Private Limited.
- Ptitsyn, O.B. (1995). "*Molten globule and protein folding.*" Adv. Protein Chem. **47**: 83-229.
- Purdie, N. und H.G. Brittain (1994). *Analytical applications of circular dichroism*, Elsevier.
- Quinlan, G.J., G.S. Martin und T.W. Evans (2005). "*Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential.*" Hepatology **41**(6): 1211-1219.
- Ramprakash, J., V. Doseeva, A. Galkin, W. Krajewski, L. Muthukumar, S. Pullalarevu, E. Demirkan, O. Herzberg, J. Moulton und F.P. Schwarz (2008). "*Comparison of the chemical and thermal denaturation of proteins by a two-state transition model.*" Anal. Biochem. **374**(1): 221–230.
- RCSB Protein Data Bank (2013). [www.pdb.org](http://www.pdb.org) .

- Reider, G.A. (2005). *Photonik - Eine Einführung in die Grundlagen*. Wien, Springer.
- Rejman, J., V. Oberle, I.S. Zuhorn und D. Hoekstra (2004). "Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis." *Biochem. J.* **377**(1): 159-169.
- Richter, V. und S. Bastian (2008). "Bewertung der Gesundheitsrisiken von Nanopartikeln - Ein Beitrag zur nachhaltigen Entwicklung der Nanotechnologie." *J. Verbr. Lebensm.* **3**: 332-338.
- Roach, P., D. Farrar und C.C. Perry (2006). "Surface tailoring for controlled protein adsorption: Effect of topography at the nanometer scale and chemistry." *J. Am. Chem. Soc.* **128**(12): 3939-3945.
- Robertson, A.D. und K.P. Murphy (1997). "Protein structure and the energetics of protein stability." *Chem. Rev.* **97**: 1251-1267.
- Röcker, C., M. Pötzl, F. Zhang, W.J. Parak und G.U. Nienhaus (2009). "A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles." *Nat. Nanotechnol.* **4**(9): 577-580.
- Rogach, A.L., N. Gaponik, J.M. Lupton, C. Bertoni, D.E. Gallardo, S. Dunn, N.L. Pira, M. Paderi, P. Repetto, S.G. Romanov, C. O'Dwyer, C.M. Sotomayor Torres und A. Eychmüller (2008). "Light-emitting diodes with semiconductor nanocrystals." *Ang. Chem. Int. Ed.* **47**(35): 6538-6549.
- Roosen, A.R. und W.C. Carter (1998). "Simulations of microstructural evolution: anisotropic growth and coarsening." *Physica A* **261**(1-2): 232-247.
- Salata, O.V. (2004). "Applications of nanoparticles in biology and medicine." *J. Nanobiotechnology* **2**(3).
- Schechter, A., N. (2008). "Hemoglobin research and the origins of molecular medicine." *Blood* **112**(10): 3927-3938.
- Schmid, G. (2005). *Nanoparticles: From theory to application*. Weinheim, Wiley-VCH.
- Schnittger, S. und M. Sinha (2007). "The materials science of cosmetics." *MRS Bull* **32**: 760-769.

- Semmler-Behnke, M., W.G. Kreyling, J. Lipka, S. Fertsch, A. Wenk, S. Takenaka, G. Schmid und W. Brandau (2008). "*Biodistribution of 1.4 and 18 nm gold particles in rats.*" *Small* **4**(12): 2108-2111.
- Shang, L., S. Brandholt, F. Stockmar, V. Trouillet, M. Bruns und G.U. Nienhaus (2012). "*Effect of protein adsorption on the fluorescence of ultrasmall gold nanoclusters.*" *Small* **8**(5): 661-665.
- Shang, L., Y. Wang, J. Jiang und S. Dong (2007). "*pH-dependent protein conformational changes in albumin: Gold nanoparticle bioconjugates - a spectroscopic study.*" *Langmuir* **23**(5): 2714-2721.
- Shang, W., J.H. Nuffer, J.S. Dordick und R.W. Siegel (2007). "*Unfolding of ribonuclease A on silica nanoparticle surfaces.*" *Nano. Lett.* **7**(7): 1991-1995.
- Shen, X.-C., X.-Y. Liou, L.-P. Ye, H. Liang und Z.-Y. Wang (2007). "*Spectroscopic studies on the interaction between human hemoglobin and CdS quantum dots.*" *J. Colloid Interface Sci.* **311**(2): 400-406.
- Simon, L.M., M. Kotormán, G. Garab und I. Laczkó (2001). "*Structure and activity of  $\alpha$ -chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media.*" *Bioch. Biophys. Res. Commun.* **280**(5): 1367-1371.
- Snatzke, G. (1994). *Circular dichroism: an introduction*. Circular dichroism: principles and applications. K. Nakanishi, N. Berova und R.W. Woody. New York, VCH Publishers: 59-84.
- Spudich, J.L., C.-S. Yang, K.-H. Jung und E.N. Spudich (2000). "*Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans.*" *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 365-392.
- Sreerama, N. und R.W. Woody (2000). "*Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set.*" *Anal. Biochem.* **287**(2): 252-260.
- Steward, M.W. (1984). *Antibodies: Their structure and function*. New York, Chapman and Hall.
- Stigter, D., D.O.V. Alonso und K.A. Dill (1991). "*Protein stability: Electrostatics and compact denatured states.*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**(10): 4176-4180.

- Stöber, W., A. Fink und E. Bohn (1968). "*Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*" J. Colloid Interface Sci. **26**(1): 62-69.
- Stroud, R.M. (1974). "*A family of protein-cutting proteins.*" Sci. Am. **231**(1): 74-88.
- Sugio, S., A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda und K. Kobayashi (1999). "*Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution.*" Protein Eng. **12**(6): 439-446.
- Sun, S., C.B. Murray, D. Weller, L. Folks und A. Moser (2000). "*Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices.*" Science **287**: 1989-1992.
- Sun, X., S. Dong und E. Wang (2005). "*One-step preparation of highly concentrated well-stable gold colloids by direct mix of polyelectrolyte and HAuCl<sub>4</sub> aqueous solutions at room temperature.*" J. Colloid Interface Sci. **288**(1): 301-303.
- Sun, Y. und Y. Xia (2002). "*Increased sensitivity of surface plasmon resonance of gold nanoshells compared to that of gold solid colloids in response to environmental changes.*" Anal. Chem. **74**(20): 5297-5305.
- Talapin, D.V., J.-S. Lee, M.V. Kovalenko und E.V. Shevchenko (2010). "*Prospects of colloidal nanocrystals for electronic and optoelectronic applications.*" Chem. Rev. **110**(1): 389-458.
- Tan, Y.H., M. Liu, B. Nolting, J.G. Go, J. Gervay-Hague und G.-Y. Liu (2008). "*A nanoengineering approach for investigation and regulation of protein immobilization.*" ACS Nano **2**(11): 2374-2384.
- Tanford, C. (1964). "*Isothermal unfolding of globular proteins in aqueous urea solutions.*" J. Am. Chem. Soc. **86**(10): 2050-2059.
- Tautzenberger, A., A. Kovtun und A. Ignatius (2012). "*Nanoparticles and their potential for application in bone.*" Int. J. Nanomedicine **7**: 4545-4557.
- Teichroeb, J.H., J.A. Forrest und L.W. Jones (2008). "*Size-dependent denaturing kinetics of bovine serum albumin adsorbed onto gold nanospheres.*" Eur. Phys. J. E **26**: 411-415.
- Tenzer, S., D. Docter, S. Rosfa, A. Wlodarski, J. Kuharev, A. Reikik, S.K. Knauer, C. Bantz, T. Nawroth, C. Bier, J. Sirirattanapan, W. Mann, L. Treuel, R. Zellner, M. Maskos, H. Schild und R.H. Stauber (2011). "*Nanoparticle size is a critical physicochemical*

- determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis.*" ACS Nano **5**(9): 7155-7167.
- Togashi, D.M., A.G. Ryder und D. O'Shaughnessy (2009). "*Monitoring local unfolding of bovine serum albumin during using steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy.*" J. Fluoresc. **20**(2): 441-452.
- Tomitaka, A., A. Hirukawa, T. Yamada, S. Morishita und Y. Takemura (2009). "*Biocompatibility of various ferrite nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using HeLa cells.*" J. Magn. Magn. Mater. **321**: 1482–1484.
- Treuel, L. und M. Malissek (2013). *Interaction of nanoparticles with proteins- determination of equilibrium constants.* Cellular and Subcellular Nanotechnology - Methods and Protocols. V. Weissig, T. Elbayoumi und M. Olsen. New York, Springer Verlag. **991**.
- Treuel, L., M. Malissek, J.S. Gebauer und R. Zellner (2010). "*The influence of surface composition of nanoparticles on their interactions with serum albumin.*" ChemPhysChem **11**(14): 3093-3099.
- Treuel, L., M. Malissek, S. Grass, J. Diendorf, D. Mahl, W. Meyer-Zaika und M. Epple (2012). "*Quantifying the influence of polymer coatings on the serum albumin corona formation around silver and gold nanoparticles.*" J. Nanopart. Res. **14**(9): 1102.
- Treuel, L. und G.U. Nienhaus (2012). "*Toward a molecular understanding of nanoparticle-protein interactions.*" Biophys. Rev. **4**(2): 137-147.
- Tsukada, H. und B.M. Blow (1985). "*Structure of  $\alpha$ -Chymotrypsin refined at 1.68 Å resolution.*" J. Mol. Biol. **184**(4): 703-711.
- Turkevich, J., P.C. Stevenson und J. Hillier (1951). "*A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold.*" Faraday Discuss. **11**(c): 55-75.
- Vertegel, A.A., R.W. Siegel und J.S. Dordick (2004). "*Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme.*" Langmuir **20**(16): 6800-6807.
- Vroman, L. und A.L. Adams (1969). "*Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces.*" Surf. Sci. **16**(438): 438–446.
- Wang, H., X. Qiao, J. Chen und S. Ding (2005). "*Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method.*" Colloid. Surface. A. **256**(2-3): 111-115.

