

**Charakterisierung  
von Proteinen für die Biomineralisation  
von Hydroxylapatit**

---

CHARACTERIZATION OF PROTEINS FOR THE BIOMINERALIZATION OF  
HYDROXYAPATITE

von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt

von

**Melanie Melcher**

aus Schwaikheim

Hauptberichter: Prof. Dr. B. Hauer

Mitberichter: Prof. Dr. J. Bill

Tag der mündlichen Prüfung: 07. 11. 2014

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

**2014**

## **Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung von Proteinen für die Biomineralisation von Hydroxylapatit“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Des Weiteren bestätige ich ausdrücklich, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Institution zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Schwaikheim, den 17.07.2014

Melanie Melcher

# Danksagung

Zuallererst gilt mein Dank Prof. Dr. Bernhard Hauer, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit am Institut für Technische Biochemie durchzuführen und der mich durch zahlreiche Anregungen und Hilfestellungen unterstützt hat.

Prof. Dr. Joachim Bill möchte ich danken, dass er die Zweitkorrektur dieser Arbeit übernommen hat.

Prof. Dr. Joris van Slageren danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Meiner Betreuerin Dr. Sandra Facey danke ich für die Unterstützung, Hilfe und Ratschläge, die einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern von der BASF SE, Dr. Claus Bollschweiler, Dr. Thomas Subkowski, Dr. Nina Schneider und Dr. Stefan Jennewein, nicht nur für die Finanzierung dieses Projekts, sondern vor allem für die hervorragende Kooperation und die zahlreichen konstruktiven Diskussionen und Hilfestellungen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich in den vergangenen Jahren immer unterstützt hat und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt außerdem meinem Freund, Georgios Mourgas, der mich immer wieder aufgebaut und mir Rückhalt gegeben hat.

Außerdem danke ich Mina Lalli, die mich durch mein ganzes Studium begleitet hat und mir immer zur Seite stand. Danke für die schöne Zeit.

Auch bei meinen Laborkollegen, Thorsten Henkes, Ondrej Reznicek, Mihaela Antonovici, Dr. Martin Ploß und Melanie Allgaier, möchte ich mich bedanken, für die schöne Zeit im Labor. Außerdem danke ich den Studenten, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, Tatjana Spengler, Sibel Ilhan und Ferdinand Michalik.

## *Danksagung*

Dr. Thomas Theye aus dem Institut für Mineralogie, Universität Stuttgart, danke ich für die Röntgenpulverdiffraktometrie-Messungen und Moritz Schmelz, Institut für Mineralogie, für die Herstellung der Zahnschnitte.

Dr. Matthias Schweikert danke ich für die Einweisung und Bereitstellung des Transmissions-elektronen-Mikroskopes.

Und natürlich danke ich allen Mitarbeitern des ITBs für die schöne Zeit!

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Danksagung</b>	<b>II</b>
	<b>Abkürzungen</b>	<b>VIII</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Biomineralisation . . . . .	1
1.1.1	Klassische Nukleationstheorie und Pränukleationscluster . . . . .	2
1.2	Calciumphosphate . . . . .	5
1.2.1	Octacalciumphosphat . . . . .	6
1.2.2	Amorphes Calciumphosphat . . . . .	6
1.2.3	Hydroxylapatit . . . . .	6
1.3	Zahnaufbau . . . . .	8
1.3.1	Dentinogenese . . . . .	9
1.3.2	Amelogenese . . . . .	11
1.4	Zahnpflege . . . . .	12
1.4.1	Ansätze . . . . .	12
1.4.2	Fluorid . . . . .	13
1.4.3	Nanohydroxylapatit . . . . .	13
1.4.4	Proteinvermittelte Remineralisierung . . . . .	14
1.5	Zielsetzung . . . . .	16
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Chemikalien . . . . .	17
2.2	Medien . . . . .	17
2.3	Puffer . . . . .	19
2.3.1	Puffer zur Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen . . . . .	19
2.3.2	Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE . . . . .	19
2.3.3	Lösungen für Bindeversuche . . . . .	21
2.3.4	Lösungen für Nukleationsversuche . . . . .	22
2.3.5	Sonstige Puffer . . . . .	23

## Inhaltsverzeichnis

2.4	Antibiotika . . . . .	23
2.5	Plasmide . . . . .	24
2.6	<i>E. coli</i> Stämme . . . . .	24
2.7	Primer . . . . .	25
2.8	Kits . . . . .	28
2.9	Molekulargewichtsstandard . . . . .	29
2.10	Proteine . . . . .	29
2.11	Molekularbiologische Methoden . . . . .	31
2.11.1	Ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange) . . . . .	31
2.11.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> Zellen . . . . .	32
2.11.3	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen . . . . .	32
2.11.4	Hitzeschock-Transformation . . . . .	33
2.11.5	Sequenzierung . . . . .	33
2.12	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	33
2.12.1	Expression der Mutanten von BioMin 144 und BioMin 145 . . . . .	33
2.12.2	Zellaufschluss und Renaturierung . . . . .	34
2.12.3	Ni <sup>2+</sup> -Affinitätschromatografie . . . . .	35
2.12.4	Proteinkonzentrationsbestimmung . . . . .	35
2.12.5	SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese) nach Laemmli <sup>1</sup> . . . . .	36
2.13	Bindeversuche . . . . .	37
2.13.1	Fluoreszenzmarkierung . . . . .	37
2.13.2	Proteinkonzentrations- und Markierungsgradbestimmung . . . . .	37
2.13.3	Bindeversuche an Hydroxylapatitpulver . . . . .	38
2.13.4	Messung der Fluoreszenzintensitäten . . . . .	38
2.13.5	Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	39
2.13.6	Bindung an menschliche Zahnschnitte . . . . .	39
2.14	Nukleationsversuche . . . . .	40
2.14.1	Phosphatbestimmung . . . . .	40
2.14.2	Absorptionsmessung bei 820 nm . . . . .	41
2.14.3	Abnahme der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration . . . . .	41
2.14.4	Nukleation mit Fluorid . . . . .	43
2.15	Charakterisierung der gebildeten Präzipitate . . . . .	43
2.15.1	Röntgenpulverdiffraktometrie . . . . .	43
2.15.2	Transmissionselektronen-Mikroskopie . . . . .	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1	Screening . . . . .	44

## *Inhaltsverzeichnis*

3.1.1	Bindungsversuche . . . . .	44
3.1.1.1	Bindungsversuche an Hydroxylapatitpulver . . . . .	45
3.1.1.1.1	Kontrollen . . . . .	45
3.1.1.1.2	Amelogenin und Amelogeninderivate . . . . .	48
3.1.1.1.3	Statherinderivate . . . . .	50
3.1.1.1.4	Hydrophobine . . . . .	51
3.1.1.1.5	Weitere Proteine . . . . .	52
3.1.1.1.6	Zusammenfassung der Bindung an Hydroxylapatitpulver . . . . .	53
3.1.1.2	Bindung an menschliche Zahnschnitte . . . . .	55
3.1.2	Nukleationsexperimente . . . . .	58
3.1.2.1	Nukleation in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 . . . . .	58
3.1.2.1.1	Messung der Trübung bei 820 nm . . . . .	58
3.1.2.1.2	Messung der $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenabnahme . . . . .	60
3.1.2.2	Nukleation in artifiziellem Speichel . . . . .	64
3.1.2.3	Nukleation in artifiziellem Speichel unter Zusatz von Fluorid . . . . .	69
3.1.3	Zusammenfassung Screening . . . . .	70
3.2	Protein Engineering . . . . .	73
3.2.1	BioMin 144 Varianten . . . . .	75
3.2.1.1	Expression und Renaturierung der BioMin 144-Alaninmutanten . . . . .	76
3.2.1.2	Untersuchung der Bindeeigenschaften der BioMin 144-Alaninmutanten an Hydroxylapatit . . . . .	79
3.2.1.3	Untersuchung der Nukleationseigenschaften der BioMin 144-Alaninvarianten . . . . .	80
3.2.2	BioMin 145 Varianten . . . . .	81
3.2.2.1	Alanin- und Deletionsmutanten . . . . .	81
3.2.2.1.1	Expression und Renaturierung der BioMin 145-Alanin- und Deletionsmutanten . . . . .	83
3.2.2.1.2	Untersuchung der Bindeeigenschaften der BioMin 145-Alanin- und Deletionsmutanten an Hydroxylapatit . . . . .	84
3.2.2.1.3	Untersuchung der Nukleationseigenschaften der BioMin 145-Alanin- und Deletionsmutanten . . . . .	87
3.2.2.2	Fokussierte Bibliothek . . . . .	90
3.2.2.2.1	Expression und Renaturierung der fokussierten Bibliothek . . . . .	91
3.2.2.2.2	Untersuchung der Bindeeigenschaften der fokussierten Bibliothek . . . . .	91
3.2.2.2.3	Untersuchung der Nukleationseigenschaften der fokussierten Bibliothek . . . . .	93
3.2.2.3	Kombinationsvarianten . . . . .	96
3.2.2.3.1	Expression und Renaturierung der Kombinationsmutanten . . . . .	96
3.2.2.3.2	Untersuchung der Bindeeigenschaften der Kombinationsvarianten . . . . .	97

## *Inhaltsverzeichnis*

3.2.2.3.3	Untersuchung der Nukleationseigenschaften der Kombinationsmutanten . . .	99
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>101</b>
4.1	Screening . . . . .	101
4.2	Auswahl der Proteine . . . . .	103
4.3	Identifikation Hydroxylapatit-bindender Proteine . . . . .	104
4.3.1	Bindeversuche an Hydroxylapatitpulver . . . . .	104
4.3.2	Bindung an menschliche Zahnschnitte . . . . .	108
4.4	Identifikation Hydroxylapatit-nukleierender Proteine . . . . .	109
4.4.1	Charakterisierung der entstandenen Präzipitate . . . . .	113
4.4.2	Nukleation mit Fluorid . . . . .	114
4.5	Protein Engineering . . . . .	115
4.6	Ausblick . . . . .	122
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>123</b>
	<b>Summary</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>139</b>
7.1	Bindung an menschliche Zahnschnitte . . . . .	139
7.2	Nukleation in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 . . . . .	142
7.2.1	Charakterisierung über X-ray Pulverdiffraktometrie . . . . .	145
7.3	Nukleation in artifiziellem Speichel . . . . .	148

# Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
5(6)-FAM	5(6)-Carboxyfluorescein
5(6)-FAM SE	5(6)-Carboxyfluorescein-Succinimidylester
Abb.	Abbildung
ACP	amorphes Calciumphosphat
AMP	2-Amino-2-methyl-1-propanol
bzw.	beziehungsweise
CPC	o-Cresolphthalein Complexone
CPP	Casein Phosphopeptide
C-terminal	Carboxyterminal
D.O.L	Degree of Labeling
ddH <sub>2</sub> O	doppelt demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP	Dentinphosphoprotein
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
L	Liter
LRAP	Leucinreiches Amelogeninpolypeptid

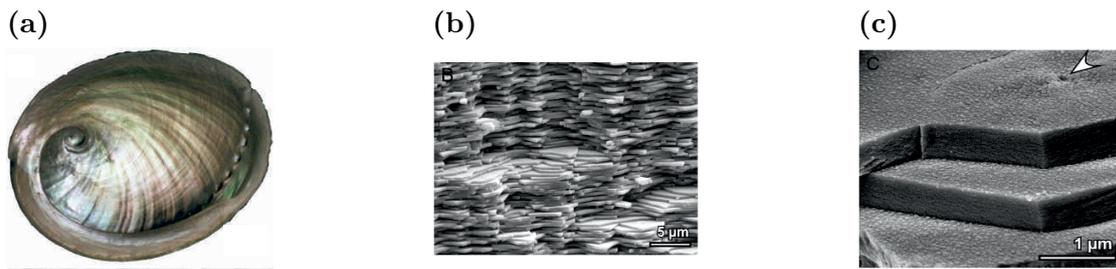
## *Abkürzungen*

M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molecular weight cut off
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
N-terminal	Aminoterminal
OCP	Octacalciumphosphat
OD	optische Dichte
ppm	parts per million
rpm	revolutions per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEM	Transmissionselektronen-Mikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight

# 1 Einleitung

## 1.1 Biomineralisation

Unter dem Begriff Biomineralisation versteht man allgemein die Fähigkeit von lebenden Organismen, Mineralien zu produzieren.<sup>2,3</sup> Auf diese Weise entstehen Kompositmaterialien aus einem meist kristallinen anorganischen Material und einem kleinerem Anteil an organischen Bestandteilen, auch Biomineralien genannt. Über den Aufbau durch Hierarchieebenen aus diesen organischen und anorganischen Bestandteilen zeigen viele Biomineralien einzigartige Materialeigenschaften, die perfekt auf die Anforderung der späteren Funktion abgestimmt sind.<sup>4</sup> Mehr als sechzig unterschiedliche Mineralien werden so von Lebewesen gebildet.<sup>3</sup> Die Kontrolle über Orientierung, Polymorphie und Morphologie der entstehenden Biomineralien erfolgt meist über die Wechselwirkung der organischen Matrix mit den sich bildenden anorganischen Kristallen. Dabei dienen die organischen Bestandteile wie z. B. Kollagenfasern oder die Proteine der extrazellulären Matrix als Templat der Mineralisation und kontrollieren so den Ort der Nukleation als auch die Orientierung. Ein eindrucksvolles Beispiel für die Kontrolle über die Polymorphie von Biomineralien und für die hervorragenden Materialeigenschaften sind die Schalen von Mollusken. Abbildung 1.1 zeigt die Schale von *Haliotis laevigata*. Die äußere Schicht der Muschel besteht aus thermodynamisch stabilen Calcit. Innen ist die Muschelschale aus Perlmutter aufgebaut. Perlmutter besteht zu 95% aus  $\text{CaCO}_3$  in der metastabilen Modifikation Aragonit.<sup>5</sup> Dabei sind die Aragonitplättchen regelmäßig hexagonal geformt und in einer bevorzugten kristallografischen Orientierung ausgerichtet (Abbildung 1.1b & 1.1c).



**Abbildung 1.1:** Die Schale von *Haliotis laevis* als Beispiel für ein Biomineral. Foto der inneren Schicht Perlmutter (a). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Querschnittes von Perlmutter (b). Vergrößerte Aufnahme der plättchenförmigen Aragonitstruktur (c). Abbildungen aus Heinemann *et al.*, 2011.<sup>6</sup>

Obwohl Perlmutter zu 95% aus  $\text{CaCO}_3$  besteht, zeigt es eine um etwa das 3000-fache erhöhte Bruchfestigkeit gegenüber geologisch vorkommenden  $\text{CaCO}_3$ . Grund hierfür ist die hierarchische Struktur aus Aragonitschichten und einem organischen Fasernetzwerk aus Chitin (Ziegel-Mörtel-Prinzip) (Abbildung 1.1b). Bei mechanischer Belastung werden entstehende Risse in der anorganischen Komponente durch das organische Netzwerk abgefangen und können sich nicht durch weitere Aragonitschichten fortpflanzen.<sup>7,8</sup>

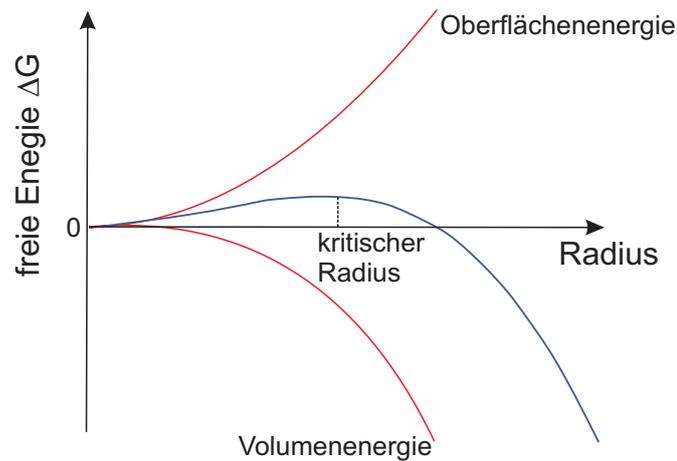
Ein tieferes Verständnis über den Entstehungsmechanismus solcher Biomaterialien eröffnet neue Möglichkeiten für das Design, aber auch die Einsatzbereiche neuer Materialien.<sup>4</sup> Hierfür ist es jedoch notwendig, die molekularen Mechanismen dieser Vorgänge zu verstehen. Ein Ansatzpunkt bietet die klassische Nukleationstheorie.

### 1.1.1 Klassische Nukleationstheorie und Pränukleationscluster

Kristallisation oder Mineralisation lässt sich allgemein unterteilen in Keimbildung und Kristallwachstum. Im ersten Schritt, der Keimbildung, kommt es zur Phasentrennung in einem übersättigten System. Die Keimbildung, auch Nukleation genannt, stellt den entscheidenden Schritt in der Kristallisation dar.<sup>4</sup> Über die Nukleation kann demnach die Kristallisation kontrolliert werden.<sup>7</sup>

Der Mechanismus der Nukleation wird durch die klassische Nukleationstheorie beschrieben. Sie wurde ursprünglich für die Nukleation aus übersättigtem Wasserdampf entwickelt und anschließend auf die Kristallisation in Lösungen übertragen.<sup>4,9</sup> Die klassische Nukleationstheorie beruht auf der Annahme, dass das Wachstum eines Nukleationskeims durch die Anlagerung einzelner Monomere wie z. B. Atome, Ionen oder Molekülen voranschreitet. Das Wachstum des Keims führt einerseits zur Zunahme der Volumenenergie, gleichzeitig aber auch zur Bildung einer Grenzfläche und damit verbunden zu einer Grenzflächenenergie und Oberflächenenergie. Die Volumenenergie ist negativ, da der entstehende

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.2:** Grundlage der klassischen Nukleationstheorie. Abbildung nach Gebauer *et al.*, 2011.<sup>4</sup>

Festkörper thermodynamisch stabiler ist als die übersättigte Lösung; die Volumenenergie treibt die Nukleation an. Die Oberflächenenergie wirkt der Nukleation entgegen. Für die freie Energie des Systems gilt:

$$\Delta G = \underbrace{\frac{4}{3}\pi r^3 \rho_S \Delta\mu}_{\text{Volumenenergie}} + \underbrace{4\pi r^2 \gamma}_{\text{Oberflächenenergie}} \quad (1.1)$$

- $r =$  Radius des wachsenden Kristalls
- $\rho_S =$  Teilchendichte im Kristall
- $\Delta\mu =$   $\mu_{\text{fest}} - \mu_{\text{flüssig}}$ , Differenz im chemischen Potential
- $\gamma =$  Phasengrenzenergie

Dabei entspricht der erste Term in Gleichung 1.1 dem Beitrag der Volumenenergie und der zweite Term der Oberflächenenergie. Da die Volumenenergie proportional zu  $r^3$  und die Oberflächenenergie proportional zu  $r^2$  ist, dominiert bei einem kleinen Radius die Oberflächenenergie, bei einem großen Radius die Volumenenergie. Der Radius, ab den die Volumenenergie überwiegt, wird als kritische Größe des wachsenden Keims bezeichnet (siehe Abbildung 1.2). Dies führt zu einem metastabilen Übergangszustand. Die Höhe dieses Übergangszustandes bestimmt die kinetische Barriere der Nukleation. Keime, die kleiner sind als die kritische Größe, sind instabil und lösen sich aufgrund der Oberflächenenergie wieder auf. Keime, die größer sind als die kritische Größe, wachsen unbegrenzt weiter.

## 1 Einleitung

Die Höhe der Nukleationsbarriere entspricht dabei dem Maximum der Funktion bei

$$\frac{\Delta G}{dr} \text{ und } r_c = \frac{16\pi\gamma^3}{3(\rho_s|\Delta\mu|)}.$$

Damit ergibt sich für die Höhe der Nukleationsbarriere:

$$\Delta G_{krit} = \frac{16\pi\gamma^3}{3(\rho_s|\Delta\mu|)}. \quad (1.2)$$

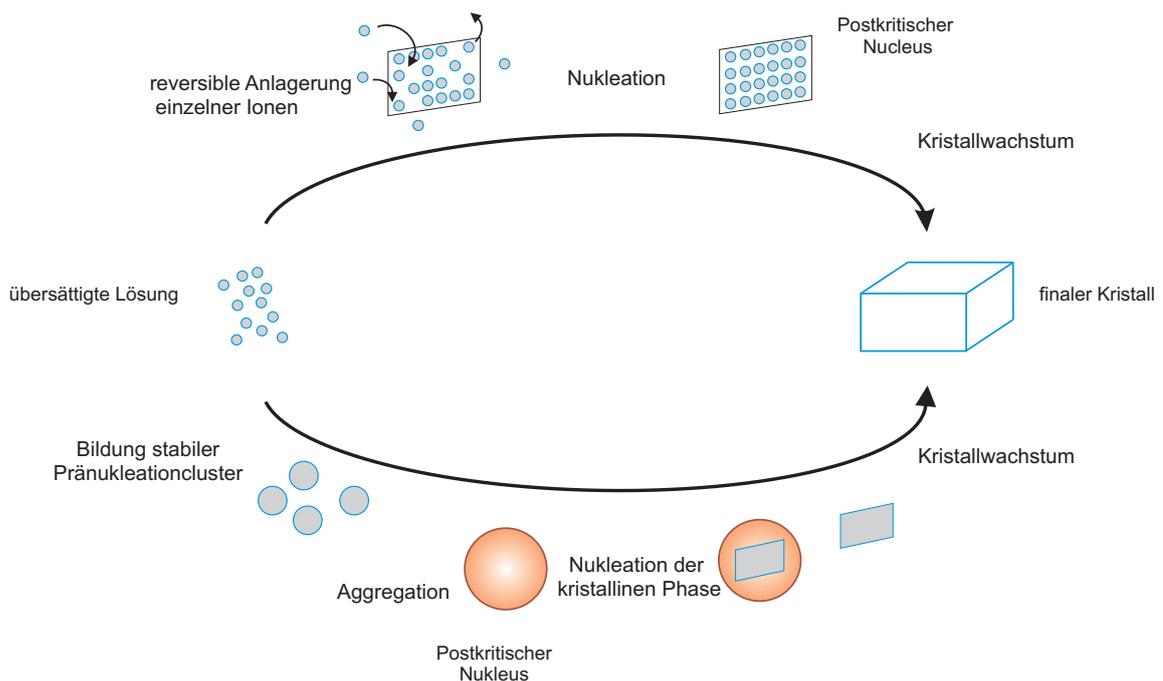
Das bedeutet die Höhe der Nukleationsbarriere ist  $\sim \gamma^3$  und  $\sim \frac{1}{|\Delta\mu|}$ , also stark abhängig von der Phasengrenzenergie  $\gamma$  und der Übersättigung.