- Wang, T., J. Bai, X. Jiang und G.U. Nienhaus (2012). "*Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: A study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry.*" ACS Nano **6**(2): 1251–1259.
- Wang, Y., H.F. Sun, H.F. Wang und Y.F. Liu (2001). "*In vitro interaction of nicotine and hemoglobin under liver cell metabolizing condition.*" Chinese Chem. Lett. **12**(5): 449-452.
- Wangoo, N., C.R. Siuri und G. Shekhawat (2008). "*Interaction of gold nanoparticles with protein: A spectroscopic study to monitor protein conformational changes.*" Appl. Phys. Lett. **92**(13): 133104-133107.
- Watari, F., N. Takashi, A. Yokoyama, M. Uo, T. Akasaka, Y. Sato, S. Abe, Y. Totsuka und K. Tohji (2009). "*Material nanosizing effect on living organism: non-specific, biointeractive, physical size effects.*" J. R. Soc. Interface **6**(Suppl 3): S371-S381.
- Whitford, D. (2005). *Proteins - structure and function*, Wiley.
- Wiesner, M.R., G.V. Lowry, P. Alvarez, D. Dionysiou und P. Biswas (2006). "*Assessing the risks of manufactured nanomaterials*" Environ. Sci. Technol. **40**(14): 4336-4345
- Woody, R.W. (1969). "*Optical properties of polypeptides in the  $\beta$ -conformation.*" Biopolymers **8**: 669-683.
- Woody, R.W. (1992). "*Circular dichroism and conformation of unordered peptides.*" Adv. Biophys. Chem. **2**: 37-79.
- Woody, R.W. und I.J. Tinoco (1967). "*Optical rotation of oriented helix helices. III. Calculation of the rotatory dispersion and circular dichroism of the alpha- and  $3_{10}$ -helix.*" J. Phys. Chem. **46**: 4927-4945.
- Worrall, J.W.E., A. Verma, H. Yan und V.M. Rotello (2006). "'Cleaning' of nanoparticle inhibitors via proteolysis of adsorbed proteins." Chem. Commun.(2): 2338-2340.
- Wu, X. und G. Narsimhan (2008). "*Characterization of secondary and tertiary conformational changes of  $\beta$ -lactoglobulin adsorbed on silica nanoparticle surfaces.*" Langmuir **24**(9): 4989-4998.
- Wu, Z., B. Zhang und B. Yan (2009). "*Regulation of enzyme activity through interactions with nanoparticles.*" Int. J. Mol. Sci. **10**(10): 4198-4209.

- Xia, Y., Y. Xiong, B. Lim und S.E. Skrabalak (2009). "*Formkontrolle bei der Synthese von Metallnanokristallen: einfache Chemie, komplexe Physik?*" *Angew. Chem.* **121**(1): 62-108.
- Xiao, Q., S. Huang, Y. Liu, F. Tian und J. Zhu (2009). "*Thermodynamics, conformation and active sites of the binding of Zn–Nd hetero-bimetallic schiff base to bovine serum albumin*" *J. Fluoresc.* **19**(2): 317-326.
- Yamane, J., M. Yao, Y. Zhou, Y. Hiramatsu, K. Fujiwara, T. Yamaguchi, H. Yamaguchi, H. Togame, H. Tsujishita, H. Takemoto und I. Tanaka (2011). "*In-crystal affinity ranking of fragment hit compounds reveals a relationship with their inhibitory activities.*" *J. Appl. Crystallogr.* **44**(4): 798-804.
- Yang, L. und P. Alexandridis (2000). "*Physicochemical aspects of drug delivery and release from polymer-based colloids.*" *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **5**(1-2): 132-143.
- Yang, S.-T., Y. Liu, Y.-W. Wang und A. Cao (2013). "*Biosafety and bioapplication of nanomaterials by designing protein-nanoparticle interactions.*" *Small*.
- Yia, M. und Q. Liu (2010). "*Michaelis-Menten mechanism for single-enzyme and multi-enzyme system under stochastic noise and spatial diffusion.*" *Physica A* **389**: 3791-3803.
- Yin, Z.F., L. Wu, H.G. Yang und Y.H. Su (2013). "*Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide.*" *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**: 4844-4858.
- Ying, L., H. WenYing, T. Jianniao, T. Jianghong, H. Zhide und C. Xingguo (2005). "*The effect of berberine on the secondary structure of human serum albumin.*" *J. Mol. Struct.* **743**(1-3): 79-84.
- Yoshida, J. und T. Kobayashi (1999). "*Intracellular hyperthermia for cancer using magnetic cationic liposomes.*" *J. Magn. Magn. Mater.* **194**: 176-184.
- You, C.-C., R.R. Arvizo und V.M. Rotello (2006). "*Regulation of  $\alpha$ -chymotrypsin activity on the surface of substrate-functionalized gold nanoparticles*" *Chem. Commun.*(27): 2905-2907.
- You, C.-C., A. Chompooser und V.M. Rotello (2007). "*The biomacromolecule-nanoparticle interface.*" *nanotoday* **2**(3): 34-43.

- You, C.-C., M. De, G. Han und V.M. Rotello (2005). "*Tunable inhibition and denaturation of  $\alpha$ -Chymotrypsin with amino acid-functionalized gold nanoparticles.*" J. Am. Chem. Soc. **127**(37): 12873-12881.
- Zhao, F., Y. Zhao, Y. Liu, X. Chang, C. Chen und Y. Zhao (2011). "*Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials.*" Small **7**(10): 1322-1337.
- Zhou, H.S., S. Aoki, I. Honma, M. Hirasawa, T. Nagamune und H. Komiyama (1997). "*Conformational change of protein cytochrome b-562 adsorbed on colloidal gold particles; absorption band shift.*" Chem. Commun.(6): 605-606.

**Publikationen**

1. Treuel L.; M. Malissek; J. S. Gebauer; R. Zellner, *The Influence of Surface Composition of Nanoparticles on their Interactions with Serum Albumin*, ChemPhysChem, **11** (14), 3093-3099, (2010).
2. Treuel L.; M. Malissek; R. Zellner, *The Influence of Polymer Coatings on the Interaction between Nanoparticles and Serum Albumin*, Modern Polym. Mater., Environ Appl., **4** (2), 233-240, (2010).
3. Gebauer, J. S.; M. Malissek; S. Simon; S. K. Knauer; M. Maskos; R. H. Stauber; W. Peukert; L. Treuel, *Impact of the nanoparticle-protein corona on colloidal stability and protein structure*, Langmuir, **28** (25), 9673-9679, (2012).
4. Treuel L.; M. Malissek; S. Grass; J. Diendorf; D. Mahl; W. Meyer-Zaika; M. Epple, *Quantifying the influence of polymer coatings on the protein corona around silver and gold nanoparticles*, J. Nanopart. Res. **14**, (9), 1102, (2012).
5. Treuel L.; M. Malissek; *Interaction of nanoparticles with proteins- determination of equilibrium constants*. In: Cellular and Sub-cellular Nanotechnology - Methods and Protocols, Weissig, V., Ed. Springer Verlag, Humana Press: New York, (2013).
6. Strobel C.; A. A. Torrano; R. Herrmann; M. Malissek; C. Bräuchle; A. Reller; L. Treuel; W. A. Kaiser; I. Hilger, *Effects of the physicochemical properties of titanium dioxide nanoparticles, commonly used as sun protection agents, on microvascular endothelial cells*, [submitted].

## Publikationen

---

7. Malissek M.; A. Rostek; S. Langolf; M. Maskos, R. H. Stauber, C. Schmuck; M. Epple; L. Treuel, *Characterization of altered enzyme function in the protein corona around gold nanoparticles*, [to be submitted].
8. Malissek M.; S. Wolfrum; C. Damm; W. Peukert; L. Treuel, *Dependence of protein corona formation on nanoparticle size: Adsorption of serum albumin onto silver nanoparticles*, [to be submitted].

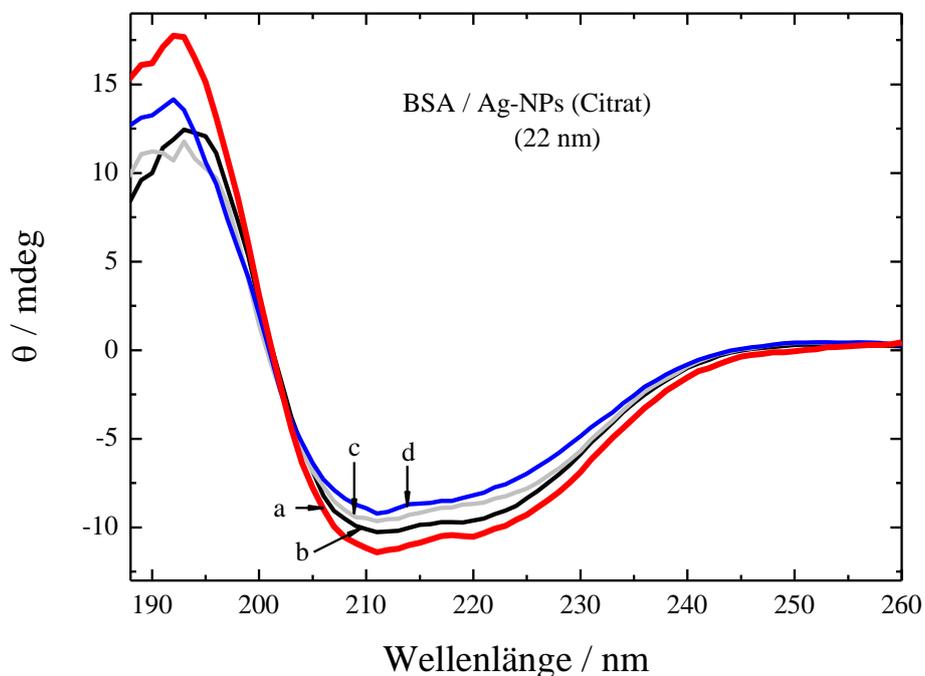
## Poster (P) und Vorträge (V)

1. Treuel L.; M. Malissek; R. Zellner, *Interactions of nanoparticles with polypeptides and proteins*, Bunsentagung 2009, Köln, 23.05.2009, (P).
2. Treuel L.; M. Malissek; J. S. Gebauer; R. Zellner, *The influence of surface composition on the interactions of selected nanoparticles with serum albumin*, Biomaterials 2010, Essen, 17.03.2010, (P).
3. Treuel L.; M. Malissek; J. S. Gebauer; R. Zellner, *Interactions of nanoparticles with serum albumin*, Bunsentagung 2010, Bielefeld, 13.-15.05.2010, (P).
4. Treuel L.; M. Malissek; J. S. Gebauer; R. Zellner, *The influence of surface composition of nanoparticles on their interactions with serum albumin*, Schwerpunktprogramm SPP1313, DFG, Thematischer Workshop: Zell-Internalisierung, Nanopartikeldesign und Oberflächenfunktionalisierung, Jena, 19.-21.05.2010, (P).
5. Malissek, M.; S. Simon; C. Damm; J. Diendorf; D. Mahl; W. Meyer-Zaika; M. Epple; R. Zellner; W. Peukert; L. Treuel, *Interactions of Nanoparticles with Proteins- Adsorption Equilibria and Impact on the Structural Integrity of the Protein*, Schwerpunktprogramm

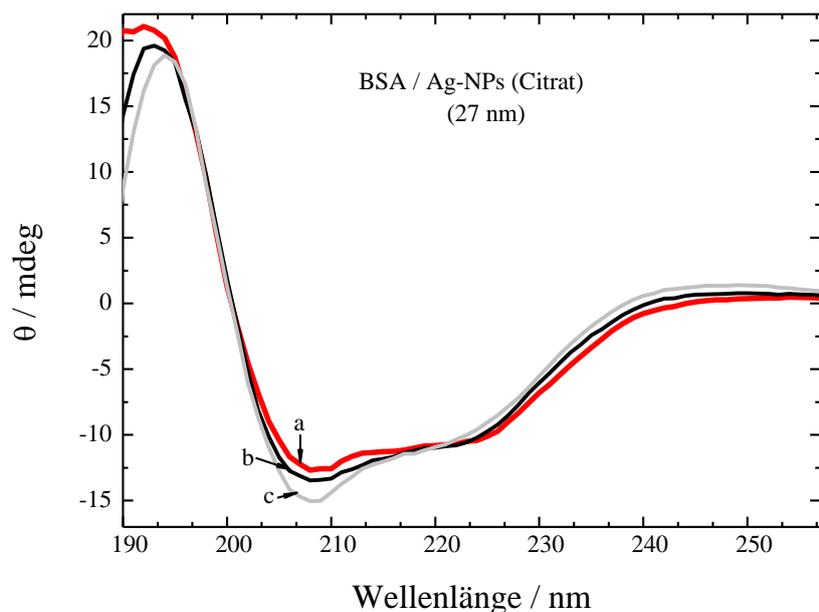
- DFG, SPP1313, Thematischer Workshop: The Nanoparticle-Protein Corona: Characterization, impact and biomedical relevance, Mainz, 8.12.2011, (P).
6. Gebauer, J. S.; M. Malissek; S. Simon; W. Peukert; L. Treuel, *The Impact of Proteins on the Agglomeration Behaviour of Colloids in Biological Media*, International Conference: Biological Responses to Nanoscale Particles, Essen, 11.-15.09.2011, (P).
7. Malissek M.; S. Simon; C. Damm; J. Diendorf; D. Mahl; W. Meyer-Zaika; M. Epple; R. Zellner; W. Peukert; L. Treuel, *Interactions of Nanoparticles with Proteins – Adsorption Equilibria and Impact on the Structural Integrity of the Protein*, International Conference: Biological Responses to Nanoscale Particles, Essen, 11.-15.09.2011, (P).
8. Malissek, M.; S. Simon; C. Damm; D. Mahl; A. Rostek; J. Diendorf; S. Langolf; C. Schmuck; M. Epple; W. Peukert; R. Zellner; L. Treuel, *Investigating the protein corona – Impact on structure & function*, DFG, Schwerpunktprogramm SPP1313, Fulda, 20.-22.02.2012, (V).
9. Rostek, A; M. Malissek; S. Langolf; C. Schmuck; L. Treuel, M. Epple; The influence of surface-functionalized gold nanoparticles on the enzymatic activity and structure of trypsin, European Society of Biomaterials, Madrid, 9.-12.09.2013, (P).

## Anhang

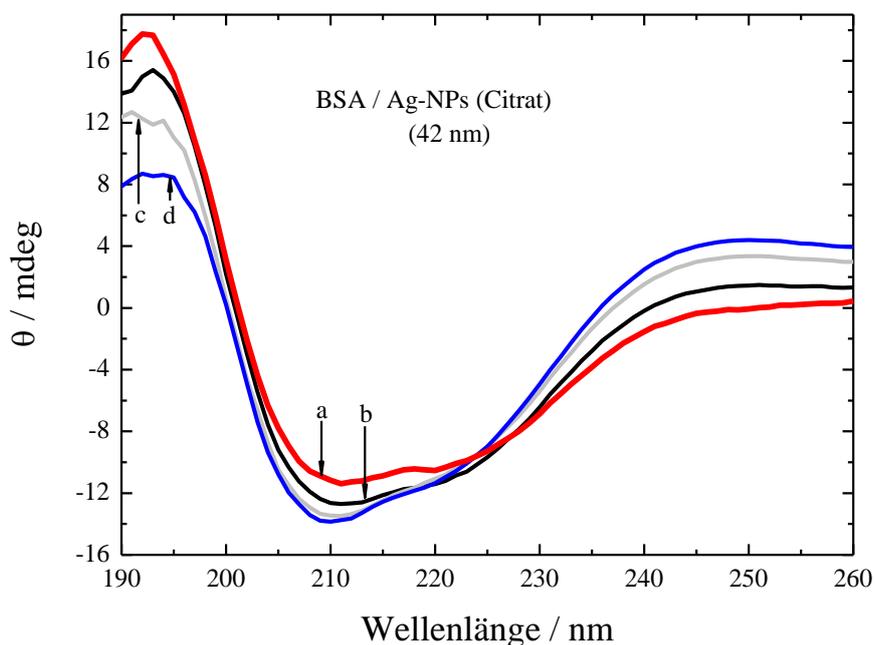
1. CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Silber-Nanopartikeln unterschiedlicher Durchmesser (Anhang zu Kapitel 4.3.)



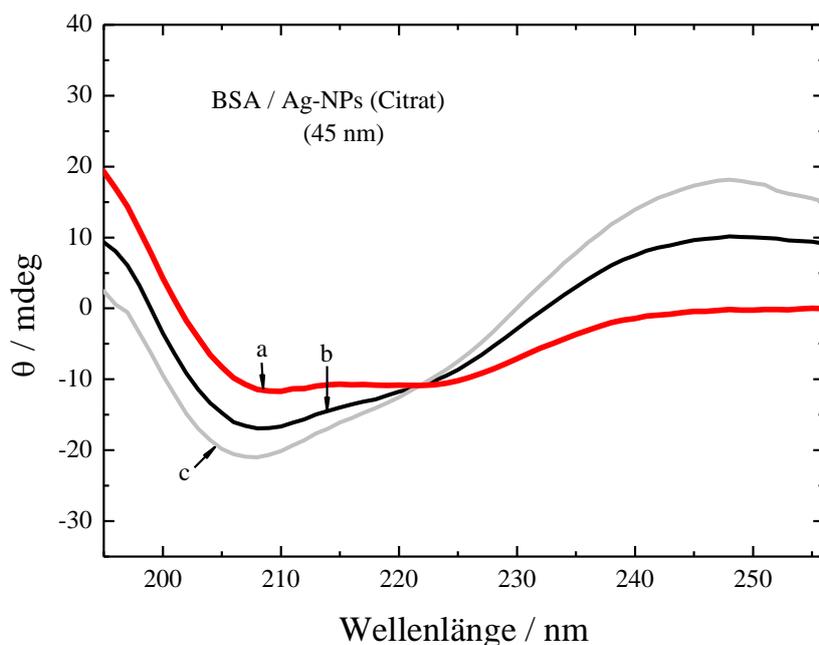
**Abbildung 79:** Auswahl von CD-Spektren von BSA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (22 nm), **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (22 nm) mit einer Konzentration von  $8.6 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (22 nm) mit einer Konzentration von  $1.2 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (22 nm) mit einer Konzentration von  $1.5 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$