Durch die Zugabe eines Nukleationskeims kann die Nukleationsrate deutlich beschleunigt werden. Befindet sich ein Nukleationkeim in der Lösung entspricht dieser einem Nukleus über kritischem Radius. Als Folge kann die Kristallisation einfach anschließen.<sup>10</sup>

Die klassische Nukleationstheorie ist allerdings nur beschränkt vorhersagekräftig. Größtes Problem der Nukleationstheorie ist die sogenannte Kapillaritätsannahme. Dabei wird angenommen, dass die Energien eines nanoskopischen Keims über makroskopische Größen wie Grenzflächenspannung bzw. thermodynamische Stabilität quantifiziert werden können. Für Keime im unteren Nanometerbereich sind diese makroskopischen Größen allerdings wenig realistisch. Dies wird durch das Abweichen vieler experimenteller Ergebnisse von der klassischen Nukleationstheorie bestätigt. Viele Biomineralien bilden sich über stabile Pränukleationscluster und polyamorphe Zwischenstufen.<sup>4,11</sup> Gemäß der Ostwaldschen Stufenregel bildet sich dabei zuerst die energiereichste Phase, die anschließend aufgrund ihrer höheren Löslichkeit in eine stabile Modifikation umkristallisiert.<sup>12</sup>

Beim Konzept der stabilen Pränukleationscluster bilden sich vor der Nukleation, also der Phasentrennung, unabhängig von der Übersättigung, kleinste, stabile Assoziate. Diese bilden bei der Phasentrennung zuerst amorphe Nanopartikel, die sich erst anschließend in Kristalle umwandeln. Diese Form der Nukleation wird auch für Hydroxylapatit postuliert. Im Gegensatz zur klassischen Nukleationstheorie verläuft die Phasentrennung über Clusteraggregation und nicht über die Anlagerung Monomere an einen einzelnen Keim (siehe Abbildung 1.3).<sup>4</sup>

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.3:** Nukleation nach der klassischen Nukleationstheorie (oben) und nach dem alternativen Konzept der stabilen Pränukleationscluster (unten).<sup>13</sup>

## 1.2 Calciumphosphate

Auf den Menschen bezogen stellen Calciumphosphate die wichtigsten Biomineralien dar.<sup>14</sup> Als carbonathaltiges Hydroxylapatit bilden sie die mineralischen Hauptbestandteile in Knochen, Zähne und mineralisierten Sehnen und gewährleisten die mechanische Stabilität als auch die erforderliche Härte. Die Kristallisation an einer falschen Stelle (pathogene Kristallisation, ektope Mineralisation) führt beispielsweise zu Arteriosklerose, Steinbildung oder Zahnstein.

Alle Calciumphosphate sind in ihrer reinen Form farblos, in der Natur kommen sie jedoch meist farbig durch Einlagerung von Übergangsmetallen vor. Die geologisch bedeutendsten sind Fluorapatit und Phosphorit, die natürlich in Sediment- und Eruptivgestein vorkommen. Wirtschaftlich ist der Hauptanwendungsbereich die Herstellung von Phosphatdüngern. Alle Calciumphosphate zeichnen sich durch eine schlechte Wasserlöslichkeit aus, sind jedoch alle in Säuren löslich. Anhand ihres Ca/P-Verhältnisses können Calciumphosphate eingeteilt werden. Dabei gilt, je kleiner das Verhältnis von Calcium zu Phosphat, desto saurer das Mineral, desto besser ist es wasserlöslich.

### 1.2.1 Octacalciumphosphat

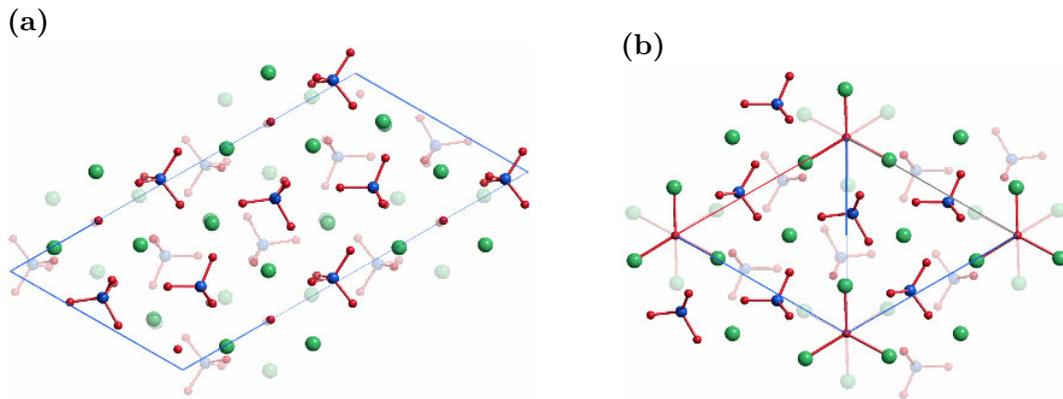
Octacalciumphosphat  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (OCP) wird häufig als metastabile Zwischenstufe bei der Ausfällung des thermodynamisch stabileren Hydroxylapatit aus einer wässrigen Lösung gefunden. Kristallografisch ist es aus apatitähnlichen Schichten aufgebaut, die durch hydratisierte Schichten voneinander getrennt sind. OCP ist Bestandteil von Zahnstein und Blasensteinen.<sup>15</sup> Des Weiteren wird OCP als wichtige Zwischenstufe bei der *in vivo* Bildung von Biomaterialien, wie z. B. Knochen oder Dentin, vermutet.<sup>12,16,17</sup>

### 1.2.2 Amorphes Calciumphosphat

Amorphes Calciumphosphat (ACP) besitzt ein Ca/P-Verhältnis im Bereich von 1,2 - 2,2. Bei der Fällung von Calciumphosphaten aus wässriger Lösung tritt ACP häufig als Zwischenprodukt auf. Durch Elektronenmikroskopie wurde ACP als runde Partikel mit einem Durchmesser von 20 - 200 nm charakterisiert. Es wird vermutet, dass ACP kugelförmige Cluster der chemischen Formel  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  bildet, die als erste Keime bei der Kristallisation von Hydroxylapatit auftreten.<sup>18</sup> Für ACP wird weiterhin eine bessere Osteokonduktivität als für Hydroxylapatit und eine gute Bioaktivität beschrieben.<sup>19</sup> Als Vorläufer für Hydroxylapatit, wird ACP bereits in *oral care* Produkten eingesetzt, z. B. in Kombination mit Caseinphosphopeptiden (CPP).<sup>20,21</sup>

### 1.2.3 Hydroxylapatit

Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) stellt das am schlechtesten wasserlösliche Calciumphosphat dar. Chemisch reines Hydroxylapatit kristallisiert monoklin in der Raumgruppe  $P2_1/b$  (Abbildung 1.4a). Oberhalb von 250 °C findet die Umwandlung in ein hexagonales Kristallgitter der Raumgruppe  $P6_3/m$  statt (Abbildung 1.4b). Diese Struktur wird durch Fremdionen stabilisiert. Daher findet sich in der Natur meist das hexagonale Gitter.



**Abbildung 1.4:** Kristallstruktur von Hydroxylapatit in einem monoklinen Kristallgitter (a) und einem hexagonalen Kristallgitter (b). Calciumatome sind als grüne, Phosphoratome durch blaue und Sauerstoffatome durch rote Kugeln dargestellt. (<http://www.cup.uni-muenchen.de/ac/kluefers/homepage/L/biominerals/apatite>)

Biologisch stellt Hydroxylapatit den mineralischen Anteil des größten Hartgewebes im menschlichen Körper dar, dem Knochen. Dort gewährleistet es die mechanische Stabilisierung. Knochen ist ein Verbundwerkstoff aus etwa 35% organischen Komponenten und einem Anteil von 65% an anorganischem Material, hauptsächlich Hydroxylapatit. Die organische Komponente besteht zu etwa 95% aus Kollagenfasern des Typs I. Die gestreckten Hydroxylapatitkristalle sind dabei parallel an den Kollagenfasern ausgerichtet. Zusätzlich dazu ist Hydroxylapatit der mineralische Bestandteil der Zahnhartsubstanzen.

## 1.3 Zahnaufbau

Der menschliche Zahn setzt sich aus vier unterschiedlichen Komponenten zusammen.<sup>22</sup> Der anorganische Hauptbestandteil ist dabei Hydroxylapatit. In Abbildung 1.5 sind die einzelnen Komponenten anhand eines menschlichen Zahnschnittes veranschaulicht.



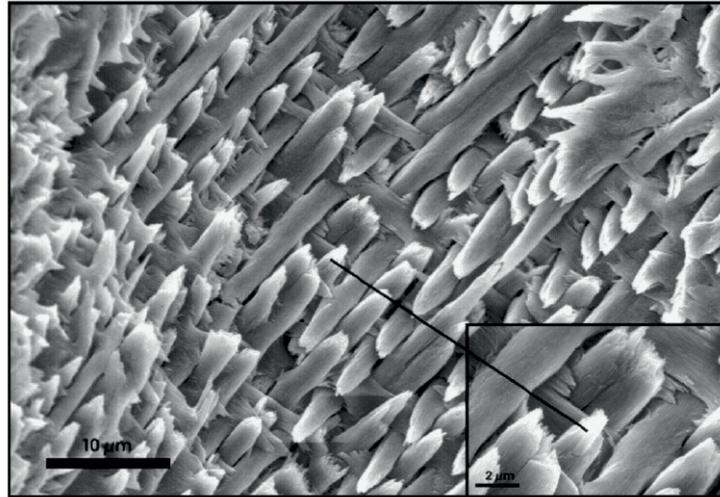
**Abbildung 1.5:** Darstellung der unterschiedlichen Komponenten in einem menschlichen Zahnschnitt. Der Zahn wird umhüllt von Enamel (E). Darunter befindet sich das Dentin (D), an den Wurzeln wird der Zahn vom Cementum (C) umgeben. Im Zahninneren befindet sich die Pulpa (P), in der die Blutgefäße und Nerven verlaufen.

Im Zahninneren befindet sich die sogenannte Pulpa (P). In ihr verlaufen die Blutgefäße, Fibroblasten, Lymphozyten und Nerven. Sie besteht hauptsächlich aus organischem Material. An den Wurzeln wird der Zahn von einer Schicht Cementum umhüllt. Das Dentin (D), auch Zahnbein genannt, ist ähnlich wie der menschliche Knochen ein Verbundwerkstoff und macht den Hauptteil der Zahnhartsubstanz aus. Es besteht zu etwa 70% aus Hydroxylapatit, die organische extrazelluläre Matrix besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern des Typs I.<sup>14</sup> Das Dentin befindet sich direkt unter der dritten Hartsubstanz, dem Enamel (E). Im Gegensatz dazu ist es weicher und absorbiert den Stress des darüberliegenden Zahnschmelzes und verhindert so den Bruch. Auf der Krone wird der Zahn von einer ca. 1-2 mm dicken Schicht Enamel (E), dem Zahnschmelz, umgeben. Enamel besteht zu über 95 - 97% aus Hydroxylapatit. Damit stellt Enamel das härteste Material gebildet von Vertebraten dar und ist darüber hinaus das am höchsten mineralisierte Gewebe im menschlichen Körper.<sup>22</sup>

Nicht nur der Anteil an Hydroxylapatit, sondern auch die Anordnung und Struktur der Hydroxylapatitkristalle in Enamel und Dentin zeigen signifikante Unterschiede. Im Enamel sind die Kristalle nadelförmig in Richtung der kristallografischen c-Achse verlängert,

## 1 Einleitung

besitzen eine Länge von bis zu 100  $\mu\text{m}$ , sind allerdings meist nur 50 nm breit und zeigen eine hochgeordnete Struktur (siehe Abbildung 1.6).<sup>23,24</sup>



**Abbildung 1.6:** Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme von hierarchischem Enamel.<sup>24</sup>

Dies lässt darauf schließen, dass die beiden Hartgewebe des menschlichen Zahns durch zwei unterschiedliche Biomineralisationsprozesse, der Dentinogenese und der Amelogenese, gebildet werden.

### 1.3.1 Dentinogenese

Dentin besteht zu etwa 70% aus Hydroxylapatit und enthält hauptsächlich Kollagen als organischen Bestandteil.<sup>25</sup> Es ähnelt in seinem Aufbau und seiner mechanischen Belastbarkeit den Knochen. Die Dentinogenese, der Aufbau des Dentins, beginnt mit der Sekretion einer extrazellulären Matrix durch die Odontoblasten. Hauptbestandteil dieser Matrix sind Kollagen-Fasern, hauptsächlich des Kollagen Typ I.<sup>25</sup> Die anschließende Calciumphosphatbildung wird durch verschiedene Enzyme reguliert, die sich in der Membran von Matrixvesikeln der Odontoblastenfortsätze befinden. Eine alkalische Phosphatase, die an die Oberfläche der Membran gebunden ist, ist verantwortlich für die Ablagerung von Calciumphosphat an den Kollagenfasern. Durch eine Adenosinmonophosphoesterase (AMPase) und eine anorganische Pyrophosphatase (PPiase) werden Phosphationen aus AMP und Pyrophosphat (PPi) freigesetzt. Das benötigte PPi wird von einer  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zur Verfügung gestellt, diese reguliert außerdem die initiale Mineralisierung.<sup>23</sup> Durch Zusammenspiel dieser Enzyme kommt es in einem ersten Schritt zur Zunahme an

## 1 Einleitung

$\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{PO}_4^{3-}$ -Ionen und zur Bildung von amorphem Calciumphosphat. Dieses wandelt sich in das kinetisch begünstigte Octacalciumphosphat  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , eine Vorstufe von Hydroxylapatit, um. Daraus entsteht das thermodynamische Produkt Hydroxylapatit.<sup>17</sup> Die anfänglichen Nanokristalle vergrößern sich zu Nadeln, was eine Auflösung der Matrixvesikel bewirkt. In der zweiten Phase wachsen die freien Kristalle abhängig von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$ -Konzentration und unter Einfluss nicht-kollagener Matrixproteine entlang der Kollagenfasern.<sup>23,26</sup> Das mengenmäßig wichtigste dentinspezifische Matrixprotein ist das Dentinphosphoprotein (DPP). DPP weist einen hohen Anteil an Phosphoserin (45 - 50 %) und Aspartatresten (35 - 38 %) auf.<sup>25,27</sup> Vor allem im C-terminalen Bereich finden sich Wiederholungen des Motivs Asp-Ser-Ser (DSS).<sup>28</sup> Aufgrund seiner stark negativen Ladung besitzt es eine hohe Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.<sup>29</sup> In Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bildet DPP eine  $\beta$ -Faltblattkonformation aus, was zur Bildung einer stark negativ geladenen Oberfläche führt, die mit dem wachsenden Hydroxylapatitkristall in Wechselwirkung tritt.<sup>3,30</sup> Nach Bindung an die Kollagenfasern im Prädentin erhöht es dort vermutlich die lokale Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$  und ermöglicht die initiale Bildung von Hydroxylapatit.<sup>25,31,32</sup> Durch Bindung an die kristallografische (100)-Fläche des wachsenden Kristalls werden zudem Größe und Form des entstehenden Hydroxylapatits gesteuert.<sup>33</sup> DPP entsteht aus dem inaktiven Dentinsialophosphoprotein (DSPP), das von den Odontoblasten sezerniert wird.<sup>34</sup> An der Prädentin-Dentingrenze findet die Hydrolyse von DSPP in DPP und das Dentinsialoprotein (DSP) statt.<sup>27</sup> Yarbrough *et al.* verwendeten Peptide, die Wiederholungen des Motivs DSS in verschiedener Anzahl aufwiesen, für *in vitro* Bindungsversuche an Hydroxylapatit. Für das Peptid  $(\text{DSS})_6$  konnte die höchste Bindungsaffinität nachgewiesen werden.<sup>35</sup> Interessanterweise konnte nach Fluoreszenzmarkierung und Inkubation an humane Zahnschnitte die Bindung dieses Peptides ausschließlich an Dentin und nicht an Enamel nachgewiesen werden. Das Peptid  $(\text{DSS})_8$  zeigte in anschließenden Mineralisierungsexperimenten ein deutliches Potential für die Nukleierung von Hydroxylapatit nach der Immobilisierung an Polystyrolbeads.<sup>35</sup> Chung *et al.* konnten ebenfalls für das Peptid  $(\text{DSS})_3$  ein Remineralisierungspotenzial nachweisen.<sup>36</sup>

Ein weiteres nichtkollagenes Matrixprotein während der Dentinogenese ist das Dentin-Matrix-Protein 1 (DMP1). Es ist ebenfalls stark negativ geladen und wird von den Odontoblasten gebildet. He *et al.* konnten *in vitro* nachweisen, dass sich der saure C-terminale Bereich von DMP1 in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen zusammenlagert. An dieser Oberfläche konnte die Nukleierung von Hydroxylapatit initiiert werden.<sup>37</sup> In weiteren Untersuchungen konnten He *et al.* für die Cluster pA (ESQES, 386-390) und pB (QESQSEQDS, 414-422) innerhalb der C-terminalen Domäne von DMP1 eine Nukleationsaktivität nachweisen. In Kombination zeigten diese Cluster eine beschleunigende

Nukleation, wohingegen die einzelnen Cluster keine Mineralbildung induzierten.<sup>37</sup> Weitere nichtkollagene Matrixproteine sind Osteocalcin und Osteopontin, die an der Regulation des Kristallwachstums während der Dentinogenese beteiligt sind.<sup>25,38</sup>

### 1.3.2 Amelogenese

Im Gegensatz zum Dentin besteht der Zahnschmelz fast ausschließlich aus Hydroxylapatit (~95%).<sup>14</sup> Damit ist der Zahnschmelz das härteste Material des menschlichen Körpers. Die Bildung des Zahnschmelzes, die Amelogenese, setzt etwas später als die Dentinogenese ein. Sie ist eine Leistung von Epithelzellen, den Ameloblasten, und verläuft in drei Stufen:<sup>39</sup>

- Bildung der organischen Matrix
- Mineralisierung der organischen Matrix
- Schmelzreifung

Dabei stellt Amelogenin das mengenmäßig wichtigste Protein der organischen Matrix dar (90%).<sup>40</sup> Amelogenin kann in drei Bereiche unterteilt werden: (1) Die ersten 45 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs besitzen einen hohen Anteil an Tyrosin. Dieser Bereich wird daher auch als TRAP (Tyrosinreiches Amelogenin-Peptid) bezeichnet. (2) Der hydrophobe zentrale Bereich besteht aus Wiederholungen von X-Y-Pro, wobei X und Y oft Glutamin sind. (3) Die C-terminale Region besitzt negativ geladene Aminosäuren, welche die Bindung von Calciumphosphat ermöglichen.<sup>41</sup> Durch *self-assembly* bildet Amelogenin Nanosphären, an deren Außenseite sich die Hydroxylapatitkristalle bilden und weiterwachsen können. Auf diese Weise beeinflusst Amelogenin die Nukleation, das Kristallwachstum sowie die Orientierung als auch die Morphologie der entstehenden Hydroxylapatitkristalle.<sup>42-44</sup> Eine natürliche *splicing* Variante ist LRAP (Leucinreiches Amelogenin-Polypeptid), die sich aus der N-terminalen und der C-terminalen Region von Amelogenin zusammensetzt. Festkörper-NMR-Analysen haben gezeigt, dass auch hier der C-terminale Bereich für die Bindung an Hydroxylapatit verantwortlich ist.<sup>45</sup> Le Norcy *et al.* konnten zeigen, dass diese *splicing* Variante sich bezüglich der Fähigkeit, Nanosphären auszubilden, ähnlich verhält wie das *full length* Amelogenin. Weiterhin konnten sie *in vitro* die regulatorischen Eigenschaften auf die Mineralisation von Hydroxylapatit nachweisen.<sup>46</sup> Weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix sind unter anderem Enamelin und Ameloblastin. Direkt nach Bildung der organischen Matrix beginnt die Mineralisierung durch Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen. Durch den apikalen Fortsatz (Tomes-Fortsatz) der Ameloblasten werden diese Kristalle zu Schmelzprismen zusammengefasst.<sup>39</sup> Um Raum für die wachsenden Kristalle zu schaffen, werden während der Schmelzreifung die organi-

schen Bestandteile der Matrix von einer Reihe Proteinase abgebaut und anschließend von den Ameloblasten resorbiert, so dass fast ausschließlich die anorganischen Hydroxylapatit-Kristalle zurückbleiben.<sup>47</sup>

## 1.4 Zahnpflege

### 1.4.1 Ansätze

Der Zahnschmelz stellt das härteste Gewebe im menschlichen Körper dar. Durch den strukturierten Aufbau und den hohen Mineralanteil von über 95% weist er eine unvergleichliche mechanische Stabilität auf. Durch die Abwesenheit einer organischen Matrix jedoch besitzt Enamel keine Selbstheilungsprozesse wie z. B. Knochen. Durch  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Speichel besteht die Möglichkeit, die Zahnoberfläche durch Abscheiden von Hydroxylapatit zu remineralisieren. Die Stabilisierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wird dabei vor allem durch das Protein Statherin, aber auch durch andere saure prolinreiche Speichelproteine gewährleistet.<sup>48,49</sup> Aufgrund des hohen Anteils an sauren Aminosäuren wie Glutamat und Asparat, aber auch wegen der Phosphorylierung der enthaltenen Serinreste, besitzt Statherin eine hohe Affinität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Durch Bindung an erste Calciumphosphat-Cluster wird deren Wachstum gehemmt und die spontane Präzipitation aus dem Speichel verhindert. Ähnlich wie Milch stellt Speichel daher eine übersättigte Lösung in Hinblick auf Calciumphosphate dar. Durch die hohe Konzentration an Calciumphosphaten besitzt Speichel die Fähigkeit, die Zahnoberfläche zu remineralisieren.<sup>50</sup>

Auf der anderen Seite sind Zähne einer stetigen Demineralisation ausgesetzt. Im Normalfall befinden sich die Prozesse De- und Remineralisierung im Gleichgewicht.<sup>51</sup> Wird dieses Gleichgewicht gestört und die Demineralisierung überwiegt, kommt es zu Erosionen an der Zahnoberfläche. Sind zusätzlich Bakterien an diesem Prozess beteiligt, spricht man von Karies. Säure-produzierende Bakterien, die über die Nahrung in den Mundraum gelangen, bilden einen Biofilm auf der Zahnoberfläche (Plaque) und setzen dort als Metabolite Säuren frei. Diese Säuren diffundieren in bzw. an den Zahn und lösen dort sukzessiv das Hydroxylapatit auf. Dies führt anfänglich zur Entstehung kleinerer Kariesläsionen, bei andauerndem Ungleichgewicht zur Bildung von Löchern im Zahn.<sup>52</sup> Karies stellt eine der häufigsten Volkskrankheiten dar. Die Behandlung und Vorbeugung dieses Phänomens hat daher in den vergangenen Jahrzehnten das wissenschaftliche Interesse auf sich gezogen. Vielversprechend dabei ist vor allem der Zusatz von Fluorid in Mundpflegeprodukten. Aber auch die positive Wirkung von Nanopartikeln konnte durch mehrere Studien belegt werden. Ein weiterer Ansatz ist die biomimetische Rekonstruktion der Zahnoberfläche.