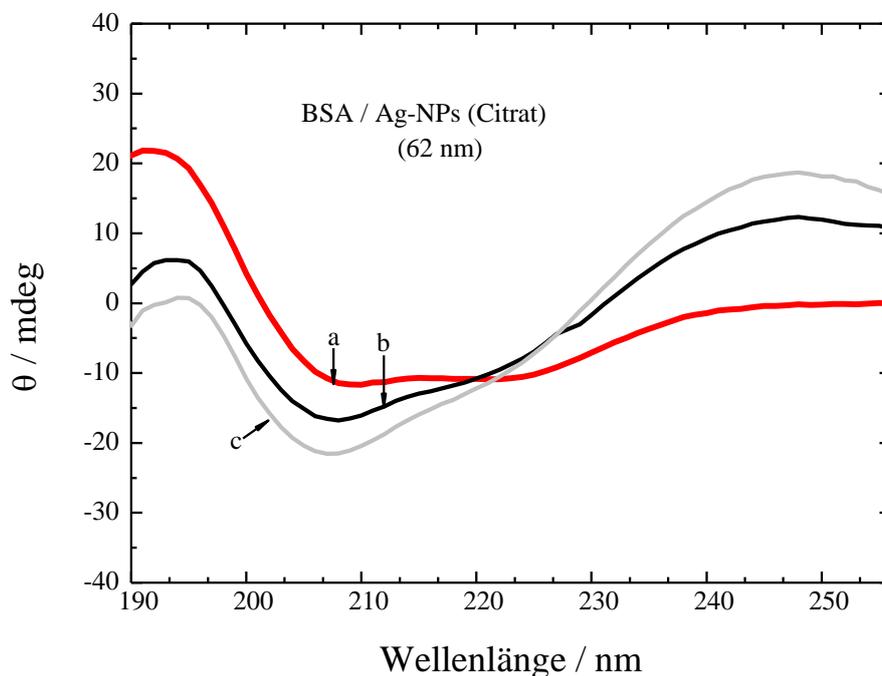
**Abbildung 80:** Auswahl von CD-Spektren von in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (27 nm), *a*: CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *b*: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (27 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *c*: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (27 nm) mit einer Konzentration von  $2.1 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$



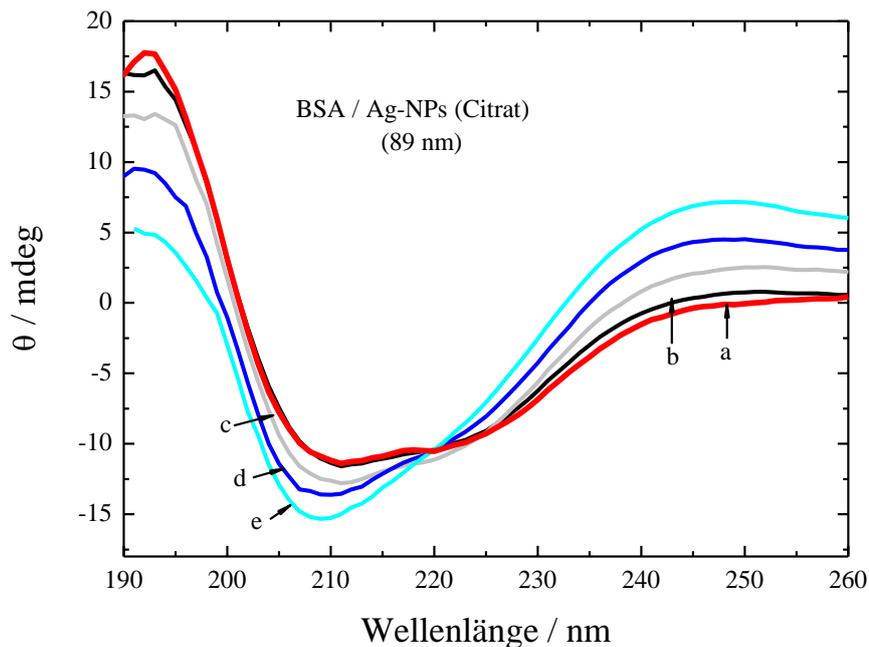
**Abbildung 81:** Auswahl von CD-Spektren von BSA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (42 nm), *a*: CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *b*: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (42 nm) mit einer Konzentration von  $2.6 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$ , *c*: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (42 nm) mit einer Konzentration von  $6.5 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$ , *d*: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (42 nm) mit einer Konzentration von  $9.0 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$



**Abbildung 82:** Auswahl von CD-Spektren von BSA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (45 nm), **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (45 nm) mit einer Konzentration von  $6.0 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (45 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$

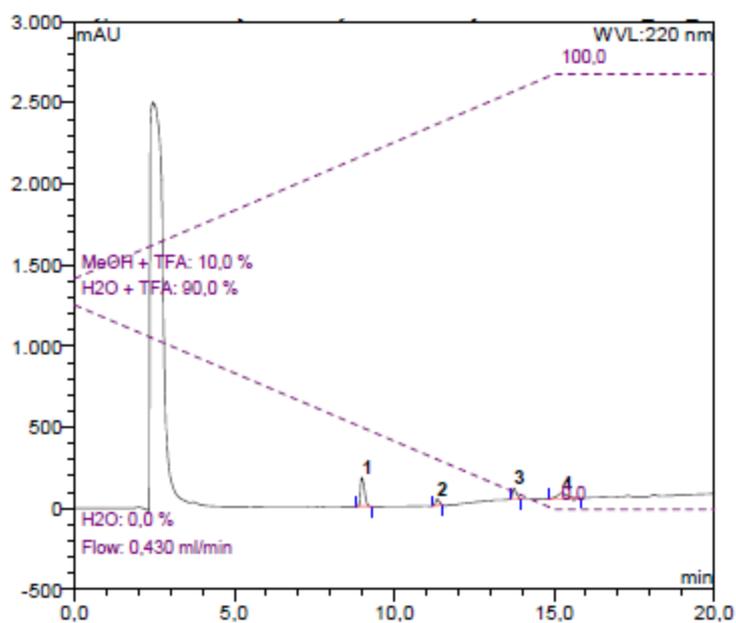


**Abbildung 83:** Auswahl von CD-Spektren von BSA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (62 nm), **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (62 nm) mit einer Konzentration von  $5.0 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (62 nm) mit einer Konzentration von  $8.0 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$

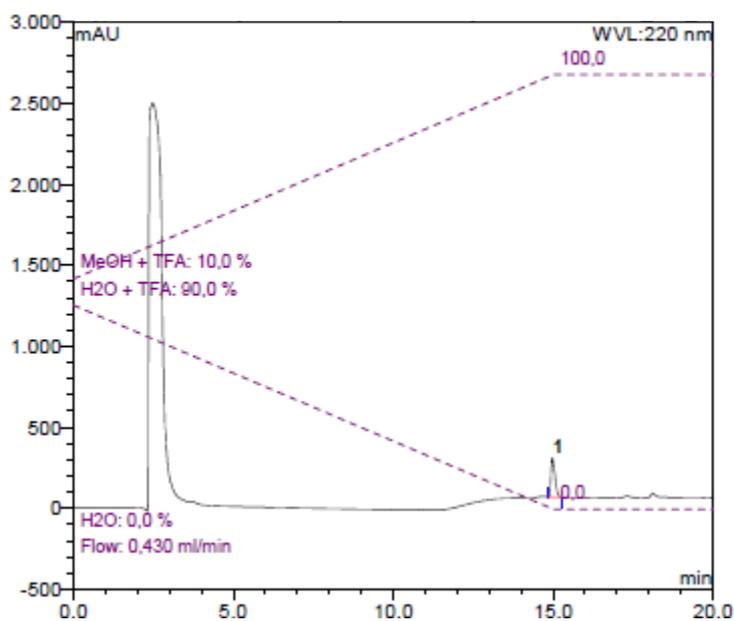


**Abbildung 84:** Auswahl von CD-Spektren von BSA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (89 nm), **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (89 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (89 nm) mit einer Konzentration von  $5.0 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (89 nm) mit einer Konzentration von  $8.0 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$ , **e:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (89 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$

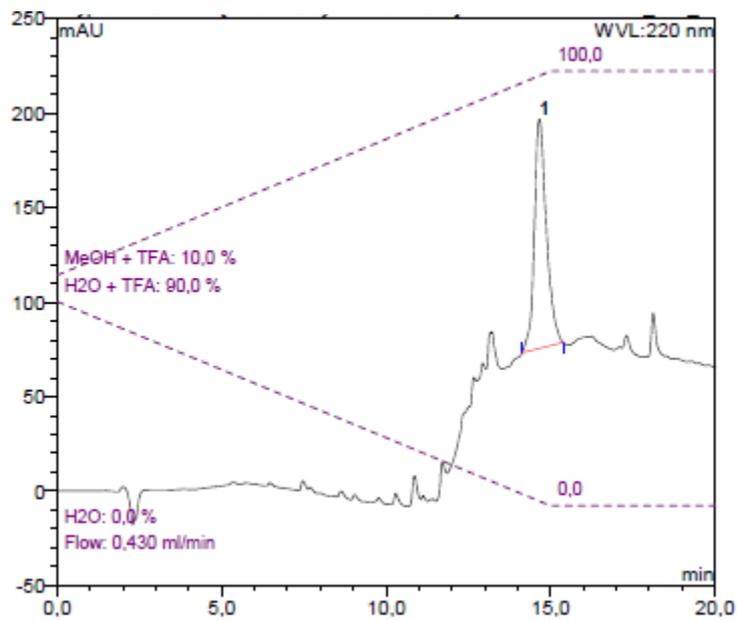
## 2. HPLC-Daten



**Abbildung 85:** HPLC-Messung der Trypsin-Nanopartikel Konjugate in Gegenwart des Substrates, Säule: YMC ODS-A (150 x 3.0 mm, 5  $\mu$ m), Lösungsmittel: Methanol/Wasser (0.05 % TFA), Detektionswellenlänge 220 nm, Flussrate: 0.430 mL/min, Retentionszeit  $t_R$ : Peak 1: 8.99, Peak 2: 11.34, Peak 3: 13.74, Peak 4: 15.24



**Abbildung 86:** HPLC-Messung der Trypsin-Nanopartikel Konjugate in Gegenwart des Substrates, Säule: YMC ODS-A (150 x 3.0 mm, 5  $\mu$ m), Lösungsmittel: Methanol/Wasser (0.05 % TFA), Detektionswellenlänge 220 nm, Flussrate: 0.430 mL/min, Retentionszeit  $t_R$ : Peak 1: 14.98



**Abbildung 87:** HPLC-Messung der Trypsin-Nanopartikel-Konjugate in Gegenwart des Substrates, Säule: YMC ODS-A (150 x 3.0 mm, 5  $\mu$ m), Lösungsmittel: Methanol/Wasser (0.05 % TFA), Detektionswellenlänge 220 nm, Flussrate: 0.430 mL/min, Retentionszeit  $t_R$ : Peak 1: 14.88

## Anhang

**Tabelle 9:** Liste der verwendete Geräte / Verbrauchsmaterialien

Geräte / Verbrauchsmaterialien	Firma & Spezifikationen
Circulardichroismus Spektrometer	AVIV CD-Spektrometer 62 DS
Circulardichroismus Spektrometer	Jasco, J-815 CD-Spektrometer
UV-Lampe für CD-Spektrometer	USHIO, Lampentyp: UXL 450SP und UXL451
Fluoreszenzspektrometer	Varian Instruments, Cary Eclipse Spektrometer mit Microplate Reader für 96-Mikrotiterplatten
Mikrotiterplatten	Nunc, 96-Mikrotiterplatten, weiß
Analytische Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie (HPLC) (Reversed-Phase-Chromatographie)	Dionex, P680 HPLC Pumpe, ASI-100 Automated Aample Injector, UVD 340U-Detektor, YMC-Pack ODS-AQ Säule (YMC) LC-18 (150 x 3.0mm , 5 µm)  Lösungsmittel (HPLC Qualität)  Detektion mittels UV-Detektor bei unterschiedlichen Wellenlängen
Zentrifuge	Heraeus, Biofuge pico Centrifuge,
Peltier-Element	Laird Technologies, Direct Liquid Systems (DL) Assemblies, Wassergekühlt, Maximale Kühlleistung: 65 Watt, maximale Temperatur: 63 °C, Toleranz: ± 10 %, Produktnummer: DL-060- 12
UV-Vis-Spektrometer	Ocean optics, USB 4000, 850 nm – 200 nm
UV-Vis-Spektrometer	Varian Instruments, Cary 300 Bio Spektrometer, 6 x 6 Multicell Block Peltier Series II
Reinstwasser	Millipore, 18.2 MΩ cm
Küvetten	Präzisions Küvetten aus Quarzglas Suprasil®, Hellma®, Typ 110-QS, Schichtdicke 1 mm
Küvetten	Einmal-Küvetten aus UV-hemmfreiem Polymethylmethacrylat (PMMA), Durchlässigkeitsbereich: 800 nm - 280 nm, 2.5 mL, Roth, Art. No.: P950
Dialyseschlauch	Spectra/Por®, Cellulosester, MWCO 100.000 D
LoBind® Tubes	Eppendorf, 2 mL
Pipettenspitzen	VWR, 10 µL, 100 µL und 1000 µL (Low Binding)
Papierfilter	Whatmanfilter Nr. 1

**Tabelle 10:** Liste der verwendeten Proteine

<b>Protein</b>	<b>Firma, Reinheit, Spezifikationen</b>
Bovines Serum-Albumin	SIGMA, CAS-Nr.: 9048-45-8, Reinheit: $\geq 98\%$ , aus Bovinem Serum, lyophilisiertes Puder, Fettsäuren- und Globulinfrei
Humanes Serum-Albumin	SIGMA, CAS-Nr.: 70024-90-7, Reinheit: $\geq 99\%$ , aus humanem Serum, lyophilisiertes Puder
Lysozym (Human)	SIGMA, CAS-Nr.: 12671-19-1, aus humaner Milch, 217539 U/mg
Lysozym (Huhn)	FLUKA, CAS-Nr.: 12650-88-3, aus Hühnerei, lyophilisiertes Puder, M = 14.3 kD, 881054 U/mg
Insulin (Bovines)	SIGMA, CAS-Nr.: 11070-73-8, aus Boviner Bauchspeicheldrüse
Insulin (Humanes)	SIGMA, CAS-Nr.: 11061-68-0 Human, rekombiniert (aus Hefe)
Immunoglobulin (IgG, Human)	SIGMA, lyophilisiertes Puder, human, $\geq 95\%$
Trypsin (Bovines)	Calbiochem, CAS-Nr.: 9002-07-7, EC Nummer: 3.4.21.4 Aus der Bauchspeicheldrüse, $\geq 2.500$ USP U/mg
Chymotrypsin (Bovines)	Calbiochem, CAS-Nr.: 9004-07-3, EC Nummer: 3.4.21.1 aus der Bauchspeicheldrüse, $\geq 1000$ U/mg

**Tabelle 11:** Liste der verwendeten Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma und Reinheit</b>
Küvettenreiniger	Hellmanex®, 2%ige Lösung
Lysozym Assay KIT	Invitrogen
Substrat (für Trypsin)	Bachem, Z-Phe-Arg-AMC
Substrat (für Chymotrypsin)	Bachem, Suc-Leu-Tyr-AMC
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Roth, ≥ 99.99 %
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	AppliChem, reinst
Coomassie® Brilliant Blue G250 Farbstoff	SERVA Electrophoresis, $\lambda_{\max} = 585 \pm 5 \text{ nm}$ , CAS-No: 6104-58-1
Ascorbinsäure	AppliChem, gepulvert, reinst, CAS-No.: 50-81-7
Natriumborhydrid	Fluka, p.a. ≥ 96 %, CAS-No.: 16940-66-2
Ethanol	p.a. (95 %)
Natriumacetat	AppliChem, p. a., wasserfrei
Natriumchlorid	Roth, p.a.
ETDA	AppliChem
DMSO	Acros, 99.9 %,
Phosphorsäure	konzentriert (85 %), p.a., AppliChem
Salzsäure	Konzentriert (37 %), p.a., Sigma-Aldrich
Salpetersäure	Konzentriert (65 %), p.a., Bernd Kraft

**Tabelle 12:** Zusammensetzung des Acetatpuffers

<b>Acetatpuffer (pH 7)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration</b>
Natriumchlorid	200 mM (5.84 g)
Natriumacetat	50 mM (2.05 g)
EDTA	5 mM (0.93 g)
Reinstwasser	500 mL

**Tabelle 13:** Zusammensetzung des Carbonatpuffers

<b>Carbonatpuffer (pH 9.3)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration</b>
Natriumcarbonat	1.59 g
Natriumhydrogencarbonat	2.93 g
Reinstwasser	1 L

**Abbildungsverzeichnis**

**Abbildung 1:** Darstellung einer Peptidbindung mit den zugehörigen Torsionswinkeln:  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\varpi$  ..... 7

**Abbildung 2:**  $\alpha$ -Helix-Struktur von Proteinen ..... 8

**Abbildung 3:**  $\beta$ -Faltblatt-Struktur von Proteinen ..... 8

**Abbildung 4:** Struktur von Hämoglobin, PBD-Code: 1GZX ..... 10

**Abbildung 5:** Struktur von Serum-Albumin. Darstellung der drei Domänen, PBD-Code: 1AO6 ..... 11

**Abbildung 6:** Räumliche Struktur von Humanem Lysozym, PBD-Code: 1LAA ..... 12

**Abbildung 7:** Räumliche Struktur des Bovinem Insulin Monomers, PDB-Code: 4INS ..... 13

**Abbildung 8:** Räumliche Struktur von Humanem IgG, PDB-Code: 3FZU ..... 14

**Abbildung 9:** Struktur von Bovinem Trypsin, Darstellung der Sekundärstrukturen und des aktiven Zentrums: Ser-195, Asp-102, His-57 (*gelb markiert*), PBD-Code: 3ATL ..... 15

**Abbildung 10:** Struktur von Bovinem  $\alpha$ -Chymotrypsin, Darstellung der Sekundärstrukturen und des aktiven Zentrums: Ser-195, Asp-102, His-57 (*gelb markiert*), PDB-Code: 4CHA.... 16

**Abbildung 11:** Darstellung der drei Phasen in der Nanopartikelbildung, *a*: Bildung von Atomen, *b*: Nukleation, *c*: Wachstum der Kristallkeime zu Nanopartikeln ..... 20

**Abbildung 12:** Änderung der freien Energie in Abhängigkeit des Nanopartikelradius ..... 22

**Abbildung 13:** Potentialverlauf von zwei Nanopartikeln im Abstand  $r$  zueinander: Darstellung der Gesamtwechselwirkung für drei Fälle, *a*: Kolloide sind stabil, *b*: Kolloide sind kinetisch stabil, reversible Agglomeration am sekundären Minimum, *c*: Kolloide agglomerieren sofort ..... 24

**Abbildung 14:** Schematische Darstellung der Plasmonen-Oszillation: Verschiebung der Elektronenwolke von metallischen Nanopartikeln während der Wechselwirkung mit einer elektromagnetischen Welle ..... 25

**Abbildung 15:** Grafische Darstellung der elektrischen Feldvektoren von linear polarisiertem Licht, die elektrischen Feldvektoren rotieren in entgegengesetzter Richtung auf einem Kreis, der resultierende elektrische Feldvektor (*rot*) führt zu linear polarisiertem Licht ..... 27

**Abbildung 16:** Darstellung der elektrischen Feldvektoren von linear polarisierten elektromagnetischen Wellen unterschiedlicher Amplitude. Das Resultat ist elliptisch polarisiertes Licht (*rot*), welches aus rechts- und links-circular polarisiertem Lichts ungleicher Intensität entsteht ..... 28

**Abbildung 17:** Grafische Darstellung der elektrischen Feldvektoren von zwei linear-polarisierten elektromagnetischen Wellen (*oben*) und circular polarisierten elektromagnetischen Wellen gleicher Amplitude aber verschiedener Phase (*unten*), Die Pfeile zeigen den elektrischen Feldvektor der resultierenden circular polarisierten elektromagnetischen Welle ..... 29