### 1.4.2 Fluorid

In vielen Studien wurde belegt, dass Fluorid dentalen Karies reduziert.<sup>53-55</sup> Durch den Zusatz von Fluorid im Trinkwasser in verschiedenen Ländern konnte dort das Kariesrisiko um 30% erniedrigt werden. Heute wird Fluorid zur Karies-Prävention in praktisch allen Mundpflegeprodukten zugesetzt.<sup>56</sup> Durch Einbau der Fluoridionen in die Zahnoberfläche bildet sich Fluorapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ). Fluorapatit besitzt eine deutlich schlechtere Löslichkeit in Wasser und ist zu dem in einem weiten Bereich säurestabiler als Hydroxylapatit. Dies hat zur Folge, dass in einem pH-Bereich, der durch dentale Plaque erzeugt wird, die Präzipitation von Hydroxylapatit unterbunden wird, die Mineralisierung von Fluorapatit jedoch stattfinden kann.<sup>57</sup> Somit kann durch den Einbau von Fluorid die Demineralisierung der Zahnoberfläche inhibiert werden. In hohen Konzentrationen und in einem niedrigen pH-Bereich ist das Hauptreaktionsprodukt allerdings  $\text{CaF}_2$ . Weiterhin interagiert Fluorid mit Wachstumsprozessen in den säure-produzierenden Bakterien. Eine übermäßige Aufnahme von Fluorid führt jedoch zu Fluorosis und damit zu Zahnverformung, braunen Streifen und Pittings an der Zahnoberfläche.<sup>58</sup>

### 1.4.3 Nanohydroxylapatit

Ein weiterer Ansatz für die Behandlung von erodierten Zahnoberflächen ist die Zugabe von Nanokristallen. Für Nanopartikel aus amorphem Calciumcarbonat (Nano-ACC) konnte *in vitro* in Kollagen beschichteten Gefäßen eine Mineralbildung beobachtet werden. Nach Behandlung mit einer Zahnpasta, die Nano-ACC in einer Konzentration von 1% enthält, zweimal täglich für 20 Tage wurde eine Remineralisierung von artifiziellen Kariesläsionen beschrieben. Das Remineralisierungspotential wird durch die Einlagerung der Nanopartikel an die Kollagenfasern und die anschließende Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erklärt.<sup>59</sup> Nanohydroxylapatit (Nano-HA) ähnelt in seiner Morphologie, Kristallstruktur und Kristallinität den Kristalliten im Zahnschmelz und weist eine sehr gute Biokompatibilität und Bioaktivität auf.<sup>60,61</sup> Der genaue Wirkmechanismus wird noch diskutiert. Es wird davon ausgegangen, dass sich die Nanopartikel in die Kariesläsionen einlagern, dort als Ca-Reservoir dienen und so die Remineralisierung fördern.<sup>61</sup> So konnten Huang *et al.* für eine 10% ige Nano-HA-Suspension *in vitro* eine deutliche Remineralisierung von Kuhzähnen nachweisen.<sup>62</sup> In einem pH Cycling Model aus Demineralisierung (pH 4,5) und Remineralisierung (pH 7,0) konnte weiterhin über Microhardness Messungen eine Zunahme in der Härte abhängig von der Konzentration im Bereich von 1% - 10% an Nano-HA gezeigt werden.<sup>63</sup> Ein Beispiel für Nano-HA in der Mundpflege ist Biorepair<sup>TM</sup>. Dieses enthält eine Kombination aus  $\text{ZnCO}_3$  und Hydroxylapatit.<sup>64</sup>

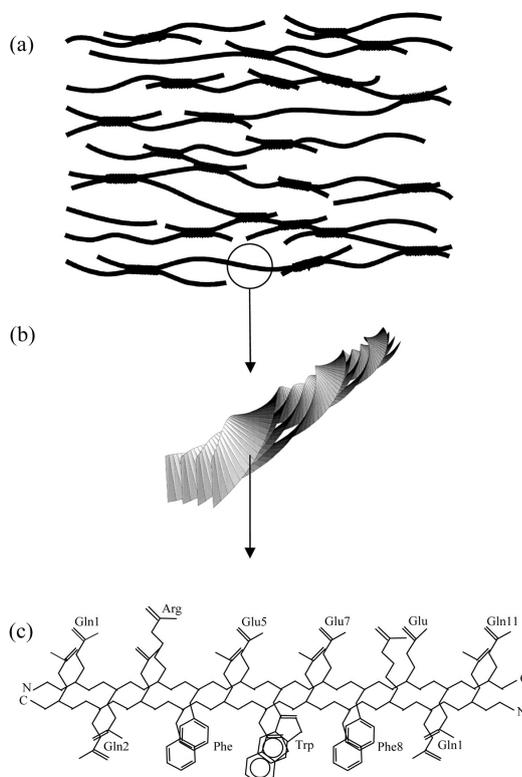
#### 1.4.4 Proteinvermittelte Remineralisierung

Neben den Zusätzen von Fluorid und Nano-HA stellen biomimetische, proteinvermittelte Ansätze eine vielversprechende Möglichkeit dar, erodierte Zahnoberflächen zu behandeln. Ein Beispiel für die proteinvermittelte Remineralisierung ist der Wirkstoff CPP-ACP (Recaldent<sup>TM</sup>). Der Komplex aus Casein Phosphopeptiden und amorphem Calciumphosphat (CPP-ACP) wird aus dem Milchprotein Casein gewonnen. Wie Speichel stellt auch Milch eine an verschiedenen Calciumphosphat-Festphasen übersättigte Lösung dar. Im Falle der Milch erfolgt die Stabilisierung der Calciumphosphate durch das Milchprotein Casein. Ähnlich wie Statherin weist dieses ebenfalls einen hohen Anteil an negativ geladenen Aminosäuren auf. Durch tryptischen Verdau werden verschiedene Casein Phosphopeptide hergestellt.<sup>65</sup> Vier dieser Peptide, die alle das Motiv Phosphoserin-Phosphoserin-Phosphoserin-Glutamat-Glutamat enthalten, zeigten dabei die Stabilisierung sehr hoher  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{PO}_4^{3-}$ -Konzentrationen sowohl in sauren als auch alkalischen pH-Bereichen.<sup>66,67</sup> Eine 1% ige CPP-Lösung konnte 60 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und 36 mM  $\text{PO}_4^{3-}$  stabilisieren.<sup>67</sup> Nach Komplexierung von amorphem Calciumphosphat stellt dies den Wirkstoff CPP-ACP dar. Durch CPP-ACP wird eine Verabreichung von hohen Konzentrationen an amorphem Calciumphosphat ermöglicht.<sup>68</sup> Recaldent ist kommerziell in Kaugummis (Trident Xtra Care, Recaldent) und in Zahnpasten (MI Tooth Mousse, MI Tooth Paste) erhältlich. Das remineralisierende Potential konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden.<sup>69</sup> 2010 beschrieben Manton *et al.* den Zusatz von 0,2 % (w/v) CPP-ACP zu vier handelsüblichen Soft Drinks mit einem pH-Wert von 2,9. Zahnproben wurden *in vitro* 30 min bei 37 °C den Lösungen ausgesetzt. An allen Proben ohne CPP-ACP wurden deutliche Erosionen beobachtet, mit Zusatz von CPP-ACP wurden deutlich geringere Erosionen gefunden.<sup>70</sup> In einer klinischen Studie von 2008 wurde das remineralisierende Potential der Kaugummis nachgewiesen. Über einen Zeitraum von zwei Jahren kauten 2720 Schulkinder 3 x 10 min täglich die Kaugummis. Nach Ablauf der zwei Jahre konnte bei 18 % der Probanden ein Rückgang von Karies und bei 53 % eine deutliche Remineralisierung beobachtet werden.<sup>71</sup> Andersson *et al.* untersuchten den Effekt von CPP-ACP enthaltender Zahncreme auf White-Spot Läsionen. In einer klinischen Studie mit 26 Personen verwendete eine Gruppe 3 Monate eine Zahncreme mit CPP-ACP und anschließend 3 Monate eine fluoridhaltige Zahnpasta. Die Kontrollgruppe verwendete sechs Monate eine fluoridhaltige Zahnpasta und eine fluoridhaltige Mundspülung. Während in der Kontrollgruppe lediglich 25 % der White Spot Läsionen zurückgingen, wurden in der Gruppe, die die CPP-ACP haltige Zahnpasta verwendeten, ein Rückgang von 63 % beobachtet.<sup>72</sup> Insgesamt wurden das remineralisierende Potential in elf klinischen Studien bestätigt.<sup>20</sup> Es wird davon ausgegangen, dass die CPP-ACP-Komplexe in die Zahnschmelzläsionen

## 1 Einleitung

diffundieren. Aufgrund ihrer hohen Affinität zu Hydroxylapatit binden die Caseinphosphopeptide an den Zahnschmelz und geben die amorphen Calciumphosphatpartikel an die Umgebung ab, was zu einer lokalen Übersättigung und damit zu einer erhöhten Remineralisierung führt.<sup>73,74</sup>

Ein weiteres Beispiel für die biomimetische Remineralisierung ist das Peptid P<sub>11-4</sub>. Dieses Peptid wurde rational entworfen um Hydrogele auszubilden. Über spezifische Wechselwirkungen der Seitenketten untereinander lagern sich die Peptide bei Änderungen im pH-Wert oder in der Salzkonzentration zu einer antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstruktur zusammen, die wiederum sogenannte *Nanotapes* ausbilden (Abbildung 1.7). Die Hydrogelbildung wird zum einen durch hydrophobe Wechselwirkungen der Glutaminreste (Q) an N- und C-Terminus der Peptides, zum anderen durch  $\pi$ - $\pi$ -Stapelkräfte zwischen den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (F) und Tryptophan (W) ermöglicht. Durch elektrostatische Interaktion zwischen dem Arginin (R) an Position 3 und dem Glutamat (E) an Position 9 wird die antiparallele Ausrichtung der Peptide zueinander gewährleistet.<sup>75</sup> Durch das Glutamat an Position 7 erhalten die entstandenen Oberflächen eine negative Ladung. Elektrostatische Wechselwirkungen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen führen zu einer lokalen Übersättigung an dieser Oberfläche und zur Bildung von Hydroxylapatit.



**Abbildung 1.7:** Schematische Darstellung des hierarchisch gebildeten Netzwerk aus P<sub>11-4</sub> Molekülen.<sup>76</sup>

Kirkham *et al.* konnten für dieses Peptid einen remineralisierenden Effekt auf einer erodierten Zahnoberfläche nachweisen.<sup>76</sup> In leicht veränderter Form (QRFWEFEQQF) ist dieses Peptid auch als Curodont™ bekannt und findet Anwendung im Bereich *oral care*.

### 1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung von unterschiedlichen Proteinen für den Einsatz in *oral care* Produkten. Hierfür wurden von der BASF SE, Ludwigshafen, unterschiedliche Proteine gestellt, die entweder einen direkten Bezug zum Aufbau menschlicher Zähne aufweisen oder eine Affinität zu Calciumionen oder Oberflächen im Allgemeinen besitzen. Dabei handelte es sich unter anderem um unterschiedliche Derivate des während der Amelogenese auftretenden Amelogenins, aber auch um Proteine, die während der Dentinogenese eine Rolle spielen. Es wurden weiterhin Derivate des Speichelproteins Statherin sowie Fusionskonstrukte des oberflächenaktiven Hydrophobins DewA untersucht.

Diese Proteine sollten zum einen, nach Fluoreszenzmarkierung, auf ihre Bindefähigkeit an Hydroxylapatit, dem mineralischen Hauptbestandteil menschlicher Zähne, untersucht werden. Des Weiteren sollten diese Proteine bezüglich ihrer Nukleationseigenschaften bewertet werden. Um dies zu ermöglichen sollten in dieser Arbeit mögliche Binde- und Nukleationsassays entwickelt bzw. den Ansprüchen der späteren Anwendung in Mundpflegeprodukten angepasst werden. Hierfür sollten die unterschiedlichen Assays jeweils einmal in gepufferten Salzlösungen getestet, eine weitere Versuchsreihe sollte unter realitätsnäheren Bedingungen durchgeführt werden. Durch Bewertung in dieser Screeningkaskade sollten aus einem Pool von 24 Proteinen mögliche Kandidaten identifiziert werden.

Anhand eines möglichen Kandidats aus diesem Screening sollte weiterhin durch gerichtete Mutagenese ein tieferes Verständnis über die Nukleation von Hydroxylapatit erlangt werden. Nach Identifizierung des für die Nukleation verantwortlichen Bereichs innerhalb dieses Proteins sollten über einen Alaninscan und die Erstellung verschiedener Deletionsmutanten die für die Nukleation kritischen Aminosäuren identifiziert werden. Durch eine fokussierte Bibliothek, basierend auf einer verkürzten Mutante, sollte weiterhin der Einfluss von Aminosäuren mit unterschiedlichen Funktionalitäten untersucht und das Protein in Bezug auf eine beschleunigte Nukleation weiter optimiert werden.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz) oder Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen, wenn nicht anders aufgeführt. Verwendeten Enzyme wurden von Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland) bezogen, wenn nicht anders aufgeführt. Die Mundwasserformulierungen A und B, sowie die untersuchten Proteine wurden freundlicherweise von der BASF SE (Ludwigshafen, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

### 2.2 Medien

#### LB-Medium (Luria-Bertani Medium)<sup>77</sup>

Trypton	1 %(w/v)
Hefeextrakt	0,5 %(w/v)
NaCl	0,5 %(w/v)

#### LB-Agarplatten

LB-Medium	500 mL
Agar	10 g

### EC3-Medium

Trypton	1,5 %(w/v)
Hefeextrakt	1,5 %(w/v)
Glycerol	3,0 %(w/v)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2 %(w/v)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 %(w/v)
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 %(w/v)
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,01 %(w/v)
5x SL4	1 %(w/v)

Die Salze wurden getrennt eingewogen und gelöst. Nach Zugabe der Salze zu den übrigen gelösten Bestandteilen wurde der pH mit 5 M  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$  auf 7,0 eingestellt. Die Zugabe der sterilen Spurenelementlösung 5x SL4 erfolgte nach dem Autoklavieren.

### 5x Spurenelementlösung SL4

Titriplex III	1,5 g/L
$\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1,0 g/L
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	50 mg/L
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	15 mg/L
$\text{H}_3\text{BO}_3$	150 mg/L
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	100 mg/L
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	5 mg/L
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	15 mg/L

Die Spurenelementlösung wurde nach dem Autoklavieren kühl und dunkel gelagert.

## 2.3 Puffer

### 2.3.1 Puffer zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

#### TFB1-Puffer (pH 6,8 mit Essigsäure)

RbCl	100 mM
MnCl <sub>2</sub>	50 mM
KAc	30 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
Glycerol	15 %(v/v)

#### TFB2-Puffer (pH 8,8 mit KOH)

MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	75 mM
Glycerol	15 %(v/v)

### 2.3.2 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

#### 4x Trenngelpuffer (pH 8,8 mit HCl<sub>conc</sub>)

Tris	1,5 M
------	-------

#### 4x Sammelgelpuffer (pH 6,8 mit HCl<sub>conc</sub>)

Tris	0,5 M
------	-------

#### 6x SDS-Probenpuffer

4x Sammelgelpuffer	7 mL
Glycerol	3 mL
SDS	1 g
DTT	930 mg
Bromphenolblau	1,2 mg

Der 6x SDS-Probenpuffer wurde zu 500 µL aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

## 2 Material & Methoden

### 10x SDS-Laufpuffer

Tris	30 g/L
Glycin	144 g/L
SDS	10 g/L

### Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue	0,1 %(w/v)
Ethanol	30 %(v/v)
Essigsäure	10 %(v/v)

### Entfärbelösung

Ethanol	30 %(v/v)
Essigsäure	10 %(v/v)

### Trenngel (15%)

30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid-Lösung	15 mL
4x Trenngelpuffer	7,5 mL
SDS (10%)	0,3 mL
ddH <sub>2</sub> O	6,1 mL
APS (40%)	0,15 mL
TEMED	0,01 mL

### Sammelgel (6%)

30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid-Lösung	1,33 mL
4xSammelgelpuffer	2,5 mL
ddH <sub>2</sub> O	6 mL
APS (40%)	0,05 mL
TEMED	0,005 mL

### 2.3.3 Lösungen für Bindeversuche

#### HBST-Puffer pH 7,5 (HEPES-buffered saline Tween)

HEPES	50 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1 %(v/v)

#### Mundwasserformulierungen

	A	B
NaF	0,05 %(w/v)	0,05 %(w/v)
Na-Saccharin	0,02 %(w/v)	0,02 %(w/v)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,4 %(w/v)	0,4 %(w/v)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,0 %(w/v)	1,0 %(w/v)
Glycerol	7,5 %(w/v)	7,5 %(w/v)
1,2-Propandiol	7,5 %(w/v)	7,5 %(w/v)
Sorbitol	5,5 %(w/v)	5,5 %(w/v)
Polysorbat 20	1,0 %(w/v)	-
Poloxamer 407	-	1,0 %(w/v)

### 2.3.4 Lösungen für Nukleationsversuche

#### Artifizieller Speichel nach Panich<sup>78</sup>

10x  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,1)

$\text{K}_2\text{HPO}_4$	8,04 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,65 g/L

10x Salzlösung

KCl	6,5 g/L
$\text{MgCl}_2$	0,58 g/L
$\text{CaCl}_2$	1,65 g/L

**2-Amino-2-methyl-1-propanol (pH 10,5 mit  $\text{HCl}_{\text{conc}}$ )**

2-Amino-2-methyl-1-propanol	150 mM
-----------------------------	--------

#### **o-Cresolphthalein Complexone**

o-Cresolphthalein Complexone	5 mM
------------------------------	------

Das o-Cresolphthalein Complexone (CPC) wurde in 300  $\mu\text{L}$   $\text{HCl}_{\text{conc}}$  gelöst und mit ddH<sub>2</sub>O auf 5 mL aufgefüllt. Für Versuche in artifiziellm Speichel wurden nach Lösen des o-Cresolphthalein Complexones in  $\text{HCl}_{\text{conc}}$  455 mM 8-Hydroxyquinolin zugegeben und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O auf 5 mL aufgefüllt.

#### **CPC-Mastermix**

o-Cresolphthalein Complexone (5 mM)	326 $\mu\text{L}$
2-Amino-2-methyl-1-propanol (150 mM)	4,3 mL
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 mL

Der CPC-Mastermix wurde täglich frisch angesetzt und dunkel gelagert.