**Abbildung 18:** Definition der Elliptizität: Als Elliptizität wird der Winkel  $\theta$  bezeichnet, welcher aus dem Tangens der beiden Ellipsenachsen (*rot*)  $a$  und  $b$  resultiert,  $\alpha$  bezeichnet die optische Rotationsdispersion (ORD) und beschreibt den spezifischen Drehwert ..... 32

**Abbildung 19:** Darstellung der Molekülorbitale und elektronische Übergänge der Amidgruppe des Proteins ..... 33

**Abbildung 20:** CD-Spektren der verschiedenen Sekundärstrukturen eines Proteins,  $\alpha$ -Helix: zwei Minima bei 208 nm und 222 nm, Maximum bei 196 nm,  $\beta$ -Faltblatt: Minimum bei  $217 \pm 3$  nm, Maximum bei 198 nm, Random Coil: Minimum bei  $195 \pm 5$  nm, Maximum bei 210 nm..... 34

**Abbildung 21:** Elektrisches Dipolmoment des Amid  $\pi\pi^*$ -Übergangs ( $\mu_{\pi\pi^*}$ ) und magnetisches Dipolmomentes des Amid  $n\pi^*$ -Überganges ( $m_{n\pi^*}$ )..... 36

**Abbildung 22:** Grafische Darstellung zwischen den Dipolmomenten des Grundzustandes  $\bar{\mu}_0$  und angeregten Zustandes  $\bar{\mu}_1$  und dem daraus resultierenden Übergangsdipolmoment  $\bar{\mu}_{01}$  .. 37

**Abbildung 23:** Jablonski-Thermschema der Elektronenkonfiguration..... 38

**Abbildung 24:** Exemplarische Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel mit einem Durchmesser von  $40 \pm 10$  nm..... 47

**Abbildung 25:** Ergebnisse der Bestimmung des Durchmessers der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (DLS), mit einem bestimmten Durchmesser von  $45 \pm 4$  nm (*links*) und der Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), mit der ein Durchmesser von  $45 \pm 4$  nm ermittelt wurde (*rechts*)..... 47

**Abbildung 26:** Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikel mit einem Durchmesser von  $13 \pm 2$  nm ..... 48

**Abbildung 27:** Größenbestimmung der Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikel durch die Dynamische Lichtstreuung; mit der DLS wurde ein Durchmesser von  $17 \pm 2$  nm erhalten (*links*) und der analytischen Scheibenzentrifuge die einen Durchmesser von  $12 \pm 2$  nm lieferte (*rechts*) ..... 49

**Abbildung 28:** Foto (*links*) und Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Gold-Nanoschalen; es wurde ein Durchmesser von  $50 \pm 8$  nm ermittelt (*rechts*)..... 50

**Abbildung 29:** Exemplarische Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahme der PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikel mit einem Durchmesser von  $13 \pm 2$  nm..... 51

**Abbildung 30:** Untersuchung der Größe von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikel mittels Dynamischer Lichtstreuung; es wurde ein Durchmesser von  $39 \pm 3$  nm erhalten (*links*) und mit der Analytischen Scheibenzentrifuge (*rechts*) wurde ein Durchmesser von  $9 \pm 2$  nm bestimmt ..... 51

**Abbildung 31:** Exemplarische Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel mit einem Durchmesser von  $70 \pm 20$  nm ..... 52

**Abbildung 32:** Bestimmung der Größenverteilung der PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikel durch die Dynamische Lichtstreuung; mit der DLS wurde ein Durchmesser von  $80 \pm 6$  nm bestimmt (*links*) und der Nanoparticle Tracking Analysis (*rechts*), mit der ein Durchmesser von  $80 \pm 6$  nm ermittelt wurde ..... 53

**Abbildung 33:** UV-Vis-Spektren der metallischen Nanopartikel, *gelb*: Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel, Extinktionsmaximum: 420 nm, *rot*: Citrat-stabilisierte Gold-Nanopartikel, Extinktionsmaximum: 540 nm, *lila*: Gold-Nanoschalen, Extinktionsmaximum: 555 nm..... 54

**Abbildung 34:** Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von  $90 \pm 11$  nm ..... 55

**Abbildung 35:** Größenbestimmung der Polystyrol-Nanopartikel durch die Dynamische Lichtstreuung, es wurde ein Durchmesser von  $90 \pm 7$  nm ermittelt..... 55

**Abbildung 36:** Exemplarische Transmissionselektronmikroskop-Aufnahme der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 12 nm ..... 57

**Abbildung 37:** Exemplarische transmissionsmikroskopische Aufnahme der Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel mit einem durch Auszählung bestimmten Durchmesser von 27 nm..... 58

**Abbildung 38:** Schematische Darstellung des Circular dichroismus-Spektrometers AVIV 62 DS, **A:** Xenonlampe, **B:** ellipsoidaler Spiegel, **C:** flacher Spiegel, **SI:** Eingangsspalt, **S2:** Zwischenspalt, **S3:** Ausgangsspalt, **E:** Kollimator Spiegel, **PI:** Prisma, **P2:** Prisma, **F, G:** flacher Spiegel, **H:** Kollimator, **I:** achromatische Linsen, **LP:** Linear-Polarisator, **PEM:** photoelastischer Modulator, **PM:** Photomultiplier, **PE:** Peltierelement zur Temperaturregelung ..... 60

**Abbildung 39:** Zeitabhängiges CD-Signals bei 208 nm von Bovinem Serum-Albumin ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln ( $1.25 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ )..... 63

**Abbildung 40:** Ermittlung eines  $K_D$ -Wertes am Beispiel von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (90 nm) ..... 65

**Abbildung 41:** CD-Spektren von Bovinem Serum-Albumin  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln und den Edukten der Nanopartikel-Synthese, **a:** CD-Spektrum von Bovinem Serum-Albumin in Gegenwart von Natriumcitrat ( $c(\text{NaCitrat}) = 0.19 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von Bovinem Serum-Albumin in Gegenwart von Silbernitrat, ( $c(\text{AgNO}_3 = 0.15 \text{ mg mL}^{-1})$ ) **c:** CD-Spektrum von Bovinem Serum-Albumin in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln ( $2 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ ) ..... 66

**Abbildung 42:** Aufbau und Prinzip des Dialyse Experimentes: nicht gebundene Proteine können durch die Dialysemembran hindurch diffundieren, während an die Nanopartikel-Oberfläche gebundene Proteine im Dialyseschlauch zurück bleiben ..... 69

**Abbildung 43:** Vergleich der Dialyse Ergebnisse mit den Circular dichroismus-Messungen, die Fehlerbalken wurden entsprechend der Standardabweichung ermittelt ..... 71

**Abbildung 44:** Ermittlung der Hemmung des Enzyms mit Hilfe der Geradensteigung aus der Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit am Beispiel von Trypsin und PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln ..... 73

**Abbildung 45:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm), **a:** CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.52 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $1.7 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **c:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $3.4 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **d:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $5.1 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , **e:** CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $6.5 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$  ..... 75

**Abbildung 46:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (13 nm), *a:* CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.52 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *b:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (13 nm) mit einer Konzentration von  $2.3 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *c:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (13 nm) mit einer Konzentration von  $4.6 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *d:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (13 nm) mit einer Konzentration von  $2.1 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , *e:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (13 nm) mit einer Konzentration von  $2.7 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$  ..... 76

**Abbildung 47:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln (70 nm) in unterschiedlichen Konzentrationen, *a:* CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.52 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *b:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln (70 nm) mit einer Konzentration von  $2.4 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *c:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln (70 nm) mit einer Konzentration von  $1.4 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , *d:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln (70 nm) mit einer Konzentration von  $1.7 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , *e:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Silber-Nanopartikeln (70 nm) mit einer Konzentration von  $1.9 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$  ..... 77

**Abbildung 48:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (39 nm) in unterschiedlichen Konzentrationen, *a:* CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.104 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *b:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (39 nm) mit einer Konzentration von  $8.9 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *c:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (39 nm) mit einer Konzentration von  $2.1 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , *d:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (39 nm) mit einer Konzentration von  $2.4 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , *e:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (39 nm) mit einer Konzentration von  $2.7 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$  ..... 78

**Abbildung 49:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Polystyrol-Nanopartikeln (90 nm) bei unterschiedlichen Konzentrationen, *a:* CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.52 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *b:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Polystyrol-Nanopartikeln (90 nm) mit einer Konzentration von  $4.5 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *c:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Polystyrol-Nanopartikeln (90 nm) mit einer Konzentration von  $6.8 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *d:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Polystyrol-Nanopartikeln (90 nm) mit einer Konzentration von  $2.4 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , *e:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Polystyrol-Nanopartikeln (90 nm) mit einer Konzentration von  $9.1 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$  ..... 79

**Abbildung 50:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Siliziumdioxid-Nanopartikeln (100 nm) bei unterschiedlichen Konzentrationen, *a:* CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.26 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *b:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Siliziumdioxid-Nanopartikeln (100 nm) mit einer Konzentration von  $5.0 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$ , *c:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Siliziumdioxid-Nanopartikeln (100 nm) mit einer Konzentration von  $2.0 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$ , *d:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Siliziumdioxid-Nanopartikeln (100 nm) mit einer Konzentration von  $3.0 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$  ..... 81

**Abbildung 51:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart der Quantenpunkte (6 nm) bei unterschiedlichen Konzentrationen, *a:* CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *b:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart der Quantenpunkte (6 nm) mit einer Konzentration von  $9.8 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$ , *c:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart der Quantenpunkte (6 nm)

mit einer Konzentration von  $2.6 \cdot 10^{13}$  NP mL<sup>-1</sup>, **d**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart der Quantenpunkte (6 nm) mit einer Konzentration von  $3.3 \cdot 10^{13}$  NP mL<sup>-1</sup> ..... 83