**Molybdat-Reagenz (pH 5,0 mit HCl<sub>conc</sub>)**

Ammoniummolybdat	15 mM
Zinkacetat	100 mM

**10% Ascorbinsäure (pH 5,0 mit HCl<sub>conc</sub>)**

Ascorbinsäure	1 g/10 mL
---------------	-----------

Die Ascorbinsäurelösung wurde für die Versuche täglich frisch angesetzt.

### 2.3.5 Sonstige Puffer

**TBS-Puffer (pH 7,5 mit HCl<sub>conc</sub>) (Tris-buffered saline)**

Tris	50 mM
NaCl	150 mM

**PBS-Puffer (pH 7,4 mit HCl<sub>conc</sub>) (Phosphate-buffered saline)**

NaCl	140 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	10 mM
KCl	2,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM

## 2.4 Antibiotika

	<b>Stammlösung</b>	<b>Arbeitskonzentration</b>
<b>Ampicillin</b>	1 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	100 µg/mL
<b>Kanamycin</b>	0,5 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	25 µg/mL

## 2.5 Plasmide

	Vektor	Insert	Herkunft
pQE60-BM144	pQE60	40YaaD-CPL12-DewA-His <sub>6</sub>	BASF SE, Ludwigshafen, Deutschland
pQE60-BM145	pQE60	40aaYaaD-P <sub>11</sub> -4-DewA-His <sub>6</sub>	BASF SE, Ludwigshafen, Deutschland

## 2.6 *E. coli* Stämme

	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> XL1 blue	<i>endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15]hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)</i>	Agilent, USA
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sup>-</sup> m<sup>-</sup>) gal dcm λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5])</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Escherichia coli</i> C41 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> gal dcm (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)(DE3)</i> (weitere uncharakterisierte Mutationen)	Universität Hohenheim, Stuttgart
<i>Escherichia coli</i> C43 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> gal dcm (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)(DE3)</i> (weitere uncharakterisierte Mutationen)	Universität Hohenheim, Stuttgart
<i>Escherichia coli</i> M15 [pREP4]	<i>nal<sup>s</sup> str<sup>s</sup> rif<sup>s</sup> thi<sup>-</sup> lac<sup>-</sup> ara<sup>+</sup> gal<sup>+</sup> mtl<sup>-</sup> f recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup> lon<sup>+</sup></i>	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

## 2.7 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten QuikChange Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert, die Standard-Sequenzierungsprimer pQE-FP und pQE-RP wurden von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) bereitgestellt.

	Sequenz*	Funktion
MME_BM144_K47A_FP	5'-ccgcatgggcaaggcacagccgtatcaccc-3'	QuikChange Primer, Alaninmutation in BM 144
MME_BM144_K47A_RP	5'-gggtgatacggctgtgccttgcccatgcgg-3'	
MME_BM144_H51A_FP	5'-gaaacagccgtatgcccaacattccgcag-3'	QuikChange Primer, Alaninmutation in BM 144
MME_BM144_H51A_RP	5'-ctgcggaatggttggcgcatagcggctgttc-3'	
MME_BM144_KK46/7AA_FP	5'-ggccgcatggcgcgccagccgtatcaccc-3'	QuikChange Primer, Alaninmutation in BM 144
MME_BM144_KK46/7AA_RP	5'-gggtgatacggctgtgcccgcgccatgcggcc-3'	
MME_BM144_KK46/7AA_H51A_FP	5'-ggcacagccgtatgcccaacattccgcag-3'	QuikChange Primer, Alaninmutation in BM 144
MME_BM144_KK46/7AA_H51A_RP	5'-ctgcggaatggttggcgcatagcggctgtgc-3'	
MME_145_Q49A_FP	5'-gcatgggcaagaagcgcagcgttcgaatgg-3'	QuikChange Primer, Alaninscan BM 145
MME_145_Q49A_RP	5'-ccattcgaagcgtgcgctttcttgccatgc-3'	
MME_145_R51A_FP	5'-ggcaagaacagcagcgccttcgaatgggag-3'	QuikChange Primer, Alaninscan BM 145
MME_145_R51A_RP	5'-ctccattcgaaggcctgctgtttcttgcc-3'	
MME_145_F52A_FP	5'-gaaacagcagcgcgcgaatgggagtttg-3'	QuikChange Primer, Alaninscan BM 145
MME_145_F52A_RP	5'-caaacctccattcgcgcgctgctgtttc-3'	
MME_145_E53A_FP	5'-cagcagcgttcgcatgggagttgaac-3'	QuikChange Primer, Alaninscan BM 145
MME_145_E53A_RP	5'-gttcaaacctccatgcgaagcgtgctg-3'	
MME_145_W54A_FP	5'-gcagcgttcgaagcggagttgaacaacag-3'	QuikChange Primer, Alaninscan BM 145
MME_145_W54A_RP	5'-ctgttgttcaaacctcgccttcgaagcgtgc-3'	
MME_145_E55A_FP	5'-gcgcttcgaatggcgctttgaacaacaggg-3'	QuikChange Primer, Alaninscan BM 145
MME_145_E55A_RP	5'-ccctgttgttcaaacctccattcgaagcgc-3'	
MME_145_F56A_FP	5'-gcttcgaatgggagcgggaacaacagggc-3'	QuikChange Primer, Alaninscan BM 145
MME_145_F56A_RP	5'-gcctgttgttcgcctccattcgaagc-3'	
MME_145_E57A_FP	5'-cgaatgggagttt\underline>gcacaacagggcatgc-3'	QuikChange Primer, Alaninscan BM 145
MME_145_E57A_RP	5'-gcatccctgtgtgcaaacctccattcg-3'	
MME_145_QQ49/50AA_FP	5'-gcatgggcaagaagcggcgcttcgaatgg-3'	QuikChange Primer, Alaninscan BM 145
MME_145_QQ49/50AA_RP	5'-ccattcgaagcgcgcgctttcttgccatgc-3'	
MM_145_EE55/7AA_FP	5'-gcttcgaatggcgctttgcacaacagc-3'	QuikChange Primer, Alaninscan BM 145
MME_145_EE55/7AA_RP	5'-cctgttgcgaacgcccattcgaagc-3'	
MME_145_EEE52/5/7AAA_FP	5'-gcagcgttcgcatggcgctttgc-3'	QuikChange Primer, Alaninscan BM 145
MME_145_EEE52/5/7AAA_RP	5'-gcaaacgcccattcgaagcgtgc-3'	

## 2 Material & Methoden

	Sequenz*	Funktion
MME_145_F52AW54A_FP	5'- gaacagcagcgcgccgaagcggagtgtgaac-3'	QuikChange Primer, Alaninscan BM 145
MME_145_F52AW54A_RP	5'- gttcaactccgcttcggcgcgctgctgtttc-3'	
MME_145_F52/6AAW54A_FP	5'- gccgaagcggaggcgaacaacagggc-3'	QuikChange Primer, Alaninscan BM 145
MME_145_F52/6AAW54A_RP	5'- gccctgtgttcgcctccgcttcggc-3'	
MME_BM145_F60_FP	5'- gggagtgtgaacaacagttcggcatgcgcttc-3'	QuikChange Primer, Deletionmutation BM 145
MME_BM145_F60_RP	5'- gaagcgcgatgccgaactgttgttcaactccc-3'	
MME_BM145_Del_1_FP	5'- cgcatgggcaagaacagcgttcgaatggg-3'	QuikChange Primer, Deletionmutation BM 145
MME_BM145_Del_1_RP	5'- cccattcgaagcgtgtttcttgcccatgcg-3'	
MME_BM145_Del_2_FP	5'- cgcatgggcaagaacgcttcgaatggg-3'	QuikChange Primer, Deletionmutation BM 145
MME_BM145_Del_2_RP	5'- cccattcgaagcgtttcttgcccatgcg-3'	
MME_BM145_Del_3_FP	5'- cgaatgggagttgaagcgcgcttcacg-3'	QuikChange Primer, Deletionmutation BM 145
MME_BM145_Del_3_RP	5'- cgatgaagcgcgatccctcaactccattcg-3'	
MME_BM145_Del_4_FP	5'- cgcatgggcaagaattcgaatgggagttg-3'	QuikChange Primer, Deletionmutation BM 145
MME_BM145_Del_4_RP	5'- caaactccattcgaatttcttgcccatgcg-3'	
MME_BM145_Del_5_FP	5'- cgaatgggagttggcgcgcttcacg-3'	QuikChange Primer, Deletionmutation BM 145
MME_BM145_Del_5_RP	5'- cgatgaagcgcgatccaaactccattcg-3'	
MME_BM145_Del_6_FP	5'- gaaatcgaatgggagcgcgcttcacg-3'	QuikChange Primer, Deletionmutation BM 145
MME_BM145_Del_6_RP	5'- cgatgaagcgcgatccctccattcgaatttc-3'	
MME_BM145_Del_7_FP	5'- caagaaatcgaatgggagcgcgcttcacg-3'	QuikChange Primer, Deletionmutation BM 145
MME_BM145_Del_7_RP	5'- cgatgaagcgcgatccctccattcgaatttctg -3'	
MME_BM145_Del_8_FP	5'- gggcaagaatcgaagcgcgcttcacg -3'	QuikChange Primer, Deletionmutation BM 145
MME_BM145_Del_8_RP	5'- cgatgaagcgcgatccctcgaatttctgccc -3'	
MME_BM145_Del_9_FP	5'- cgcatgggcaagaagaatgggagtgtgaac-3'	QuikChange Primer, Deletionmutation BM 145
MME_BM145_Del_9_RP	5'- gttcaactccattcttcttgcccatgcg-3'	
MME_145-8_F49Y_FP	5'- gcatgggcaagaatacgaatgggagttg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_F49Y_RP	5'-caaactccattcgtatttcttgcccatgc -3'	
MME_145-8_W51Y_FP	5'-gcaagaatcgaatagttgaagcgcg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_W51Y_RP	5'- catgcctcaactcatattcgaatttctgc-3'	
MME_145-8_F53Y_FP	5'- gaaatcgaatgggagatgaagcgcg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_F53Y_RP	5'- gcgcgcttcatactccattcgaatttc-3'	
MME_145-8_F49S_FP	5'- gcatgggcaagaatccgaatgggagttg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_F49S_RP	5'- caaactccattcggatttcttgcccatgc -3'	
MME_145-8_W51S_FP	5'-gcaagaatcgaagcgcgagttgaagcgcg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_W51S_RP	5'-catgcctcaactgcgttcgaatttctgc-3'	
MME_145-8_F53S_FP	5'- gaaatcgaatgggagctgaagcgcg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_F53S_RP	5'- gcgcgcttcagactccattcgaatttc-3'	

## 2 Material & Methoden

	Sequenz*	Funktion
MME_145-8_F49H_FP	5'- gcatgggcaagaacacgaatgggagtttg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_F49H_RP	5'- caaactcccattcgtgtttcttgcccatgc -3'	
MME_145-8_W51H_FP	5'- gcaagaaattcgaacatgagtttgaaggcatg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_W51H_RP	5'- catgcctcaaactcatgttcaatttcttgc-3'	
MME_145-8_F53H_FP	5'- gaaattcgaatgggagcatgaaggcatg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_F53H_RP	5'- gcgcatgcctcatgctcccattcgaatttc-3'	
MME_145-8_F49R_FP	5'- gcatgggcaagaacgcgaatgggagtttg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_F49R_RP	5'- caaactcccattcgcgtttcttgcccatgc -3'	
MME_145-8_W51R_FP	5'- gcaagaaattcgaacgcgagtttgaaggcatg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_W51R_RP	5'- catgcctcaaactcgcgttcaatttcttgc-3'	
MME_145-8_F53R_FP	5'- gaaattcgaatgggagcgtgaaggcatg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_F53R_RP	5'- gcgcatgcctcagcgtcccattcgaatttc-3'	
MME_145-8_F49V_FP	5'- gcatgggcaagaagtgcgaatgggagtttg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_F49V_RP	5'- caaactcccattcgaactttcttgcccatgc -3'	
MME_145-8_W51V_FP	5'- gcaagaaattcgaagtggagtttgaaggcatg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_W51V_RP	5'- catgcctcaaactcacttcaatttcttgc-3'	
MME_145-8_F53V_FP	5'- gaaattcgaatgggaggtgaaggcatg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_F53V_RP	5'- gcgcatgcctccacctcccattcgaatttc-3'	
MME_145-8_E50D_FP	5'-gggcaagaattcgaatgggagtttgaaggc-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_E50D_RP	5'- gccttcaaactccaatcgaatttcttgc-3'	
MME_145-8_E52D_FP	5'-gcaagaaattcgaatgggagtttgaaggcatg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_E52D_RP	5'-catgcctcaaactcattcgaatttcttgc-3'	
MME_145-8_E54D_FP	5'-cgaatgggagtttgatggcatgcgcttcatcg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_E54D_RP	5'-cgatgaagcgcgcatgccatcaaaactcccattcg-3'	
MME_145-8_E50/2DD_FP	5'- gcaagaaattcgaatgggagtttgaaggcatg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_E50/2DD_RP	5'- catgcctcaaactccaatcgaatttcttgc-3'	
MME_145-8_E50/2/4DDD_FP	5'- cgattgggagtttgatggcatgcgcttcatcg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_E50/2/4DDD_RP	5'- cgatgaagcgcgcatgccatcaaaactcccattcg-3'	
MME_145-8_E50Q_FP	5'- gggcaagaattccagtgggagtttgaaggc-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_E50Q_RP	5'- gccttcaaactcccactggaatttcttgc-3'	
MME_145-8_E52Q_FP	5'- gcaagaaattcgaatggcagtttgaaggcatg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_E52Q_RP	5'-catgcctcaaactgccattcgaatttcttgc-3'	
MME_145-8_E54Q_FP	5' cgaatgggagtttcagggcatgcgcttcatcg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8
MME_145-8_E54Q_RP	5'- cgatgaagcgcgcatgccctgaaactcccattcg-3'	
MME_145_8_2_F49R_FP	5'- gcatgggcaagaacgcgattgggagtttg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8_DDD
MME_145_8_2_F49R_RP	5'- caaaatccaatcgcgtttcttgcccatgc-3'	

## 2 Material & Methoden

	Sequenz*	Funktion
MME_145_8_2_FWF/RRR_FP	5'- gcaagaaacgcgat <u>cgcgatcgt</u> gatggcatg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8_DDD
MME_145_8_2_FWF/RRR_RP	5'- catgccatcagcat <u>cgcgatcgcgtt</u> tcttctgc-3'	
MME_145_8_2_F49S_FP	5'- gcatgggcaagaaat <u>ccgattggg</u> attttg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8_DDD
MME_145_8_2_F49S_RP	5'- caaaatccaat <u>cggtt</u> tcttgcctatgc-3'	
MME_145_8_2_FF49/53SS_FP	5'- gaaatccgattgggatt <u>ctgatgg</u> catgcgc-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8_DDD
MME_145_8_2_FF49/53SS_RP	5'- gcgcatgccatcagaat <u>ccaatcg</u> gatttc-3'	
MME_145_8_2_FWF/SSS_FP	5'- gcaagaaatccgat <u>agcgattct</u> gatggcatg-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8_DDD
MME_145_8_2_FWF/SSS_RP	5'- catgccatcagaat <u>cgctatcg</u> gatttcttgc-3'	
MME_145_8_2_FWF/SRS_FP	5'- gaaatccgat <u>cgcgattct</u> gatggcatgcgc-3'	QuikChange Primer, fokussierte Bibliothek BM 145Δ8_DDD
MME_145_8_2_FWF/SRS_RP	5'- gcgcatgccatcagaat <u>cgcgatcg</u> gatttc-3'	
pQE-FP	5'-cggataacaatttcacag-3'	
pQE-RP	5'-gttctgaggtcattactgg-3'	Sequenzierungsprimer

\* einzuführende Mutationen sind unterstrichen

FP Forward-Primer

RP Reverse-Primer

## 2.8 Kits

Zymo<sup>TM</sup> Miniprep Kit

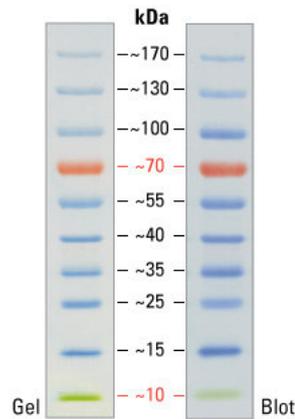
BCA Protein Assay Kit

Zymo Research, Freiburg, Deutschland

Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland

## 2.9 Molekulargewichtsstandard

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland



**Abbildung 2.1:** Molekulargewichtsstandard für die SDS-PAGE Analyse, PageRuler™ Prestained Protein Ladder. ([www.piercenet.com/product/pageruler – pretained – protein – ladder – 10 – 170k](http://www.piercenet.com/product/pageruler-pretained-protein-ladder-10-170k))

## 2.10 Proteine

BioMin Nr.	Name	Organismus	MW [kDa]
1-2	Amelogenin*	<i>Homo sapiens</i>	17,4
4-3	LRAP (Leucinreiches Amelogeninpolypeptid)*	<i>Homo sapiens</i>	8,5
7-2	Amelogenin-Hydrophobin*	<i>Homo sapiens / Aspergillus nidulans</i>	30,6
8-2-1	Amelogenin-Perlucin*	<i>Homo sapiens / Haliotis laevigata</i>	35,6
10	(Amelogenin $\Delta$ 42aaN-term. + $\Delta$ 17aaC-term.)-DewA*	<i>Homo sapiens / Aspergillus nidulans</i>	22,9
11-2	(Amelogenin: 23aa C-term.)-DewA*	<i>Homo sapiens / Aspergillus nidulans</i>	16,8
47	DMP1 Derivat (#64) <sup>79</sup> *	<i>Homo sapiens</i>	16,0
50-2	Carboanhydrase (CanA)*	<i>Myceliophthora thermophila</i>	27,2
60	Peptides out of MI tooth mousse (ohne CMC)	MI tooth mousse™	1,3
65	homemade Recaldent (Trypsin verdautes Casein) mit ACP	-	1,3
77-5	R5 <sup>80</sup> -Amelogenin*	<i>Homo sapiens</i>	19,4
78	(DSS) <sub>6</sub> <sup>35</sup>	synthetisch	1,8
79	#3-1 (LIKHLHRL) <sup>35</sup>	synthetisch	1,1

## 2 Material & Methoden

BioMin Nr.	Name	Organismus	MW [kDa]
92	YaaD-DewA*	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>Aspergillus nidulans</i>	47,0
93	40aaYaaD-DewA*	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>Aspergillus nidulans</i>	19,0
104-1	R5 <sup>80</sup> -40aaYaaD-DewA*	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>Aspergillus nidulans</i>	21,0
107	Amelogenin (M11A, P21A)*	<i>Homo sapiens</i>	17,0
113	VP1_100aa-StatherinDD*	Polyomavirus/ <i>Homo sapiens</i>	18,4
114	Statherinpeptid (unphosphoryliert)	synthetisch	2,5
115	Statherinpeptid (phosphoryliert)	synthetisch	2,3
144	40aaYaaD-CPL12 <sup>36</sup> -DewA*	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>Aspergillus nidulans</i>	20,7
145	40aaYaaD-P <sub>11</sub> -4 <sup>76</sup> -DewA*	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>Aspergillus nidulans</i>	21,8
146	40aaYaaD-HRC*	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>Homo sapiens</i>	22,1
163	CPL12 <sup>36</sup> -G2-BioMin107*	<i>Homo sapiens</i>	19,0
140	P <sub>11</sub> -4 <sup>76</sup> †	synthetisch	1,6

\* enthält C-terminal einen His<sub>6</sub>-Tag

† wurde nicht im Screening bewertet, sondern lediglich auf das Nukleationsverhalten in artifiziellem Speichel untersucht

## 2.11 Molekularbiologische Methoden

### 2.11.1 Ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange)

Für den Austausch oder Deletion einzelner Aminosäuren in BioMin 144 und BioMin 145 wurde die QuikChange Methode verwendet. Die hierfür verwendeten Primer sind unter 2.7 aufgeführt. Die einzuführenden Mutationen befinden sich in der Mitte der entworfenen Primer. Forward- und Reverse-Primer sind komplementär zueinander. Für die Einführung von Einzelmutationen diente das entsprechende Wildtyp-Plasmid (pQE60-BM144 bzw. pQE60-BM145) als Templat. Als Templat für die Einführung der Doppel- und Dreifachmutationen wurde das Plasmid mit bereits enthaltener Einzel- bzw. Doppelmutation verwendet. Der Ansatz und das Temperaturprogramm sind in Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4 aufgeführt.

Nach Ablauf der QuikChange wurde parentale DNA durch *DpnI* (5 U) für ca. 2 h bei 37 °C verdaut. 10 µL des Ansatzes wurden anschließend in chemisch-kompetente *E. coli* XL1 blue Zellen transformiert.

**Tabelle 2.3:** Zusammensetzung des QuikChange-Ansatzes.

Komponente	Endkonzentration	Volumen
10x Pfu Ultra <sup>TM</sup> II DNA-Polymerase Puffer	1x	5 µL
Primer FP	2 ng/µL	1 µL
Primer RP	2 ng/µL	1 µL
dNTP-Mix	50 µM	1 µL
Templat-DNA	ca. 100 ng	x µL
Pfu Ultra <sup>TM</sup> II Fusion HS DNA Polymerase		1 µL
ddH <sub>2</sub> O		ad 50 µL

**Tabelle 2.4:** PCR-Temperaturprotokoll.

Zahl der Zyklen	Temperatur	Zeit	Funktion
1	95 °C	2 min	Initiale Denaturierung
18	95 °C	2 min	Denaturierung
	50 °C	30 sec	Annealing
	72 °C	2 min	Elongation
1	72 °C	7 min	Finale Elongation
1	30 °C	∞	

### 2.11.2 Plasmidisolierung aus *E. coli* Zellen

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* XL1 blue Zellen wurde mit dem Zyppy<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Isolierung erfolgte aus einer 3 mL LB-Übernachtskultur der entsprechenden *E. coli* XL1 blue Zellen. Die Plasmid-DNA wurde in 30 – 40 µL ddH<sub>2</sub>O eluiert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde spektroskopisch bei 260 nm mit dem Nanodrop ermittelt.

### 2.11.3 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach dem Rubidiumchlorid-Protokoll. 100 mL vorgewärmtes LB-Medium, für *E. coli* M15 [pREP4] nach Zugabe von 25 µg/mL Kanamycin, wurden mit 200 µL einer entsprechenden Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C, 180 rpm kultiviert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4 °C), das Pellet in 30 mL eiskaltem TBF1-Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 4000 rpm, 4 °C) wurden die Zellen in 4 mL eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zu 120 µL aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

### 2.11.4 Hitzeschock-Transformation

Für die Transformation in chemisch-kompetente *E. coli* Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut und 100  $\mu\text{L}$  der kompetenten Zellen mit 10  $\mu\text{L}$  des QuikChange Ansatzes oder 1  $\mu\text{L}$  Plasmid-DNA versetzt. Nach 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C. Die Zellen wurden für 2 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  LB-Medium bei 37 °C, 350 rpm für 45 – 60 min inkubiert. 20, 50, 100 und 250  $\mu\text{L}$  der Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.11.5 Sequenzierung

Nach Transformation und folgender Plasmidisolierung wurden alle QuikChange Konstrukte bei der GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) unter Verwendung der Standard-Sequenzierungsprimer pQE-FP bzw. pQE-RP (siehe 2.7) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit EMBOSS Needle Alignment ausgewertet.

## 2.12 Proteinbiochemische Methoden

### 2.12.1 Expression der Mutanten von BioMin 144 und BioMin 145

Für die Expression der verschiedenen Mutanten von BioMin 144 (40aaYaaD-CPL12-DewA) wurden die *E. coli* Stämme BL21 (DE3), die C41 (DE3) und C43 (DE3) sowie M15 [pREP4] untersucht. Die Expression der Mutanten von BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11</sub>-4-DewA) wurde lediglich in *E. coli* M15 [pREP4] überprüft. Eine Vorkultur aus 3 mL EC3-Medium, versetzt mit 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin für die *E. coli* Stämme BL21 (DE3), C41 (DE3) und C43 (DE3), für *E. coli* M15 [pREP4] mit zusätzlich 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamycin, wurde mit einer Einzelkolonie frisch transformierter *E. coli* Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator kultiviert. Am Folgetag wurden für die Mutanten von BioMin 144 10 mL EC3-Medium in einem 100 mL Erlenmeyerkolben, für die Mutanten von BioMin 145 3 mL EC3-Medium in einem Reagenzglas, nach Zugabe der entsprechenden Antibiotika, mit der Vorkultur auf eine optische Dichte bei 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) von 0,5 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 180 rpm. Nach 90 min wurde mit 1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach weiteren 3 h bei 37 °C, 180 rpm wurde 1 mL der Kultur entnommen und für die

SDS-PAGE-Analyse verwendet. Für die *E. coli* Stämme BL21 (DE3), C41 (DE3) und C43 (DE3) erfolgte die Kultivierung nach Induktion außerdem bei 30 °C. Die entsprechenden Vorkulturen wurden bei 4 °C aufbewahrt. Die Expression wurde jeweils für zwei Klone jeder Mutante durchgeführt.

Die präparative Expression der Alaninmutanten von BioMin 144 (40aaYaaD-CPL12-DewA) sowie der Alanin- und Deletionsmutanten von BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11</sub>-4-DewA) erfolgte in 500 mL EC3-Medium in einem 2 L Erlenmeyerkolben mit Schikane. Die fokussierte Bibliothek von BioMin 145 wurde in 100 mL EC3-Medium in einem 500 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane exprimiert. 50 mL bzw. 10 mL EC3-Medium wurden mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit 20 µL der entsprechenden Vorkultur aus der Überprüfung der Expression angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C, 180 rpm inkubiert. Am Folgetag wurde die Hauptkultur nach Zugabe der entsprechenden Antibiotika auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 180 rpm. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 2,5 (etwa 2 h) wurde mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach weiteren 4 h bei 37 °C und 180 rpm wurden die Zellen geerntet. Die Kultur wurde bei 4 °C, 8000 rpm, 20 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Biofeuchtmasse des erhaltenen Pellets wurde bestimmt und das Pellet entweder direkt aufgeschlossen oder bei -20 °C gelagert.

### 2.12.2 Zellaufschluss und Renaturierung

Für den Zellaufschluss wurde das Pellet in TBS (Tris-buffered saline)-Puffer auf eine Endkonzentration von 20 %(w/v) resuspendiert und homogenisiert. Der Zellaufschluss erfolgte für die Alaninmutanten von BioMin 144 sowie für die Alanin- und Deletionsmutanten von BioMin 145 mittels eines Homogenisators. Die Zellen der fokussierten Bibliothek wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurden lösliche Proteine durch Zentrifugation (8000 rpm, 4 °C, 20 min) und einmaliges Waschen mit TBS-Puffer entfernt. Das erhaltene Pellet wurde anschließend in ddH<sub>2</sub>O auf eine Endkonzentration von 10 %(w/v) resuspendiert. Die Renaturierung des Zielproteins erfolgte durch langsames Zutropfen von 1 M NaOH<sub>aq</sub> auf eine Endkonzentration von 0,1 M. Nach 10 minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurde mit 2% iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf einen pH von 7,5 rücktitriert und ausgefallene Proteine durch Zentrifugation (8000 rpm, 4 °C, 20 min) entfernt. Der Überstand wurde weiter verwendet.

BioMin 144 und die entsprechenden Alaninmutanten wurden anschließend über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie (IMAC) aufgereinigt. Hierfür wurden die Proteinproben in einen Dialyseschlauch (Spectra/Por 1, MWCO = 6 - 8 kDa, Spectrum

## 2 Material & Methoden

Laboratories Inc., Los Angeles, USA) überführt und bei 4 °C für 4 h gegen das 100-fache Volumen an Bindepuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) dialysiert.

Für die Mutanten auf Basis von BioMin 145 erfolgte zunächst die Dialyse in 5 mM Tris pH 7,5. Anschließend wurde 1 M MgCl<sub>2</sub> auf eine Endkonzentration von 4,2 mM zugegeben und ein Verdau mit DNase I für 1 h bei Raumtemperatur angeschlossen, um vorhandene DNA zu entfernen. Proteinproben, die für Nukleationsexperimente verwendet werden sollten, wurden anschließend gegen 5 mM Tris-HCl pH 7,5 für zwei Tage dialysiert. Hierbei wurde der Puffer dreimal gewechselt. Proben für Bindungsversuche wurden über Nacht gegen 150 mM KPi pH 7,7 dialysiert.

### 2.12.3 Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatografie

Die Alaninmutanten auf Basis von BioMin 144 sowie der Wildtyp BioMin 144 wurden nach Renaturierung gemäß den Herstellerangaben über IMAC im Batchverfahren aufgereinigt.<sup>81</sup> Hierfür wurde 1 mL 50% Ni-NTA Agarose-Lösung (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) dreimal in 4 mL Bindepuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) gewaschen. Anschließend wurden 4 mL Proteinlösung zur Ni-NTA-Agarose gegeben und die Zielproteine für 1 h bei 4 °C unter leichtem Rotieren an die Matrix gebunden. Die Suspension wurde in eine leere Säule überführt und der Durchfluss gesammelt. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen wurde dreimal mit 4 mL Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Zielproteine wurden in 2 mL Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert. Die Proteinproben wurden anschließend gegen 5 mM Tris-HCl pH 7,5 für zwei Tage dialysiert. Der Puffer wurde zweimal gewechselt.

### 2.12.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> in alkalischer Lösung durch Proteine. Die entstandenen Cu<sup>+</sup>-Ionen bilden mit Bichinoinsäure (BCA) einen violetten Komplex, der bei 562 nm spektrometrisch detektiert werden kann. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte gemäß den Herstellerangaben im Mikrotiterplattenmaßstab. Die Messung der Absorption bei 562 nm wurde an einem Spektramax 340PC Mikrotiterplattenlesegerät (Molecular Devices GmbH, Biberach, Deutschland) durchgeführt. Zur Erstellung einer Standardgeraden wurde Bovins Serum Albumin in Konzentrationen von 0 mg/mL – 2 mg/mL verwendet.

### **2.12.5 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese) nach Laemmli<sup>1</sup>**

Für die Expressionsanalyse wurde 1 mL Zellkultur abzentrifugiert (1 min, 14 000 rpm) und 20 µL des erhaltenen Pellets mit 30 µL 2x SDS-Probenpuffer vermischt. Von den unterschiedlichen Aufarbeitungsschritten wurden jeweils ca. 10 µg für die SDS-PAGE Analyse verwendet. Die Proben wurden für 10 min bei 95 °C denaturiert, kurz abzentrifugiert und 10 µL über ein 15% iges SDS-Gel (Zusammensetzung siehe 2.3.2) aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder (siehe 2.9) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde in einer Hoefer SE 250 Elektrophoresekammer (Hoefer, San Francisco, CA, USA) bei 25 mA pro Gel durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung für etwa 2 h gefärbt und anschließend in Entfärbelösung entfärbt. Die Dokumentation wurde an einem Quantum ST 4 System (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland) durchgeführt.

## 2.13 Bindeversuche

### 2.13.1 Fluoreszenzmarkierung

Um die Bindung der verschiedenen Proteine an Hydroxylapatit zu untersuchen, wurden diese zunächst fluoreszenzmarkiert. Hierfür wurde der Farbstoff 5(6)-Carboxyfluorescein in Form des reaktiven Succinimidylesters (5(6)-FAM SE) verwendet. Durch Bildung einer Amidbindung erfolgt die Markierung an primären Amingruppen, dem N-Terminus des Proteins als auch an vorhandenen Lysinresten. Durch Wahl eines pH-Wertes bei ca. 7 kann die Reaktion mit Lysinresten größtenteils unterbunden werden.<sup>82</sup> Für die Markierung wurden 1 – 2 mg Protein in 1 mL 150 mM KPi pH 7,7 verwendet. Das Markierungsreagenz 5(6)-FAM SE wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Der Farbstoff wurde in 10-fachem Überschuss zur Proteinlösung getropft und das Reaktionsgemisch für 1 h bei 25 °C und 400 rpm in einem Eppendorf Themomixer inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Markierungsreagenz durch Zugabe von 1,5 M Hydroxylamin auf eine Endkonzentration von 0,15 M geblockt. Das Gemisch wurde für eine weitere Stunde bei 25 °C und 400 rpm inkubiert. Die markierten Proteine wurde über PD-10 Säulen (GE Healthcare, Dornstadt, Deutschland) mit einem MWCO = 5 kDa in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,0 umgepuffert und von geblocktem Farbstoff getrennt. Für Peptide erfolgte der Pufferwechsel über PD Midi Trap G-10 mit einem MWCO = 0,7 kDa (GE Healthcare, Dornstadt, Deutschland).

### 2.13.2 Proteinkonzentrations- und Markierungsgradbestimmung

Sowohl die Proteinkonzentration als auch der Markierungsgrad (Anzahl Farbstoff pro Proteinmolekül) wurden spektrometrisch bestimmt. Hierfür wurde die Absorption bei 280 nm für den Proteinanteil und bei 494 nm für den Farbstoff gemessen. Zur Berechnung der Absorption des Proteins wurde gemäß Formel 2.1 der Anteil des Farbstoffs bei 280 nm subtrahiert.

$$A_{Protein} = A_{280nm} - (CF \cdot A_{494nm}) \quad (2.1)$$

CF: Korrekturfaktor, CF(FAM) = 0,3

Der Markierungsgrad oder *Degree of Labeling* (D.O.L.) ergibt sich aus Formel 2.2. Die markierten Proteine wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

$$D.O.L. = \frac{A_{494nm} \cdot MW}{c(\text{Protein}) \cdot \varepsilon} \quad (2.2)$$

D.O.L.: *Degree of Labeling*

MW: Molekulargewicht des Proteins [g/mol]

$\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient,  $\varepsilon(\text{FAM}) = 68.000$

### 2.13.3 Bindeversuche an Hydroxylapatitpulver

Um die Bindung der unterschiedlichen Proteine an Hydroxylapatit zu beurteilen, wurden 2  $\mu\text{M}$  5(6)-FAM-markiertes Protein an 10 mg Hydroxylapatitpulver gebunden. Hierfür wurden 10 mg Hydroxylapatit in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße abgewogen, dreimal mit Bindepuffer gewaschen und mindestens 1 h bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken äquilibriert. Die Probe wurde abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das so vorbehandelte Hydroxylapatitpulver wurde in den Bindungsexperimenten eingesetzt. Zu dem Pulver wurde das fluoreszenzmarkiertes Protein in einer Endkonzentration von 2  $\mu\text{M}$  gegeben. Als Bindepuffer diente zum einen HBST-Puffer, zum anderen wurden zwei Mundwasserformulierungen A und B, die von der BASF SE zur Verfügung gestellt worden waren, als 50% ige Lösungen eingesetzt (Zusammensetzung siehe 2.3.3). Das Peptid  $\#3-1$  LIKHILHRL (BioMin 79), das als nicht-bindendes Peptid an Hydroxylapatit beschrieben wurde, diente als Negativkontrolle.<sup>35</sup> Aus MI tooth mousse<sup>TM</sup> extrahierte Peptide (BioMin 60) sowie das literaturbeschriebene (DSS)<sub>6</sub><sup>35</sup> (BioMin 78) wurden als Positivkontrollen verwendet. Die Bindung erfolgte für 2 h bei 37 °C unter Lichtausschluss und Rotation. Nicht gebundene Proteine wurden im Anschluss durch dreimaliges Waschen mit Bindepuffer entfernt. Der Überstand direkt nach der Bindung sowie die einzelnen Waschschrte wurden für die Quantifizierung durch Messung der Fluoreszenzintensität aufbewahrt, das Hydroxylapatitpulver wurde für Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop verwendet. Alle Bindeversuche wurden als Triplikate durchgeführt.

### 2.13.4 Messung der Fluoreszenzintensitäten

Zur Quantifizierung der Bindung der verschiedenen Proteine an Hydroxylapatit wurde die Fluoreszenzintensität aus den Überständen der Bindungsexperimente untersucht. Hierfür wurden zum einen der Fluostar Galaxy (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland), zum anderen der Polarstar Omega (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland) verwendet. Die Anregung erfolgte bei 485-12 nm, die Emission wurde bei 520 nm detektiert.

Durch Erstellen einer Eichgeraden wurde der lineare Messbereich ermittelt. Die zu messenden Proben wurden dem entsprechend verdünnt, so dass sich die Messwerte im linearen Bereich befanden. Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der detektierten Fluoreszenzintensität in der Probe vor ( $F_A$ ) und nach ( $F_E$ ) der Bindung (Formel 2.3).

$$c_{gebunden} = \left(1 - \frac{F_E}{F_A}\right) \cdot c_{Anfang} \quad (2.3)$$

### 2.13.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Bindung der untersuchten fluoreszenzmarkierten Proteine an Hydroxylapatit wurde außerdem mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 2000 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) unter Verwendung eines eGFP-Filters (EX470/40, EM525/50) visualisiert. Für die Untersuchungen wurde das Hydroxylapatitpulver aus den Bindungsversuchen in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 resuspendiert. Die Dokumentation erfolgte mit einer schwarz/weiß-Digitalkamera.

Das Hydroxylapatitpulver wurde weiterhin auf Autofluoreszenz bei den verwendeten Wellenlängen überprüft. Den schwarz/weiß-Fluoreszenz-Aufnahmen wurde nachträglich mit der Software ZEN (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ein grüner Kanal zugewiesen.

### 2.13.6 Bindung an menschliche Zahnschnitte

Neben der Bindung an Hydroxylapatitpulver wurde die Bindung der verschiedenen Proteine an menschliche Zahnschnitte untersucht. Hierfür wurden menschliche Backen- und Weisheitszähne verwendet. Die Zähne wurden dreimal in 70% igem Isopropanol gewaschen um eventuelle Rückstände zu entfernen. Die Lagerung erfolgte in PBS (Phosphate buffered saline)-Puffer mit 1% Euxyl K (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland). Die Anfertigung der Zahnschnitte wurde vom Institut für Mineralogie, Universität Stuttgart, durchgeführt. Die Zahnproben wurden in Hartwachs eingegossen, mit einem Mikrotom in ca. 10  $\mu\text{m}$  dünne Scheiben geschnitten und anschließend auf Objektträger aufgeklebt. Abschließend wurde die Oberfläche der Zahnschnitte abgeschliffen und poliert.

Die so präparierten Zahnschnitte wurden vor der Verwendung in Bindungsversuchen dreimal mit Mundwasser B gewaschen und für mindestens 1 h äquilibriert. Die Bindung der fluoreszenzmarkierten Proteine erfolgte wie in 2.13.3 für 2 h bei 37 °C, jedoch ohne Rotation. Bindungsversuche an Zahnschnitte wurden ausschließlich in 50% igem Mundwasser B durchgeführt. Das markierte Protein wurde in einer Endkonzentration von 2  $\mu\text{M}$  eingesetzt, das Endvolumen betrug 6 mL in einer 6 mm Petrischale. Nach Bindung

wurden die Zahnschnitte dreimal mit Mundwasser B und dreimal mit ddH<sub>2</sub>O abgespült. Die qualitative Analyse der Bindung erfolgte über Fluoreszenzmikroskopie (2.13.5).

## 2.14 Nukleationsversuche

### 2.14.1 Phosphatbestimmung

Vor Untersuchung der Nukleationsaktivität der einzelnen Proteinproben wurden diese auf eventuelle Phosphatrückstände überprüft. Die Bestimmung der Phosphatkonzentration in den verschiedenen Proben erfolgte nach Saheki *et al.*<sup>83</sup> Die Methode beruht auf der Reduktion eines Phosphomolybdat-Komplexes durch Ascorbinsäure in der Anwesenheit von Zn<sup>2+</sup>-Ionen. Der gebildete Chromophor besitzt sein Absorptionsmaximum bei 850 nm. Für die Ermittlung der Phosphatkonzentration in den Proteinlösungen wurden die Proben gemäß Tabelle 2.5 unter Verwendung des Molybdat-Reagenzes (15 mM Ammoniummolybdat, 100 mM Zinkacetat) in einem Endvolumen von 270 µL in einer 96 well-Mikrotiterplatte vorbereitet. Die Reduktion wurde durch die Zugabe der Ascorbinsäure gestartet und erfolgte bei 30 °C für 20 min. Die Absorption bei 850 nm wurde an einem Spektramax 340PC Mikrotiterplattenlesegerät (Molecular Devices GmbH, Biberach, Deutschland) gemessen. Durch Vergleich mit einer Standardgeraden im Bereich von 0 mM – 4 mM wurde die Phosphatkonzentration errechnet.

**Tabelle 2.5:** Ansatz zur Ermittlung der Phosphatkonzentration.

Komponente	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
Ammoniummolybdat	15 mM	11,1 mM	200 µL
Zinkacetat	100 mM	47 mM	
Ascorbinsäure	10 %	1,85 %	50 µL
Probe			20 µL
		Endvolumen	270 µL

### 2.14.2 Absorptionsmessung bei 820 nm

Um die Nukleationsaktivität der verschiedenen Proteine und Peptide beurteilen zu können wurde ein Nukleationsassay nach Gungormus *et al.* verwendet.<sup>84</sup> Die Bildung von Calciumphosphat wird dabei durch die Messung der entstehende Trübung bei 820 nm detektiert. Anstelle von  $\beta$ -Glycerolphosphat und einer alkalischen Phosphatase, wie von Gungormus *et al.* beschrieben, wurde in dieser Arbeit anorganisches Phosphat verwendet. Nach verschiedenen Vorversuchen wurden Konzentrationen von 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 für die Nukleationsexperimente festgelegt. Dabei entspricht das Verhältnis  $\text{Ca/P} = 1,67$  in der Nukleationslösung dem in Hydroxylapatit. Alle Lösungen wurden direkt vor dem Versuch steril filtriert (0,2  $\mu\text{m}$ ) um unkontrollierte Präzipitation durch Kontamination mit kleinen Partikeln zu vermeiden. In einer 96 well-Mikrotiterplatte wurden 25  $\mu\text{M}$  Protein und 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  vorgelegt und die Reaktion durch die Zugabe von 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$  gestartet. Das Endvolumen betrug 200  $\mu\text{L}$ . Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne Protein. Um Verdampfen zu verhindern wurde die Mikrotiterplatte mit einer selbstklebenden Folie abgeklebt. Der Ansatz wurde bei 37 °C über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Die Messung der Trübung der Nukleationslösung erfolgte innerhalb der ersten 8 h stündlich und nach 24 h bei 820 nm. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt.