**Abbildung 52:** CD-Spektren des fernen-UV Bereichs von Bovinem Insulin in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln (20 nm) bei unterschiedlichen Konzentrationen, **a**: CD-Spektrum von reinem Bovinem Insulin ( $0.143 \text{ mg mL}^{-1}$ ), pH 6, **b**: CD-Spektrum von Insulin in Gegenwart von Gold-Nanopartikeln (20 nm) mit einer Konzentration von  $8.8 \cdot 10^{10}$  NP mL<sup>-1</sup>, **c**: CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Gold-Nanopartikeln (20 nm) mit einer Konzentration von  $3.2 \cdot 10^{11}$  NP mL<sup>-1</sup> ..... 86

**Abbildung 53:** Zeitanhängige CD-Spektren des nahen-UV Bereichs von Insulin in Gegenwart von Gold Nanoschalen, **a**: CD-Spektrum von reinem Insulin ( $0.133 \text{ mg mL}^{-1}$ ), pH 6, **b**: CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Gold-Nanoschalen nach einer Inkubationszeit von 30 min gemessen, **c**: CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Gold-Nanoschalen nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden gemessen. .... 88

**Abbildung 54:** CD-Spektren von Bovinem Insulin (pH 6) und Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln mit verschiedenen Konzentrationen, **a**: CD-Spektrum von reinem Bovinem Insulin ( $40 \mu\text{M}$ ), **b**: CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $2.5 \cdot 10^{10}$  NP mL<sup>-1</sup> **c**: CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $5.0 \cdot 10^{10}$  NP mL<sup>-1</sup>, **d**: CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $7.5 \cdot 10^{10}$  NP mL<sup>-1</sup>, **e**: CD-Spektrum von Bovinem Insulin in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^{11}$  NP mL<sup>-1</sup> .. 89

**Abbildung 55:** Oberflächenpotential von Bovinem Insulin, rot: negative Oberflächenladung, blau: positive Oberflächenladung, **a**: Frontalansicht des Bovinen Insulins, **b**: rechts, **c**: hinten, **d**: links, für pH 7, Bilder online erstellt mit <http://kryptonite.nbcr.net/pdb2pqr>..... 90

**Abbildung 56:** CD-Spektrum von Humanem IgG und IgG in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm), **a**: CD-Spektrum reinem Humanen IgG **b**: CD-Spektrum von Humanem IgG in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^{11}$  NP mL<sup>-1</sup> ..... 91

**Abbildung 57:** Oberflächenpotential von Humanem IgG, rot: negative Oberflächenladung, blau: positive Oberflächenladung, **a**: Frontalansicht des Humanen IgG, **b**: rechts, **c**: hinten, **d**: links, für pH 7, Oberflächenladungen wurden unter <http://kryptonite.nbcr.net/pdb2pqr> gerechnet ..... 92

**Abbildung 58:** CD-Spektren von Bovinem Lysozym in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln, **a**: CD-Spektrum von reinem Bovinem Lysozym ( $0.157 \text{ mg mL}^{-1}$ ), **b**: CD-Spektrum von Bovinem Lysozym in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $7.5 \cdot 10^{10}$  NP mL<sup>-1</sup> **c**: CD-Spektrum von Bovinem Lysozym in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $2.5 \cdot 10^{11}$  NP mL<sup>-1</sup>, **d**: CD-Spektrum von Bovinem Lysozym in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $3.50 \cdot 10^{11}$  NP mL<sup>-1</sup> ..... 93

**Abbildung 59:** Oberflächenpotential von Bovinem Lysozym, rot: negative Oberflächenladung, blau: positive Oberflächenladung, **a**: Frontalansicht des Bovinen Lysozyms, **b**: rechts, **c**: hinten, **d**: links, für pH 7, Bilder online erstellt mit <http://kryptonite.nbcr.net/pdb2pqr> ..... 94

**Abbildung 60:** CD-Spektren von HSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln, *a:* CD-Spektrum von reinem HSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *b:* CD-Spektrum von HSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel (40 nm) mit einer Konzentration von  $2.2 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *c:* CD-Spektrum von HSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel (40 nm) mit einer Konzentration von  $5.6 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *d:* CD-Spektrum von HSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel (40 nm) mit einer Konzentration von  $7.4 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$  ..... 95

**Abbildung 61:** Oberflächenpotential von Humanem Serum-Albumin, *rot:* negative Oberflächenladung, *blau:* positive Oberflächenladung, *a:* Frontalansicht des Humanen Serum-Albumin, *b:* rechts, *c:* hinten, *d:* links, für pH 7, Bilder online erstellt mit <http://kryptonite.nbc.net/pdb2pqr> ..... 96

**Abbildung 62:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (12 nm), *a:* CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *b:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (12 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$ , *c:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (12 nm) mit einer Konzentration von  $1.2 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$ , *d:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (12 nm) mit einer Konzentration von  $1.4 \cdot 10^{12} \text{ NP mL}^{-1}$  ..... 99

**Abbildung 63:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (30 nm), *a:* CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *b:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (30 nm) mit einer Konzentration von  $2.1 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *c:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (30 nm) mit einer Konzentration von  $5.5 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *d:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (40 nm) mit einer Konzentration von  $9.6 \cdot 10^{10} \text{ NP mL}^{-1}$ , *e:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (30 nm) mit einer Konzentration von  $1.1 \cdot 10^{11} \text{ NP mL}^{-1}$  ..... 100

**Abbildung 64:** CD-Spektren von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (55 nm), *a:* CD-Spektrum von reinem BSA ( $0.052 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *b:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel (55 nm) mit einer Konzentration von  $7.9 \cdot 10^8 \text{ NP mL}^{-1}$ , *c:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel (55 nm) mit einer Konzentration von  $1.2 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$ , *d:* CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikel (55 nm) mit einer Konzentration von  $2.8 \cdot 10^9 \text{ NP mL}^{-1}$  ..... 101

**Abbildung 65:** Ergebnisse CD-Messungen von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln mit verschiedenen Durchmessern ..... 102

**Abbildung 66:** Schematische Darstellung der Größenverhältnisse von Serum-Albumin und 12 nm (*oben*), 40 nm (*mitte*) und 89 nm (*unten*) großen Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln ..... 103

**Abbildung 67:** Bindungskurve aus der Hemmung der Enzymaktivität von Bovinem Lysozym in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (Goldkern 13 nm, Gesamtdurchmesser 50 nm), Zeta-Potential: - 30 mV, in rot: Hill-Fit mit  $n = 1.0$  und  $K_D = 9.1 \text{ nM}$  ..... 108

**Abbildung 68:** Bindungskurve aus der Hemmung der Enzymaktivität von Trypsin in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (Goldkern 13 nm,

Gesamtdurchmesser 50 nm), Zeta-Potential: - 30 mV, Hill-Fit mit  $n = 1.5$  und  $K_D = 7.5$  nM (*rot*)..... 109

**Abbildung 69:** UV-Vis-Spektren der PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikel, des Trypsins und des Substrates, in einem Acetatpuffer (pH 7) aufgenommen..... 110

**Abbildung 70:** HPLC-Messung der Trypsin-Nanopartikel Konjugate in Gegenwart des Substrates, Säule: YMC ODS-A (150 x 3.0 mm, 5  $\mu$ m), Lösungsmittel: Methanol/Wasser (0.05 % TFA), Detektionswellenlänge 220 nm, Flussrate: 0.430 mL/min, Retentionszeit  $t_R$ : Peak 1: 8.98 min, Peak 2: 11.34 min, Peak 3: 13.74 min, Peak 4: 15.23 min. .... 111

**Abbildung 71:** HPLC-Messung der Trypsin-Nanopartikel Konjugate in Gegenwart des Substrates, Säule: YMC ODS-A (150 x 3.0 mm, 5  $\mu$ m), Lösungsmittel: Methanol/Wasser (0.05 % TFA), Detektionswellenlänge 220 nm, Flussrate: 0.430 mL/min, Retentionszeit  $t_R$ : Peak 1: 15.34 min..... 112

**Abbildung 72:** Bindungskurve aus der Hemmung der Enzymaktivität von Trypsin in Gegenwart von positiv geladenen Gold-Nanopartikeln (Goldkern 13 nm, Gesamtdurchmesser 25 nm), Zeta-Potential: + 30 mV, Hill-Fit mit  $n = 2.24$  und  $K_D = 154$  nM (*rot*) ..... 113

**Abbildung 73:** Oberflächenpotential von Trypsin, *rot*: negative Oberflächenladung, *blau*: positive Oberflächenladung, *a*: Frontalansicht des aktiven Zentrums, *b*: Rückansicht, aktives Zentrum hinten, *b*: Seitenansicht, aktives Zentrum links, *d*: Seitenansicht aktives Zentrum rechts, *e*: von oben, Ladungen erstellt für pH 7, Bilder online erstellt mit <http://kryptonite.nbc.net/pdb2pqr> ..... 114

**Abbildung 74:** *a*: CD-Spektrum von reinem Trypsin (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) in Acetatpuffer (pH 7), *b*: CD-Spektrum von Trypsin (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) in Acetatpuffer (pH 7) in Gegenwart von positiv geladenen Gold-Nanopartikeln (Monolage), *c*: CD-Spektrum von Trypsin (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) in Acetatpuffer (pH 7) in Gegenwart von negativ geladenen Gold-Nanopartikeln (Monolage) 115

**Abbildung 75:** Quantitative Bestimmung der Trypsin-Konzentration mittels Bradford-Protein-Assay, *grau*: Kalibrationsdaten, *rot*: desorbiertes Trypsin von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (Zeta-Potential + 30 mV), *blau*: desorbiertes Trypsin von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (Zeta-Potential - 30 mV) ..... 118

**Abbildung 76:** Quantifizierung der Trypsin-Konzentration mittels UV-Vis-Spektroskopie, UV-Vis-Spektrum der von den PEI-funktionalisierten (*rot*) und PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (*blau*) desorbierten Trypsin-Moleküle und die entsprechenden Kalibrations-Spektren mit Trypsin-Konzentrationen von 0 bis 20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (*schwarz*)..... 119