### 2.14.3 Abnahme der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Als Alternative zur Messung der Absorption bei 820 nm wurde die Nukleationsaktivität durch die Abnahme der Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Nukleationslösung bewertet. Hierbei wird durch den Verbrauch an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Nukleationslösung auf die Bildung von Calciumphosphat rückgeschlossen. Dies bietet gegenüber der Messung der entstehenden Trübung bei 820 nm den Vorteil, dass falschpositive Ergebnisse durch eventuell ausgefallenes Protein unterbunden werden. Zur Ermittlung der  $c(\text{Ca}^{2+})$  in der Lösung wurde das Farbreagenz o-Cresolphthalein Complexone verwendet. Dieses bildet in alkalischer Lösung mit  $\text{Ca}^{2+}$  - Ionen einen violetten Komplex, der sein Absorptionsmaximum bei 575 nm besitzt. Für die Versuche in künstlichem Speichel wurde außerdem 8-Hydroxyquinolin zugesetzt, um vorhandene  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen zu maskieren.<sup>85</sup> Die Nukleationsversuche wurden zum einen in HEPES-Puffer wie unter 2.14.2 als auch in artifiziellem Speichel durchgeführt. Für den artifiziiellen Speichel wurde die Zusammensetzung nach Panich *et al.* gewählt, auf den Zusatz von Carboxymethylcellulose wurde jedoch verzichtet.<sup>78</sup> Für Versuche in artifiziellem Speichel wurden 25  $\mu\text{M}$  Protein und 100  $\mu\text{L}$  der 10x  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösung in einem 2 mL Eppendorfreaktionsgefäß vorgelegt und die Re-

## 2 Material & Methoden

aktion durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  der 10x Salzlösung gestartet. Für Versuche in HEPES wurden wie unter 2.14.2 beschrieben 25  $\mu\text{M}$  Protein und 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  vorgelegt, abschließend erfolgte die Zugabe von 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ . Das Endvolumen betrug in beiden Fällen 1 mL. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Protein. Die Ansätze wurden bei 37 °C in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Zu Beginn der Messung und jede weitere Stunde, bei Untersuchung der erstellten Mutanten auf Basis von BioMin 145 anfänglich alle 30 min, wurden 20  $\mu\text{L}$  Probe entnommen. Vor der Probenentnahme wurde der Ansatz durch Vortexen gemischt. Eventuell vorhandene Niederschlag wurde abzentrifugiert (3 min, 13500 rpm) und die Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$  in der Lösung bestimmt. Für die Ermittlung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde ein CPC-Mastermix (33  $\mu\text{M}$  o-Cresolphthalein Complexone, 3 mM 8-Hydroxyquinolin (für Versuche in artifiziellem Speichel), 21,74 mM 2-Amino-2-methyl-1-propanol) verwendet (Tabelle 2.6). Die spektroskopische Messung der Proben erfolgte in einer 96 well-Mikrotiterplatte in einem Endvolumen von 250  $\mu\text{L}$  bei 575 nm. Durch Abgleich mit einer Standardgeraden im Bereich von 0 mM – 0,6 mM wurde auf die Calciumkonzentration in der Nukleationslösung zurückgerechnet. Alle Nukleationsversuche wurden als Triplikate durchgeführt.

**Tabelle 2.6:** Ansatz zur Ermittlung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

Komponente	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
o-Cresolphthalein Complexone	33 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$	
8-Hydroxyquinolin*	3 mM	2,75 mM	230 $\mu\text{L}$
2-Amino-2-methyl-1-propanol	21,74 mM	20 mM	
Probe	-	-	20 $\mu\text{L}$
		Endvolumen	250 $\mu\text{L}$

\* bei Versuchen in artifiziellem Speichel enthalten

### 2.14.4 Nukleation mit Fluorid

Um den Einfluss von Fluorid auf die Nukleation zu untersuchen wurde der Verbrauch an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Lösung verfolgt (siehe 2.14.3). Versuche unter Zusatz von Fluorid wurden ausschließlich in artifiziellen Speichel durchgeführt. Nach Untersuchungen verschiedener Fluoridkonzentration wurde eine Endkonzentration von 250 ppm Fluorid gewählt. Diese entspricht der Konzentration von Fluorid in den meisten Mundspülungen. Die Experimente wurden als Triplikate durchgeführt.

## 2.15 Charakterisierung der gebildeten Präzipitate

### 2.15.1 Röntgenpulverdiffraktometrie

Die Charakterisierung des während der Nukleationsversuchen entstandenen Niederschlages erfolgte durch Röntgenpulverdiffraktometrie. Um ausreichend Material hierfür zu erhalten wurden die Ansätze auf ein Endvolumen von 30 mL für die Nukleation in HEPES-Puffer, auf 100 mL für die Nukleation in artifiziellm Speichel vergrößert. Die Reaktionslösungen wurden bei 37 °C für 4 h oder über Nacht inkubiert. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert (15 min, 4000 rpm) und fünfmal in  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen. Die Messung der Proben erfolgte an einem Röntgenpulverdiffraktometer Bruker D8 Advance im Institut für Mineralogie, Universität Stuttgart, mit  $\text{Cu\_K}_\alpha$  Radiation ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ) und einer Scangeschwindigkeit von  $0,005^\circ/\text{step}$  im Bereich von  $2\theta=24^\circ - 67^\circ$ .

### 2.15.2 Transmissionselektronen-Mikroskopie

Die Morphologie der entstandenen Kristalle wurde mittels Transmissionselektronen-Mikroskopie (TEM) analysiert. Für die TEM-Untersuchungen wurden die Nukleationsansätze (siehe 2.14.3) nach 4 h oder über Nacht abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde fünfmal in  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen und in  $\text{ddH}_2\text{O}$  resuspendiert. 5  $\mu\text{L}$  Probe wurden auf ein Formvar/Carbon beschichtetes Cu 100mesh TEM Grid (Plano, Wetzlar, Deutschland) aufgetragen und luftgetrocknet. Die Messungen wurden an einem Tecnai G2 Sphera Transmissionselektronen-Mikroskop, Biologisches Institut, Universität Stuttgart, bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV durchgeführt.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Screening

### 3.1.1 Bindungsversuche

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung von Proteinen für den Einsatz in *oral care* Produkten. Hierfür wurden von der BASF SE, Ludwigshafen, 24 unterschiedliche Proteine zu Verfügung gestellt. Es wurden neun Amelogeninderivate, drei Statherinderivate, fünf Hydrophobin-Fusionskonstrukte sowie sieben weitere Proteine und Peptide untersucht (siehe 2.10). Die Identifikation Hydroxylapatit-bindender Proteine ist dabei der erste Schritt um eine gerichtete Zahnmineralisierung zu ermöglichen. Für die Untersuchung der Bindefähigkeit der einzelnen Proteine wurden diese wie unter 2.13.1 beschrieben mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5(6)-Carboxyfluorescein N-terminal markiert. Nach der photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration sowie des Markierungsgrades (siehe 2.13.2) wurde das Bindeverhalten der unterschiedlichen Proteine an Hydroxylapatit bewertet. Die Bindeversuche wurden dabei zum einen in HBST-Puffer durchgeführt, um eine prinzipielle Bindung an Hydroxylapatit zu untersuchen. Um, in Hinblick auf die spätere Anwendung, die Versuchsbedingungen relevanter zu gestalten, wurde zum anderen die Bindung in zwei Mundwasserformulierungen getestet (Zusammensetzung siehe 2.3.3). Beide Formulierungen besitzen größtenteils dieselbe Zusammensetzung, unterscheiden sich jedoch im enthaltenen Detergenz. Mundwasser A enthält 1 %(w/v) Polysorbat 20, Mundwasser B 1 %(w/v) Poloxamer 407. Da bei ersten Versuchen in 100% igem Mundwasser nur sehr geringe Mengen an gebundenem Protein nachgewiesen werden konnten, wurde für diese Versuche 50% iges Mundwasser verwendet. Dies entspricht in etwa der Verdünnung durch den Speichel im Mundraum.

#### 3.1.1.1 Bindungsversuche an Hydroxylapatitpulver

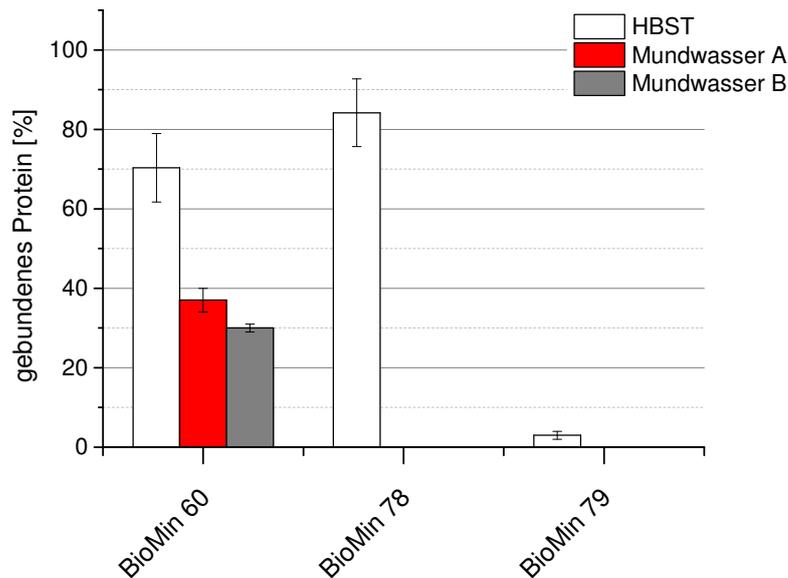
Zur Bewertung des Bindeverhaltens der unter 2.10 aufgeführten Proteine wurden diese nach Fluoreszenzmarkierung an Hydroxylapatitpulver (Fluka) gebunden. Nach Waschen und Äquilibrieren des Targets erfolgte die Bindung von 2  $\mu\text{M}$  Protein an 10 mg Target für 2 h bei 37 °C (siehe 2.13.3). Alle Bindeversuche wurden sowohl in HBST-Puffer als auch in 50% igem Mundwasser durchgeführt. Die quantitative Bewertung erfolgte durch Messung der Restfluoreszenz im Überstand direkt nach der Bindung und den einzelnen Waschschrritten (siehe 2.13.4). Durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten vor und nach der Bindung wurde auf den Anteil an gebundenem Protein zurückgerechnet. Gebundene Proteine wurden außerdem durch Fluoreszenzmikroskopie qualitativ nachgewiesen. Beispielhaft sind in diesem Abschnitt die entsprechenden Fluoreszenzbilder für die Bindung der Kontrollen aufgeführt.

##### 3.1.1.1.1 Kontrollen

Als Positivkontrolle in den Bindeversuchen wurde zum einen das Peptid (DSS)<sub>6</sub> (BioMin 78) eingesetzt. Dieses Peptid wurde aufgrund der aktiven Sequenz des Dentinphosphoproteins entworfen und in der Literatur als Hydroxylapatit-Binder beschrieben.<sup>35</sup> Als weitere Positivkontrolle dienten aus kommerziell erhältlichen MI tooth mousse<sup>TM</sup> extrahierte Peptide (BioMin 60). Diese Peptide wurden durch Trypsin-Verdau des Milchproteins Casein erhalten.<sup>21</sup> Als Negativkontrolle wurde das in der Literatur als Hydroxylapatit-nichtbindend beschriebene Peptid #3-1 (LIKHILHRL) eingesetzt.<sup>35</sup>

In den Bindungsversuchen konnte für die Positivkontrollen BioMin 60 und BioMin 78 eine deutliche Bindung an Hydroxylapatitpulver in HBST-Puffer nachgewiesen werden (Diagramm 3.1). Für BioMin 60 lag der Anteil an gebundenem Peptid bei 70 ( $\pm 8$ )%, für BioMin 78 bei 84 ( $\pm 8$ )%. Für die Negativkontrolle #3-1 (BioMin79) wurde lediglich eine unspezifische Bindung von unter 5% gebundenem Peptid nachgewiesen. Bei Versuchen in 50% igem Mundwasserformulierungen konnte für BioMin 60 eine deutliche Bindung mit 37 ( $\pm 3$ )% an gebundenem Peptid in Mundwasser A und 30 ( $\pm 1$ )% in Mundwasser B detektiert werden. Für BioMin 78 und BioMin 79 konnte weder in Mundwasser A noch in B eine Bindung nachgewiesen werden.

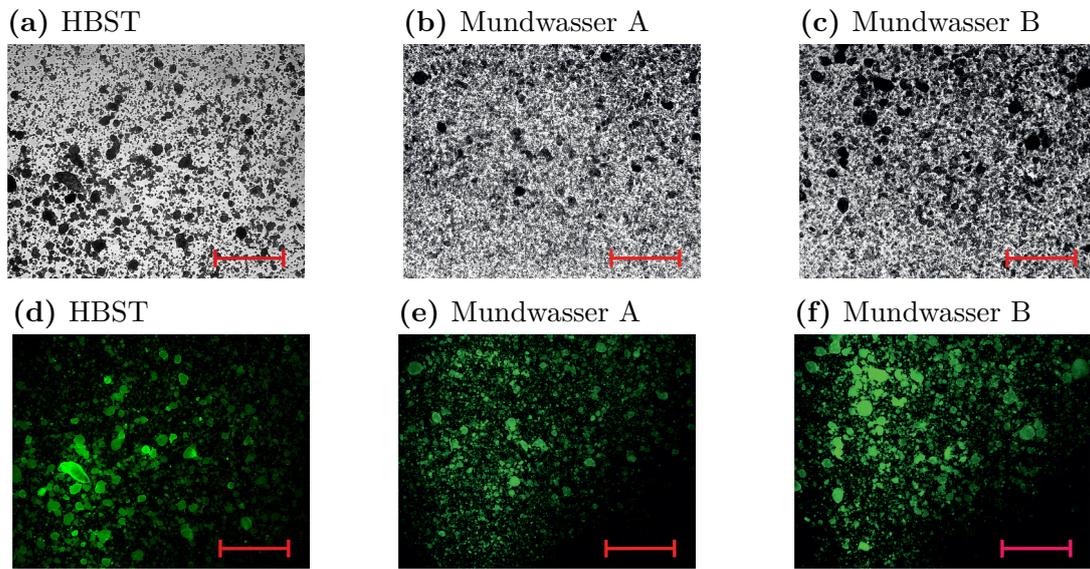
### 3 Ergebnisse



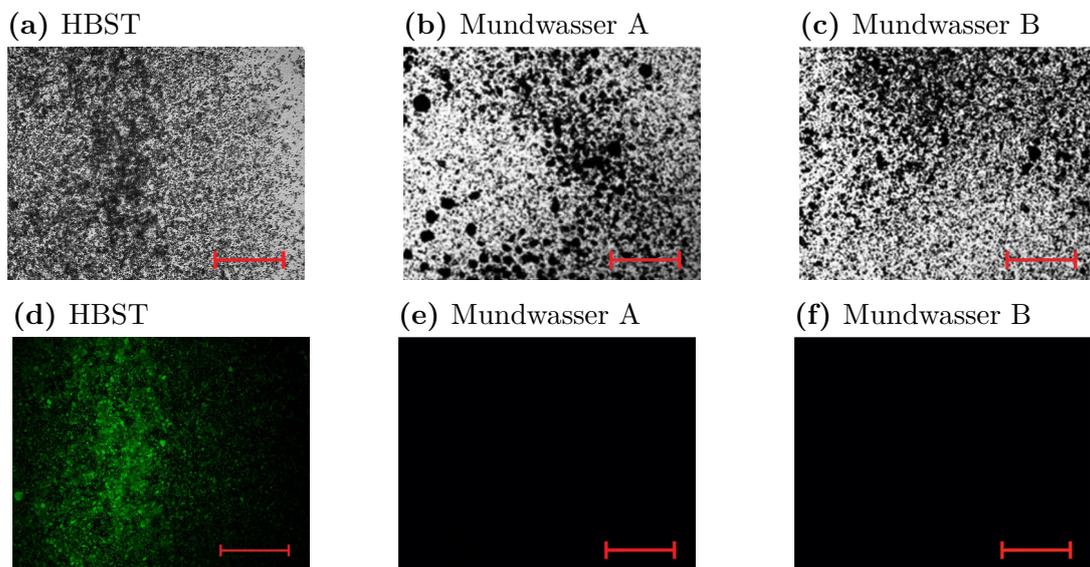
**Diagramm 3.1:** Zusammenfassung der Bindung der verwendeten Kontrollen an 10 mg Hydroxylapatit in HBST-Puffer (weiß), 50% igem Mundwasser A (rot) und 50% igem Mundwasser B (grau). BioMin 60 = Peptide extrahiert aus MI tooth mousse<sup>TM</sup>, BioMin 78 = (DSS)<sub>6</sub>, BioMin 79 = Peptid #3-1.

Wie unter 2.13.5 beschrieben wurden die quantitativen Bindungsergebnisse durch Fluoreszenzmikroskopie bestätigt. Durch grüne Fluoreszenz an den verwendeten Hydroxylapatitpartikeln wird eine erfolgreiche Bindung der markierten Proteine angezeigt. Für die Positivkontrolle BioMin 60 konnte sowohl in HBST-Puffer als auch in den beiden Mundwasserformulierungen A und B auf diese Weise eine Bindung an Hydroxylapatit nachgewiesen werden (Abbildung 3.1). Wie ein Vergleich der unterschiedlichen Fluoreszenzbilder zeigt, lassen sich mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie keine quantitativen Aussagen über den Anteil an gebundenem Protein machen. Dies dient lediglich der qualitativen Überprüfung der Fluoreszenzintensitätsmessungen. Für das Peptid (DSS)<sub>6</sub> wurde in HBST-Puffer ebenfalls eine deutliche Bindung beobachtet. Die Fluoreszenzbilder in Abbildung 3.2 zeigen deutlich, dass kein gebundenes Peptid in den Mundwasserformulierungen an Hydroxylapatit nachgewiesen werden konnte und bestätigen somit die Ergebnisse der quantitativen Fluoreszenzintensitätsmessungen. Wie Abbildung 3.3 zeigt, konnte für die Negativkontrolle Peptid #331 weder in HBST-Puffer noch in den beiden Mundwasserformulierungen eine Bindung nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den quantitativen Messungen der Fluoreszenzintensität überein.

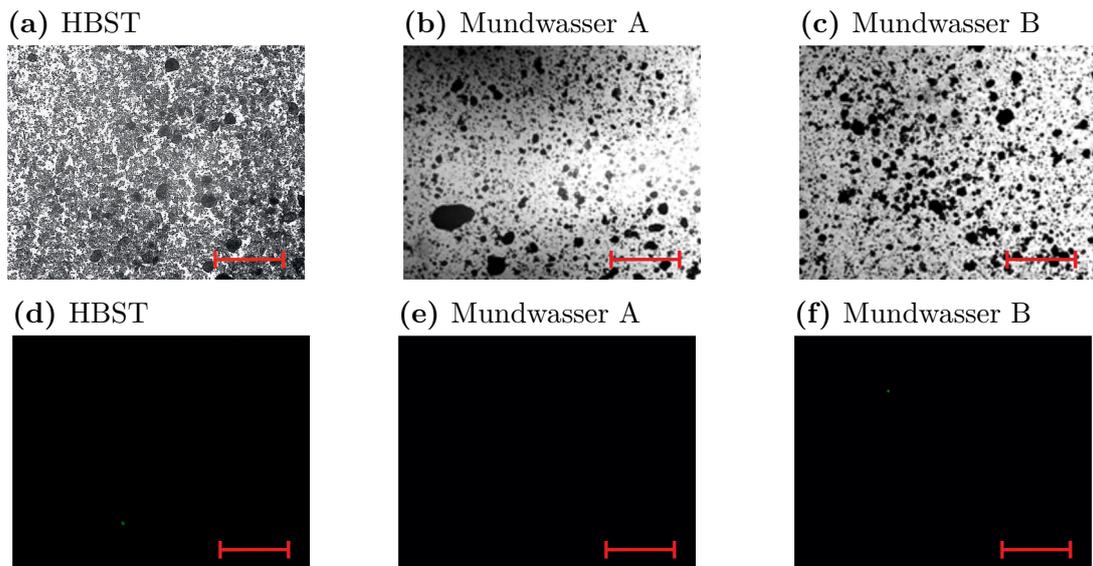
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.1:** Mikroskopiebilder nach der Bindung von 2  $\mu\text{M}$  BioMin 60 an 10 mg Hydroxylapatit in (a/d) HBST, (b/e) Mundwasser A und (c/f) Mundwasser B. (a)-(c) zeigen die Durchlichtbilder, (d)-(f) die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen. Der rote Balken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.2:** Mikroskopiebilder nach der Bindung von 2  $\mu\text{M}$  BioMin 78 an 10 mg Hydroxylapatit in (a/d) HBST, (b/e) Mundwasser A und (c/f) Mundwasser B. (a)-(c) zeigen die Durchlichtbilder, (d)-(f) die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen. Der rote Balken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .



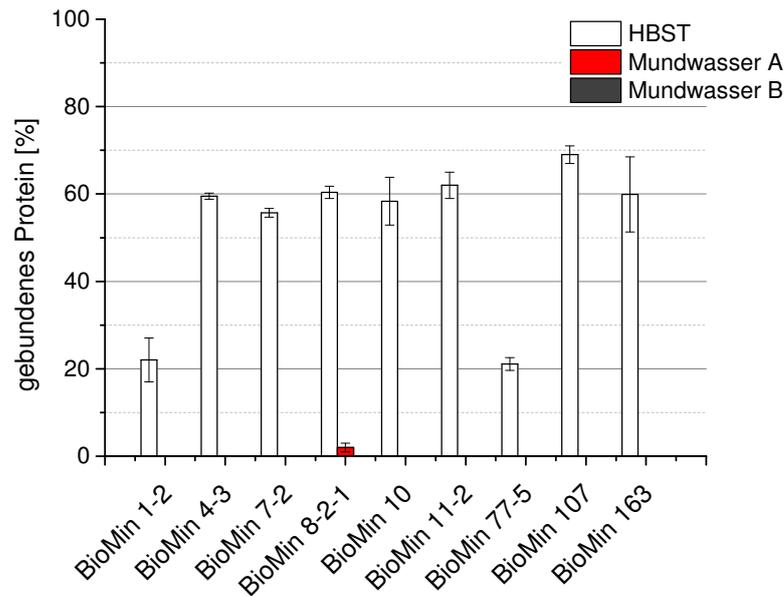
**Abbildung 3.3:** Mikroskopiebilder nach der Bindung von 2 µM BioMin 79 an 10 mg Hydroxylapatit in (a/d) HBST, (b/e) Mundwasser A und (c/f) Mundwasser B. (a)-(c) zeigen die Durchlichtbilder, (d)-(f) die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen. Der rote Balken entspricht 200 µm.

### 3.1.1.1.2 Amelogenin und Amelogeninderivate

Amelogenin ist das mengenmäßig wichtigste extrazelluläre Matrix-Protein während der Amelogenese, dem Aufbau des Zahnschmelzes.<sup>40</sup> Nach *self-assembly* des Proteins dient es als Templat für die Bildung und das Wachstum der Hydroxylapatitkristalle. Durch spezifische Bindung an die kristallografische (100)-Fläche des wachsenden Kristalls steuert es außerdem dessen Morphologie.

In dieser Arbeit wurden neun Amelogeninderivate untersucht. Neben dem *full length* Amelogenin wurde auch die natürliche *splicing* Variante LRAP (**L**euclin**r**eiches **A**melogenin**p**oly**p**eptid) und ein Alaninvariante bewertet. Außerdem wurden verschiedene Fusionskonstrukte untersucht. Die Kombination des *full length* Amelogenins an Perlucin aus *H. laevigata*, an das Hydrophobin DewA aus *A. nidulans*, sowie an das TiO<sub>2</sub> mineralisierende 19mer Peptid R5 (SSKKSGSYSGSKGSKRRIL)<sup>80</sup> wurden auf ihre Bindungseigenschaften hin bewertet. Des weiteren wurden zwei Fusionskonstrukte aus verkürzten Varianten des Amelogenins an das Hydrophobin DewA untersucht. Zum einen wurde der hydrophoben Mittelteil ( $\Delta 42$ aa N-term. +  $\Delta 17$ aa C-term.), zum anderen der hydrophile, negativ geladene C-terminalen Bereich (23aa C-term.) des Amelogenins mit dem Hydrophobin DewA kombiniert. Das Fusionskonstrukt aus der Alaninvariante (M11A, P21A) des Amelogenins mit dem Hydroxylapatit mineralisierendem Peptid CPL12 (QPYHPTIPQSVH)<sup>86</sup> wurde ebenfalls bewertet.

### 3 Ergebnisse



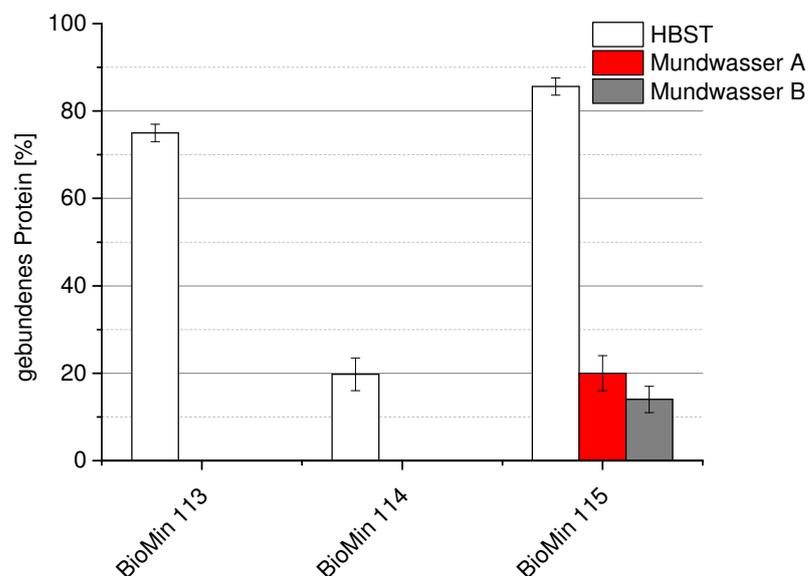
**Diagramm 3.2:** Zusammenfassung der Bindung der verschiedenen Amelogeninderivate an 10 mg Hydroxylapatit in HBST-Puffer (weiß), 50% igem Mundwasser A (rot) und 50% igem Mundwasser B (grau). BioMin 1-2: *full length* Amelogenin, BioMin 4-3: LRAP, BioMin 7-2: Amelogenin-DewA, BioMin 8-2-1: Amelogenin-Perlucin, BioMin 10: (Amelogenin $\Delta$ 42aa N-term.+ $\Delta$ 17aa C-term.)-DewA, BioMin 11-2: (Amelogenin: 23aa C-term.)-DewA, BioMin 77-5: R5-Amelogenin, BioMin 107: Amelogenin (M11A, P21A), BioMin 163: CPL12-Amelogenin (M11A, P21A).

Wie Diagramm 3.2 zeigt, lässt sich lediglich für die Experimente in HBST-Puffer eine Bindung für die Amelogeninderivate an Hydroxylapatit nachweisen. Dabei zeigten das *full length* Amelogenin (BioMin 1-2) und das Fusionskonstrukt R5-Amelogenin (BioMin 77-5) eine mäßige Bindung im Bereich von 25%. Für die Variante LRAP (BioMin 4-3), bestehend aus der N- sowie C-terminalen Region des Amelogenins, und das Fusionsprodukt BioMin 8-2-1 (Amelogenin-Perlucin) konnten Bindungsraten von ca. 60% detektiert werden. Durch Fusion des *full length* Amelogenin (BioMin 7-2) sowie der verkürzten Varianten Amelogenin  $\Delta$ 42aa N-term. +  $\Delta$ 17aa C-term. (BioMin 10) und Amelogenin: 23aa C-term. (BioMin 11-2) an das Hydrophobin DewA wurde ebenfalls eine Bindung im Bereich von 60% detektiert. Die Alaninvariante M11A, P21A (BioMin 107) zeigte in HBST-Puffer das beste Ergebnis mit einem gebundenen Proteinanteil von 70 ( $\pm$ 2)%. Die Bindefähigkeit von BioMin 107 konnte durch die N-terminale Fusion des Hydroxylapatit-bindenden 12mer CPL12<sup>86</sup> (BioMin 163) nicht weiter gesteigert werden, für dieses Konstrukt konnten lediglich 60 ( $\pm$ 8)% gebundenes Protein nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der Bindungsergebnisse in den Mundwasserformulierungen konnte für das Fusionskonstrukt Amelogenin-Perlucin (BioMin 8-2-1) ein geringer Anteil an gebundenem Protein in der Mundwasserformulierung A nachgewiesen werden (2 ( $\pm$ 2)%). In Mundwasser B wurde für keines der untersuchten Amelogeinderivate eine Bindung detektiert.

### 3.1.1.1.3 Statherinderivate

Statherin gehört zu den Speichelproteinen und besitzt einen hohen Anteil an negativ geladenen Aminosäuren wie Aspartat, Glutamat und Phosphoserin. Aufgrund seiner Ladung zeigt Statherin eine hohe Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und ist für die Stabilisierung dieser im Speichel mitverantwortlich.<sup>48,49</sup> In dieser Arbeit wurden insgesamt drei Statherinvarianten auf ihr Bindevverhalten gegenüber Hydroxylapatit untersucht. BioMin 113 ist ein Fusionskonstrukt aus dem Viralen Capsid Protein 1 (VP1) aus dem Polyomavirus und Statherin. Die Peptide BioMin 114 und 115 bestehen aus den 21 N-terminalen Aminosäuren des Statherins (DSSEKFLRRIGRFGYGYGPY). In BioMin 115 sind außerdem alle vorhandenen Serinreste phosphoryliert, BioMin 114 stellt die unphosphorylierte Variante dar.

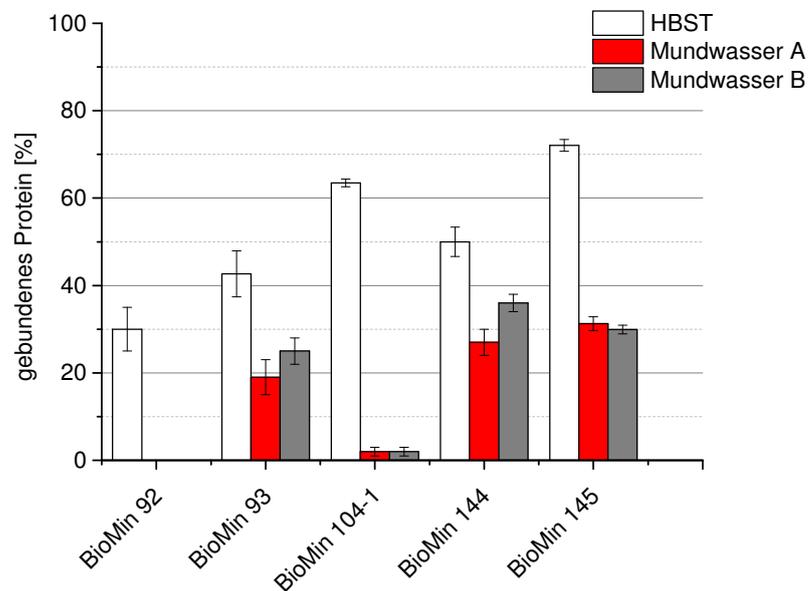
Bei Betrachtung der Bindungsergebnisse (Diagramm 3.3) weist die unphosphorylierte Variante BioMin 114 die geringste Bindung mit 20 ( $\pm 4$ )% gebundenem Peptid an Hydroxylapatit in HBST-Puffer auf. BioMin 113 sowie das phosphorylierte Statherinpeptid (BioMin 115) weisen beide hohe Binderaten mit 75 ( $\pm 2$ ) bzw. 85 ( $\pm 2$ )% auf. In den Mundwasserformulierungen behält nur die phosphorylierte Variante des Statherinpeptides (BioMin 115) die Bindefähigkeit. In Mundwasser A konnten 20 ( $\pm 4$ )%, in Mundwasser B 14 ( $\pm 3$ )% an gebundenem Peptid an Hydroxylapatit nachgewiesen werden. Für BioMin 113 und das unphosphorylierte Statherinpeptid (BioMin 114) konnte in den Mundwasserformulierungen keine Bindung nachgewiesen werden.



**Diagramm 3.3:** Zusammenfassung der Bindung der untersuchten Statherinderivate an 10 mg Hydroxylapatit in HBST-Puffer (weiß), 50% igem Mundwasser A (rot) und 50% igem Mundwasser B (grau). BioMin 113: VP1\_100aa-Statherin, BioMin 114: Statherinpeptid (unphosphoryliert), BioMin 115: Statherinpeptid (phosphoryliert).

## 3.1.1.1.4 Hydrophobine

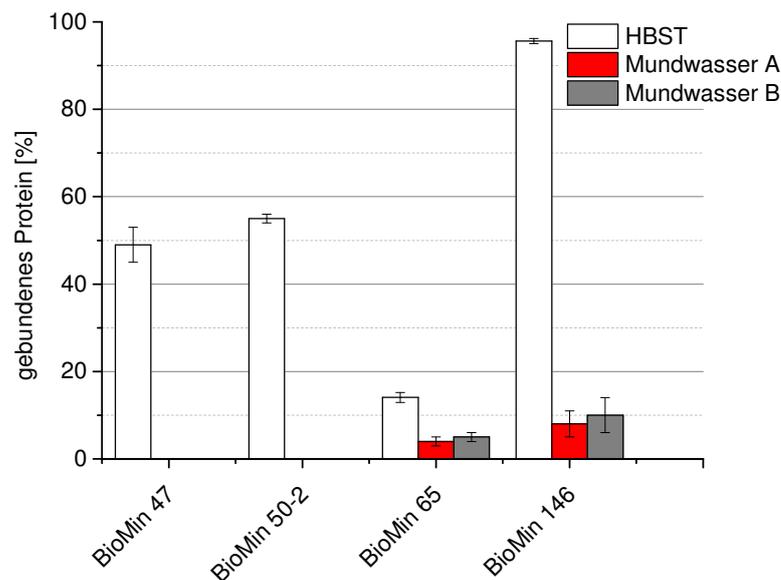
Neben den Amelogenin-Hydrophobin-Konstrukten BioMin 10 und BioMin 11-2, die bereits unter 3.1.1.1.2 behandelt worden sind, wurden fünf weitere Fusionskonstrukte an das Hydrophobin DewA aus *A. nidulans* untersucht (Diagramm 3.4). Die Konstrukte mit der Synthase YaaD aus *B. subtilis* BioMin 92 (YaaD-DewA) und BioMin 93 (40aaYaaD-DewA) zeigten eine mäßige Bindungsrate von 30 ( $\pm 5$ )% bzw. 43 ( $\pm 5$ )% in HBST-Puffer. Durch Fusion der Peptide R5<sup>80</sup> (BioMin 104), CPL12<sup>86</sup> (BioMin 144) und P<sub>11</sub>-4<sup>76</sup> (BioMin 145) an BioMin 93 konnte Bindung bis auf 72 ( $\pm 2$ )% für BioMin 145 gesteigert werden. Bei Betrachtung der Bindungsergebnisse in den Mundwasserformulierungen verlor lediglich BioMin 92, bestehend aus der *full length* Synthase YaaD und dem Hydrophobin DewA, seine Bindefähigkeit. Die verkürzte Variante BioMin 93 (40aaYaaD-DewA) hingegen zeigte eine Bindung von 19 ( $\pm 4$ )% bzw. 25 ( $\pm 3$ )%. Durch Fusion des TiO<sub>2</sub> mineralisierende Peptides R5<sup>80</sup> wurde die Bindefähigkeit auf 2 ( $\pm 1$ )% erniedrigt. Im Gegensatz dazu konnte durch Fusion der Hydroxylapatit-bindenden Peptide CPL12<sup>36</sup> in BioMin 144 und P<sub>11</sub>-4<sup>76</sup> in BioMin 145 die Bindung auf 27 - 36% weiter erhöht werden. Beide Konstrukte zeigten damit eine Bindefähigkeit an Hydroxylapatit, die vergleichbar mit der der Positivkontrolle BioMin 60 ist (Diagramm 3.1).



**Diagramm 3.4:** Zusammenfassung der Bindung der untersuchten DewA-Fusionskonstrukte an 10 mg Hydroxylapatit in HBST-Puffer (weiß), 50% igem Mundwasser A (rot) und 50% igem Mundwasser B (grau). BioMin 92: YaaD-DewA, BioMin 93: 40aaYaaD-DewA, BioMin 104-1: R5-40aaYaaD-DewA, BioMin 144: 40aaYaaD-CPL12-DewA, BioMin 145: 40aaYaaD-P<sub>11</sub>-4-DewA.

## 3.1.1.1.5 Weitere Proteine

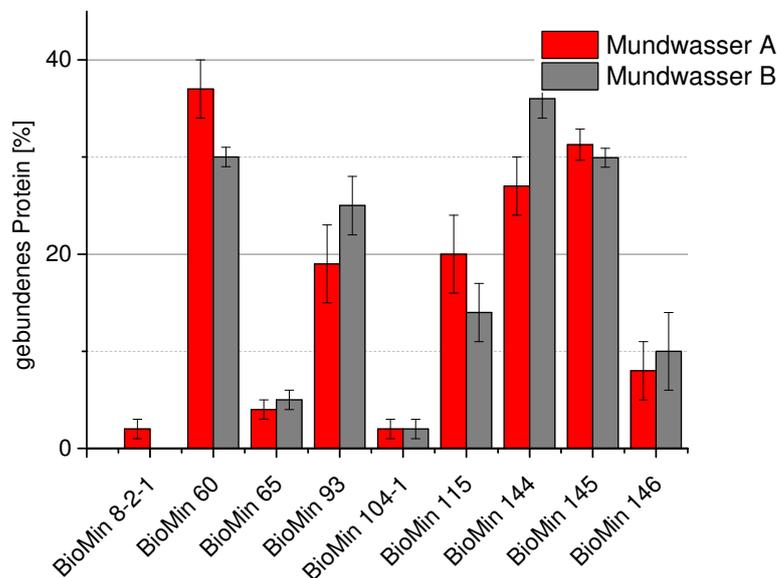
Neben den bisher beschriebenen Proteinen wurden noch vier weitere Proteine untersucht. Die Carboanhydrase CanA aus *M. thermophila* (BioMin 50-2), das Derivat #64 des Dentin-Matrix-Protein 1 (DMP1), das von Tsuji *et al.* beschrieben wurde (BioMin 47),<sup>79</sup> das HRC (Histidin-reiches Calcium bindendes Protein) (BioMin 146) und ein dem MI tooth mousse<sup>TM</sup> entsprechenden Peptidgemisch (BioMin 65). Dieses sogenannte *homemade Recaldent* wurde bei der BASF SE durch tryptischen Verdau des Milchproteins Casein hergestellt. Wie in Diagramm 3.5 abgebildet weisen BioMin 47 und BioMin 50-2 gute Binderaten von ca. 50% in HBST-Puffer auf. Für das *homemade Recaldent* konnten in HBST-Puffer lediglich 14 ( $\pm 1$ )% gebundenes Peptid nachgewiesen werden. BioMin 146 zeigte sehr gute Bindeeigenschaften an Hydroxylapatit in HBST-Puffer mit 95 ( $\pm 2$ )%. In den Mundwasserformulierungen konnte für BioMin 47 und BioMin 50-2 keine Bindung nachgewiesen werden. BioMin 65 zeigte eine geringe Bindung (4 ( $\pm 1$ )% bzw. 5 ( $\pm 1$ )%) und für BioMin 146 wurden mäßige Binderaten mit 8 ( $\pm 3$ )% in Mundwasser A und 10 ( $\pm 4$ )% in Mundwasser B gefunden.



**Diagramm 3.5:** Zusammenfassung der Bindung an 10 mg Hydroxylapatit in HBST-Puffer (weiß), 50% igem Mundwasser A (rot) und 50% igem Mundwasser B (grau) von BioMin 47: DMP1 Derivat (#64), BioMin 50-2: CanA, BioMin 65: Casein nach Trypsinverdau (homemade Recaldent), BioMin 146: Histidin-reiches Calcium bindendes Protein (HRC).

### 3.1.1.1.6 Zusammenfassung der Bindung an Hydroxylapatitpulver

Insgesamt wurden 24 unterschiedliche Proteine auf ihr Bindevverhalten gegenüber Hydroxylapatitpulver untersucht. Für den Großteil dieser Proteine konnten gute Binderaten von über 50% an gebundenem Protein an Hydroxylapatit in HBST-Puffer nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.1). Mit über 70% gebundenem Protein erwiesen sich die Positivkontrollen BioMin 60 (Recaldent) und BioMin 78 (DSS<sub>6</sub>), die Statherinkonstrukte BioMin 113 (VP1-Statherin), BioMin 115 (phosphor. Statherinpeptid), das Hydrophobinkonstrukt BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11</sub>-4-DewA) und das Histidin-reiche Calcium-bindende Protein (BioMin 146) als quantitativ beste Binder. In den Bindungsexperimenten, die in den beiden Mundwasserformulierungen durchgeführt worden waren, wurden lediglich neun Binder identifiziert (Diagramm 3.6). Von diesen neun Proteinen zeigten BioMin 8-2-1, BioMin 65, BioMin 104-1 und BioMin 146 geringe Binderaten mit weniger als 10%. BioMin 60 (Recaldent), BioMin 93 (40aaYaaD-DewA), BioMin 115 (phosphoryliertes Statherinpeptid), BioMin 144 (40aaYaaD-CPL12-DewA) und BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11</sub>-4-DewA) wiesen mit über 10% an gebundenem Protein eine gute Bindefähigkeit an Hydroxylapatit in den Mundwasserformulierungen auf. Die Positivkontrolle BioMin 60 sowie die DewA-Fusionskonstrukte BioMin 144 und BioMin 145 stellten mit 30% gebundenem Protein oder mehr die besten Binder dar.



**Diagramm 3.6:** Zusammenfassung der neun bindenden Proteine in Mundwasser A (rot) und Mundwasser B (grau).

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 3.1:** Bewertung der 24 untersuchten Proteine bezüglich ihrer Bindefähigkeit gegenüber Hydroxylapatit in HBST-Puffer sowie den Mundwasserformulierungen A und B (Mund A und Mund B). Die Bindeergebnisse sind als prozentualer Anteil an gebundenem Protein dargestellt.