**Abbildung 77:** Bestimmung der Enzymaktivität der desorbierten Trypsin-Moleküle von den PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln mit einem von Zeta-Potential +30 mV (*rote Datenpunkte*), Kontroll-Messung einer Trypsin-Lösung (12.6  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) ohne vorherigen Nanopartikel-Kontakt (*rote Datenpunkte*) und von den PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln mit einem Zeta-Potential -30 mV (*schwarze Datenpunkte*), Kontroll-Messung einer Trypsin-Lösung (6.5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) ohne vorherigen Nanopartikel-Kontakt (*schwarze Datenpunkte*) ..... 120

**Abbildung 78:** Bindungskurve aus der Hemmung der Enzymaktivität von Chymotrypsin in Gegenwart von PVP-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (Goldkern 13 nm, Gesamtdurchmesser 50 nm), Hill-Fit mit  $n = 1$  und  $K_D = 4.3$  nM (*rot*)..... 121

**Abbildung 79:** Auswahl von CD-Spektren von BSA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (22 nm), *a*: CD-Spektrum von reinem BSA (0.052 mg mL<sup>-1</sup>), *b*: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-

stabilisierten Silber-Nanopartikeln (22 nm) mit einer Konzentration von  $8.6 \cdot 10^{11}$  NP mL<sup>-1</sup>, **c**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (22 nm) mit einer Konzentration von  $1.2 \cdot 10^{12}$  NP mL<sup>-1</sup>, **d**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (22 nm) mit einer Konzentration von  $1.5 \cdot 10^{12}$  NP mL<sup>-1</sup> ..... 148

**Abbildung 80:** Auswahl von CD-Spektren von in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (27 nm), **a**: CD-Spektrum von reinem BSA (0.052 mg mL<sup>-1</sup>), **b**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (27 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^{10}$  NP mL<sup>-1</sup>, **c**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (27 nm) mit einer Konzentration von  $2.1 \cdot 10^{10}$  NP mL<sup>-1</sup> ..... 149

**Abbildung 81:** Auswahl von CD-Spektren von BSA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (42 nm), **a**: CD-Spektrum von reinem BSA (0.052 mg mL<sup>-1</sup>), **b**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (42 nm) mit einer Konzentration von  $2.6 \cdot 10^9$  NP mL<sup>-1</sup>, **c**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (42 nm) mit einer Konzentration von  $6.5 \cdot 10^9$  NP mL<sup>-1</sup>, **d**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (42 nm) mit einer Konzentration von  $9.0 \cdot 10^9$  NP mL<sup>-1</sup> ..... 149

**Abbildung 82:** Auswahl von CD-Spektren von BSA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (45 nm), **a**: CD-Spektrum von reinem BSA (0.052 mg mL<sup>-1</sup>), **b**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (45 nm) mit einer Konzentration von  $6.0 \cdot 10^9$  NP mL<sup>-1</sup>, **c**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (45 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^{10}$  NP mL<sup>-1</sup> ..... 150

**Abbildung 83:** Auswahl von CD-Spektren von BSA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (62nm), **a**: CD-Spektrum von reinem BSA (0.052 mg mL<sup>-1</sup>), **b**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (62 nm) mit einer Konzentration von  $5.0 \cdot 10^9$  NP mL<sup>-1</sup>, **c**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (62 nm) mit einer Konzentration von  $8.0 \cdot 10^9$  NP mL<sup>-1</sup> ..... 150

**Abbildung 84:** Auswahl von CD-Spektren von BSA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (89 nm), **a**: CD-Spektrum von reinem BSA (0.052 mg mL<sup>-1</sup>), **b**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (89 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^9$  NP mL<sup>-1</sup>, **c**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (89 nm) mit einer Konzentration von  $5.0 \cdot 10^9$  NP mL<sup>-1</sup>, **d**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (89 nm) mit einer Konzentration von  $8.0 \cdot 10^9$  NP mL<sup>-1</sup>, **e**: CD-Spektrum von BSA in Gegenwart von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln (89 nm) mit einer Konzentration von  $1.0 \cdot 10^{10}$  NP mL<sup>-1</sup> ..... 151

**Abbildung 85:** HPLC-Messung der Trypsin-Nanopartikel Konjugate in Gegenwart des Substrates, Säule: YMC ODS-A (150 x 3.0 mm, 5 µm), Lösungsmittel: Methanol/Wasser (0.05 % TFA), Detektionswellenlänge 220 nm, Flussrate: 0.430 mL/min, Retentionszeit t<sub>R</sub>: Peak 1: 8.99, Peak 2: 11.34, Peak 3: 13.74, Peak 4: 15.24 ..... 152

**Abbildung 86:** HPLC-Messung der Trypsin-Nanopartikel Konjugate in Gegenwart des Substrates, Säule: YMC ODS-A (150 x 3.0 mm, 5 µm), Lösungsmittel: Methanol/Wasser

## Abbildungsverzeichnis

---

(0.05 % TFA), Detektionswellenlänge 220 nm, Flussrate: 0.430 mL/min, Retentionszeit  $t_R$ :  
Peak 1: 14.98..... 152

**Abbildung 87:** HPLC-Messung der Trypsin-Nanopartikel-Konjugate in Gegenwart des Substrates, Säule: YMC ODS-A (150 x 3.0 mm, 5  $\mu$ m), Lösungsmittel: Methanol/Wasser (0.05 % TFA), Detektionswellenlänge 220 nm, Flussrate: 0.430 mL/min, Retentionszeit  $t_R$ :  
Peak 1: 14.88..... 153

### Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Überblick über die Enzymklassen und deren Funktion..... 40

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der Ergebnisse zur Größenbestimmung der verwendeten Nanopartikel, welche mit den verschiedenen analytischen Methoden erhalten wurden, TEM (Transmissionselektronenmikroskop), REM (Rasterelektronenmikroskop), DLS (Dynamische Lichtstreuung), DCS (Analytische Scheibenzentrifuge), NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), BM (Brown'sche Molekularbewegung) ..... 56

**Tabelle 3:** Größe des Silber-Nanopartikel für die größenabhängigen Untersuchungen und die zugegebene Menge des „Seeds“ ..... 58

**Tabelle 4:** Gleichgewichtskonstanten ( $K_D$ ) von BSA im Interaktionsprozess mit Siliziumdioxid-Nanopartikeln ..... 82

**Tabelle 5:** Ergebnisse  $K_D$ -Werte: Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung ..... 84

**Tabelle 6:** Sekundärstrukturanteile von reinem Bovinem Insulin ..... 87

**Tabelle 7:** Gleichgewichtskonstanten von vier ausgewählten Proteinen im Interaktionsprozess mit Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln ..... 97

**Tabelle 8:** Zusammenfassung der  $K_D$ -Werte und die Berechnung der Gibbs'schen Energie  $\Delta G$  aus der van't Hoff Gleichung für verschieden große Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel ..... 105

**Tabelle 9:** Liste der verwendete Geräte / Verbrauchsmaterialien ..... 154

**Tabelle 10:** Liste der verwendeten Proteine ..... 155

**Tabelle 11:** Liste der verwendeten Chemikalien ..... 156

**Tabelle 12:** Zusammensetzung des Acetatpuffers ..... 157

**Tabelle 13:** Zusammensetzung des Carbonatpuffers ..... 157

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

**„Nanopartikel-Protein Interaktionen:**

**Quantifizierung struktureller und funktioneller Aspekte des Adsorptionsprozesses“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet zu haben.

Weiterhin erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Essen, im April 2013

.....  
Marcelina Patrizia Malissek

### Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. R. Zellner für die Aufnahme in seinem Institut bedanken und die Möglichkeit an diesem vielseitigen und interessanten Thema arbeiten zu dürfen. Weiterhin bedanke ich mich für die Möglichkeit des Forschungsaufenthaltes an der Universität Erlangen-Nürnberg.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. M. Epple für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Lennart Treuel danke ich für die umfangreiche Betreuung und die gewährten Freiräume bei der Bearbeitung des Themas.

Ich bedanke mich bei meiner Arbeitskollegin Julia S. Gebauer für die Erstellung der povray Bilder, die in dieser Arbeit gezeigt wurden und für die Charakterisierung der Nanopartikel mit Hilfe der Brown'schen Molekularbewegung.

Ich bedanke mich beim Arbeitskreis Prof. Dr. M. Epple für die freundliche Unterstützung in vielen Angelegenheiten. Besonders bei Dr. Dirk Mahl, Alexander Rostek und Dr. Jörg Diendorf bedanke ich mich für die Synthese und Charakterisierung der Nanopartikel

Herrn Prof. W. Peukert, Sonja Simon und Dr. Cornelia Damm danke ich für den angenehmen Aufenthalt im Forschungsinstitut und das Erlernen der Synthesen der Silber-Nanopartikel verschiedener Größen.

Bei Herrn Mathias Hanisch und Herrn Smail Boukercha bedanke ich mich für die Durchführung der TEM und ESEM-Aufnahmen.

## Danksagung

---

Herrn Prof. Carsten Schmuck und Dr. Sebastian Langolf danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Fluoreszenzmessungen und für die Unterstützung bei den HPLC-Messungen und die Hilfestellung in Bezug auf die Fluoreszenzmessungen.

Den Kooperationspartnern des Schwerpunktprogramms SPP1313 danke ich für die Nanopartikel. Ich bedanke mich bei Claudia Strobel und Herrn Dr. Herrmann für die Silizium- und Titandioxid-Nanopartikel und Herrn Christian Waurisch für die Quantum Dots.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Jürgen Leistikov für die Reparaturen am CD-Spektrometer.

Ich bedanke mich bei meinem Arbeitskollegen Julia S. Gebauer, Stefan Grass und Andreas Peckhaus für die stetes gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre im Institut.

## **Lebenslauf**

---

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