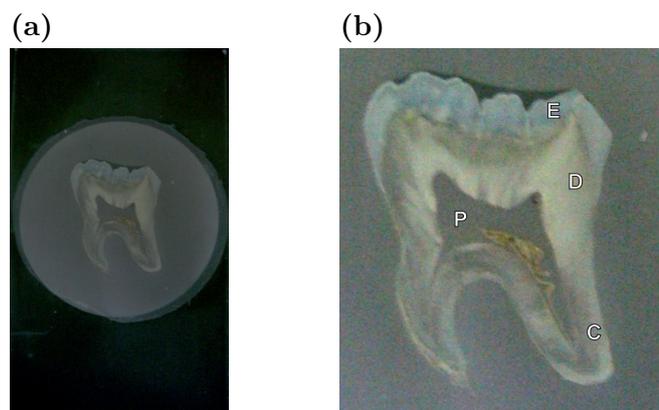
BioMin Nr.	Name	HBST	Mund A	Mund B
1-2	Amelogenin*	22±5	n.d.	n.d.
4-3	LRAP*	59±1	n.d.	n.d.
7-2	Amelogenin-Hydrophobin*	56±1	n.d.	n.d.
8-2-1	Amelogenin-Perlucin*	60±1	2±1	n.d.
10	(Amelogenin $\Delta$ 42aaN-term. + $\Delta$ 17aaC-term.)-DewA*	58±5	n.d.	n.d.
11-2	(Amelogenin:23aaC. term.)-DewA*	62±3	n.d.	n.d.
47	DMP1 Derivat (#64) <sup>79*</sup>	49±4	n.d.	n.d.
50-2	Carboanhydrase*	55±1	n.d.	n.d.
60	Peptides out of MI tooth mousse <sup>TM</sup>	70±9	37±3	30±1
65	homemade Recaldent after Trypsin treatment of Casein	14±1	4±1	5±1
77-5	R5 <sup>80</sup> -Amelogenin*	12±2	n.d.	n.d.
78	(DSS) <sub>6</sub> <sup>35</sup>	84±9	n.d.	n.d.
79	#3-1 (LIKHLHRL) <sup>35</sup>	3±1	n.d.	n.d.
92	YaaD-DewA*	30±5	n.d.	n.d.
93	40aaYaaD-DewA*	43±11	19±4	25±3
104-1	R5 <sup>80</sup> -40aaYaaD-DewA*	63±1	2±1	2±1
107	Amelogenin (mutein M11A, P21A)*	69±2	n.d.	n.d.
113	VP1-100aa-StatherinDD*	75±2	n.d.	n.d.
114	Statherinpeptid (unphosphoryliert)	16±4	n.d.	n.d.
115	Statherinpeptid (Phosphoryliert)	86±2	20±4	14±3
144	40aaYaaD-CPL12 <sup>86</sup> -DewA*	50±3	27±3	36±2
145	40aaYaaD-P <sub>11</sub> -4 <sup>76</sup> -DewA*	72±1	31±2	30±1
146	40aa YaaD-HRC*	96±1	8±3	10±4
163	CPL12 <sup>86</sup> -G2-BioMin 107*	60±12	n.d.	n.d.

\* enthält C-terminal einen His<sub>6</sub>-Tag

n.d. nicht detektierbar

### 3.1.1.2 Bindung an menschliche Zahnschnitte

Die neun in den Mundwasserformulierungen bindenden Proteine sowie die Negativkontrolle BioMin 79 (Peptid #3-1) wurden, in Hinblick auf die spätere Anwendung, auf ihr Bindevverhalten an menschliche Zahnschnitte getestet. Die Zahnschnitte wurden wie unter 2.13.6 am Institut für Mineralogie hergestellt. Abbildung 3.4a zeigt einen solchen Zahnschnitt. Im vergrößerten Ausschnitt sind die einzelnen Komponenten gekennzeichnet (Abbildung 3.4b). Ummantelt wird der Zahn von einer Schicht Enamel (E). Darunter befindet sich das weichere, den Knochen ähnliche Dentin (D). Im unteren Teil werden die Zahnwurzeln vom sogenannten Cementum (C) umhüllt. Im Zahninneren befindet sich die Pulpa (P), in der Blutgefäße und Nerven lokalisiert sind. Aufgrund der beschränkten Anzahl an Zahnschnitten wurden die Bindungsversuche lediglich in 50% igem Mundwasser B durchgeführt. Nach Bindung von 2  $\mu$ M fluoreszenzmarkiertem Protein für 2 h bei 37 °C und mehreren Waschschrinen wurden gebundenen Proteine unter dem Fluoreszenzmikroskop qualitativ nachgewiesen.

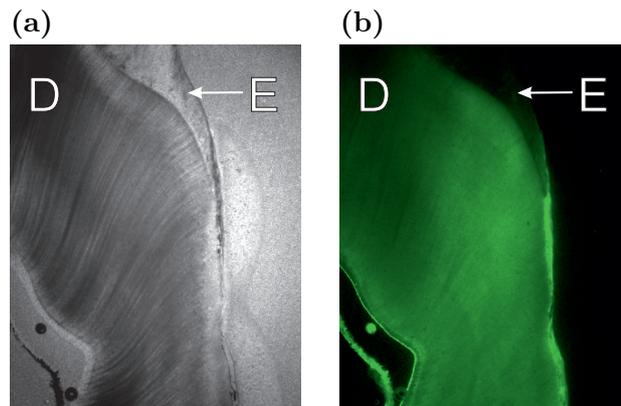


**Abbildung 3.4:** Abbildung eines für die Bindungsexperimente verwendeten Zahnschnittes (a) und die vergrößerte Darstellung des Zahnschnittes (b) mit Kennzeichnung der einzelnen Kompartimente, Enamel (E), Dentin (D), Pulpa (P) und Cementum (C).

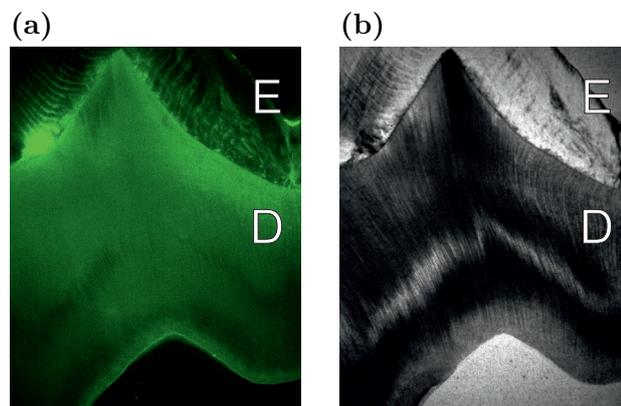
Für alle neun untersuchten Proteine konnte eine deutliche Bindung an die Zahnschnitte visualisiert werden. Abbildung 3.5 zeigt die entsprechenden Aufnahmen für die Positivkontrolle BioMin 60 (aus MI tooth mousse<sup>TM</sup> extrahierte Peptide). In Abbildung 3.5b ist ersichtlich, dass die Bindung der Peptide hauptsächlich an das Dentin (in der Abbildung mit D gekennzeichnet) stattgefunden hat, am härteren Enamel (E) konnte keine Fluoreszenz und somit keine sichtbar gebundenen Peptide nachgewiesen werden. Wie Abbildung 3.6 zeigt, wurde für das Fusionskonstrukt BioMin 145 aus dem Hydrophobin DewA und

### 3 Ergebnisse

dem Peptid P<sub>11</sub>-4 ein ähnliches Verhalten nachgewiesen. Ebenso wie für BioMin 60 konnte hauptsächlich eine Bindung an das Dentin detektiert werden. Alle neun untersuchten Proteine zeigten dieses Bindeverhalten, eine gute Bindung an Dentin, jedoch keine Bindung gegenüber dem härteren Enamel (die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen befinden sich im Anhang unter 7.1).



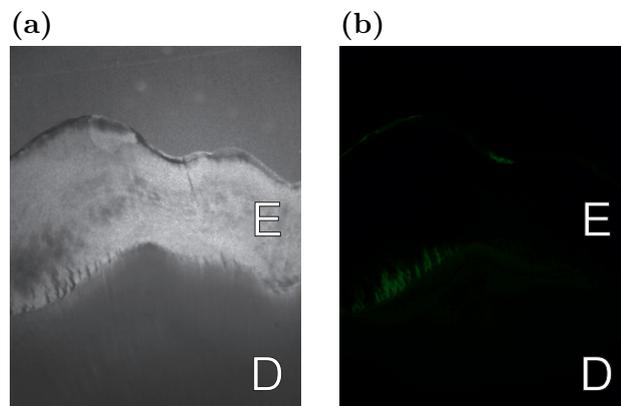
**Abbildung 3.5:** Abbildung eines menschlichen Zahnschnittes nach Bindung von BioMin 60 in 50% igem Mundwasser B. (a) zeigt das Durchlichtbild, (b) das entsprechende Fluoreszenzbild. Die unterschiedlichen Kompartimente Dentin (D) und Enamel (E) sind durch die weißen Buchstaben gekennzeichnet.



**Abbildung 3.6:** Abbildung eines menschlichen Zahnschnittes nach Bindung von BioMin 145 in 50% igem Mundwasser B. (a) zeigt das Durchlichtbild, (b) das entsprechende Fluoreszenzbild. Die unterschiedlichen Kompartimente Dentin (D) und Enamel (E) sind durch die weißen Buchstaben gekennzeichnet.

### 3 Ergebnisse

Lediglich für die Negativkontrolle #3-1 konnte nur eine geringe unspezifische Bindung an die beiden Hartsubstanzen, Dentin und Enamel, nachgewiesen werden (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7:** Abbildung eines menschlichen Zahnschnittes nach Bindung von BioMin 79 in 50% igem Mundwasser B. (a) zeigt das Durchlichtbild, (b) das entsprechende Fluoreszenzbild. Die unterschiedlichen Kompartimente Dentin (D) und Enamel (E) sind durch die weißen Buchstaben gekennzeichnet.

#### 3.1.2 Nukleationsexperimente

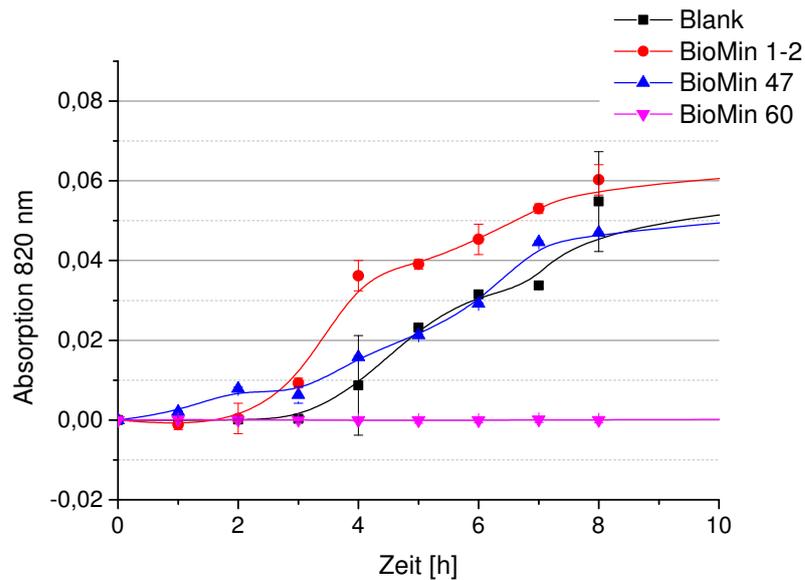
Neben der Bindung an Hydroxylapatit ist die Nukleation bzw. Mineralisierung von Hydroxylapatit ausschlaggebend für den Aufbau von Zahnschmelz in *oral care* Produkten. Daher wurden die unter 2.10 aufgeführten Proteine auf ihre Nukleationseigenschaften gegenüber Hydroxylapatit untersucht. Hierfür wurden die Proteinproben zunächst auf ihren Phosphatgehalt (siehe 2.14.1) überprüft und gegebenenfalls gegen 5 mM Tris-HCl pH 7,5 dialysiert, um eventuelle Phosphatrückstände zu entfernen. Auf diese Weise konnte für alle Proben eine gleiche Konzentration an Phosphat während der Nukleationsexperimente gewährleistet werden.

##### 3.1.2.1 Nukleation in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5

###### 3.1.2.1.1 Messung der Trübung bei 820 nm

Die Nukleationsfähigkeit der unterschiedlichen Proteine gegenüber Hydroxylapatit wurde durch die Trübung der Lösung bei 820 nm bestimmt. Dieser Assay wurde nach Gungormus *et al.* an die Anforderungen dieser Arbeit angepasst.<sup>84</sup> Wie unter 2.14.2 beschrieben wurde anstelle von  $\beta$ -Glycerolphosphat und Verwendung einer alkalischen Phosphatase anorganisches Phosphat eingesetzt. Für ein passendes *setup* wurden verschiedene Parameter variiert. Zu Beginn wurde die Variation der  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaHPO}_4$  und Proteinkonzentration untersucht. Da sich in den ersten Vorversuchen die Reproduzierbarkeit der Nukleationsergebnisse als problematisch erwiesen hatte, wurden alle Lösungen direkt vor Verwendung steril filtriert (2  $\mu\text{m}$ ) um unkontrollierte Präzipitation durch kleine Partikel zu unterbinden. Nach Untersuchung unterschiedlicher Konzentrationen wurde die finale Zusammensetzung auf 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 und 25  $\mu\text{M}$  Protein festgelegt. Dabei wurde ein Ca/P Verhältnis von 1,67 gewählt, welches dem in Hydroxylapatit entspricht. Die Messung der Trübung erfolgte stündlich bei 820 nm für 8 h und nach 24 h.

### 3 Ergebnisse

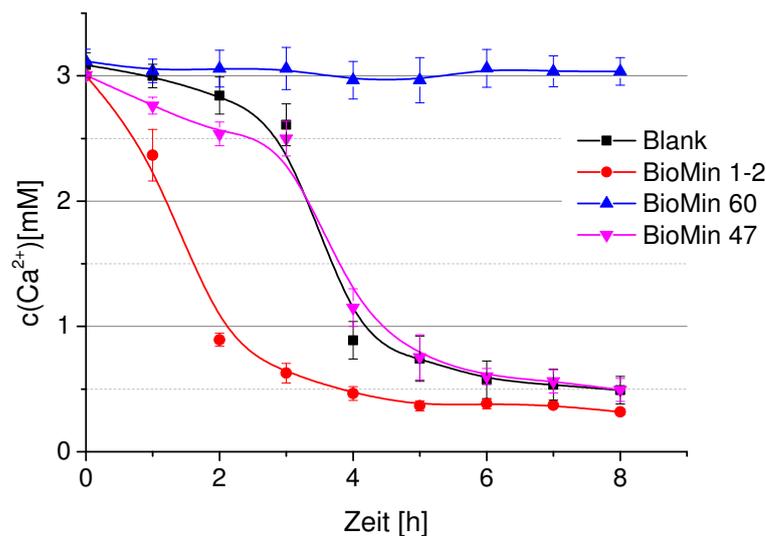


**Diagramm 3.7:** Messung der Mineralbildung über die Absorption bei 820 nm in der Nukleationslösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5. Es wurden Proteine identifiziert, die eine beschleunigende Wirkung (z. B. BioMin 1-2), stabilisierende Wirkung (z. B. BioMin 60) oder keinen Effekt (z. B. BioMin 47) auf die Mineralbildung besitzen, jeweils im Vergleich mit der Kontrolle ohne Protein (Blank).

Die Absorptionsmessungen bei 820 nm zeigten, dass die Proteine im Vergleich zur Kontrolle ohne Protein, drei unterschiedliche Nukleationsverhalten aufweisen (Diagramm 3.7). Für die Kontrolle ohne Protein konnte innerhalb der ersten 3 h keine Präzipitation nachgewiesen werden. Der Anstieg der Absorptionskurve nach 3 h zeigt, dass hier eine zunehmende Mineralbildung einsetzte. Nach Inkubation von 8 h bei 37 °C erreicht die Absorption einen Endwert von  $\approx 0,06$ . Der Großteil der hier untersuchten Proteine zeigte ein ähnliches Nukleationsverhalten wie die Kontrolle ohne Protein. Als Beispiel ist in Diagramm 3.7 das Derivat #64 des Dentin-Matrix-Protein 1 (DMP1) (BioMin 47) aufgeführt. Es konnten jedoch auch Proteine identifiziert werden, die einen stabilisierenden Effekt auf die Nukleationslösung ausübten. In Gegenwart solcher Proteine, wie z. B. den aus MI tooth mousse<sup>TM</sup> extrahierten Peptiden (BioMin 60), wurde eine zeitlich verzögerte, in einigen Fällen auch keine Mineralbildung detektiert. Im Gegensatz dazu war es auch möglich, Proteine zu identifizieren, die eine beschleunigende Wirkung auf die Trübungsentwicklung zeigten. In Diagramm 3.7 wird dies veranschaulicht durch das *full length* Amelogenin (BioMin 1-2). Ein großer Nachteil dieses Assays ist die Möglichkeit durch ausfallende Proteine falsch-positive Ergebnisse zu erhalten. Dies würde ebenfalls zu einer Trübung der Lösung führen und könnte somit die eigentliche Messung der Mineralbildung verfälschen. Deshalb wurde in einem weiteren Assay die Abnahme der Calciumkonzentration verfolgt.

3.1.2.1.2 Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenabnahme

Neben den Trübungsmessungen bei 820 nm wurde die Abnahme der Calciumionenkonzentration in der Nukleationslösung verfolgt. Die Abnahme der Calciumkonzentration in der Lösung ist auf die Bildung des Minerals zurückzuführen. Wie unter 2.14.3 beschrieben wurde zur Ermittlung der aktuellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Farbstoff o-Cresolphthalein Complexone (CPC) verwendet. CPC bildet im alkalischen Milieu in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einen violetten Komplex, der photometrisch bei 575 nm detektiert werden kann. In Anlehnung an die Doktorarbeit von Kaur wurde die optimale Zusammensetzung zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Bestimmung ermittelt.<sup>85</sup> Die finale Zusammensetzung für die Nachweisreaktion wurde auf 0,03 mM CPC, 20 mM 2-Amino-2-methyl-1-propanol und 20  $\mu\text{L}$  Probe in einem Endvolumen von 250  $\mu\text{L}$  festgelegt.

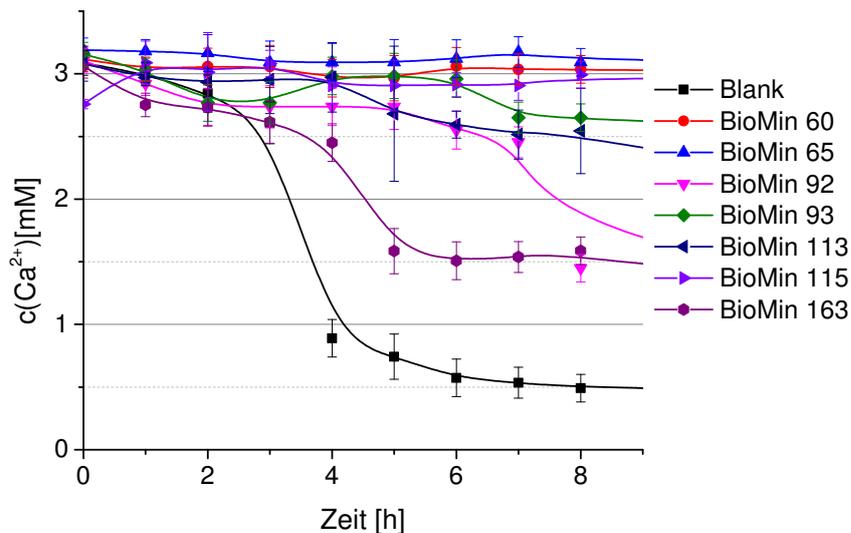


**Diagramm 3.8:** Abnahme der Calciumkonzentration in der Nukleationslösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5. Es wurden Proteine identifiziert, die eine beschleunigende Wirkung (z. B. BioMin 1-2), eine stabilisierende Wirkung (z. B. BioMin 60) und keinen Einfluss (BioMin 47) auf die Nukleation besitzen, jeweils im Vergleich mit der Kontrolle ohne Protein (Blank).

Auch bei der Detektion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration konnten drei unterschiedliche Nukleationstrends beobachtet werden (Diagramm 3.8). Die Kontrolle ohne Protein zeigt innerhalb der ersten 3h keine Abnahme in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Nach 3 h sinkt die Konzentration von 3,0 mM auf 1 mM ab. Innerhalb der folgenden 5 h erreicht die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration einen Endwert von 0,5 mM. Wie BioMin 47 zeigte der Großteil der unter-

### 3 Ergebnisse

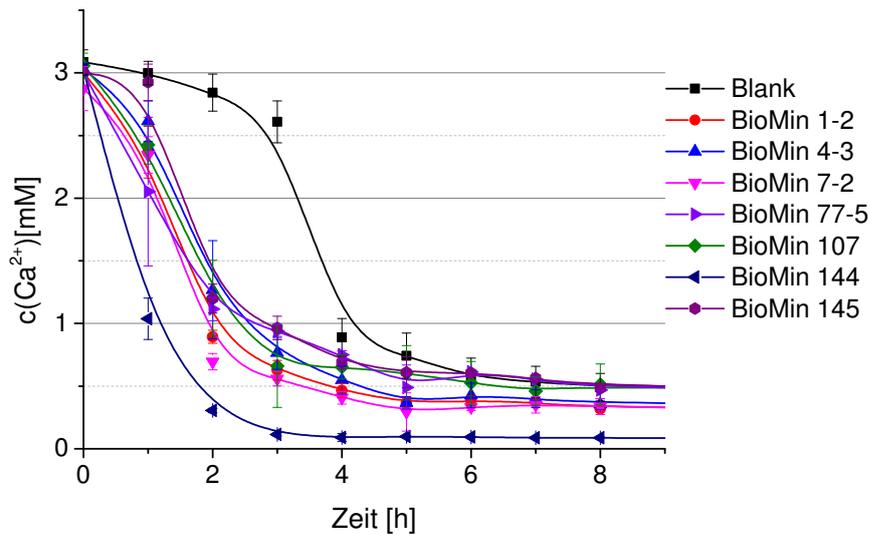
suchten Proteine einen ähnlichen Nukleationsverlauf verglichen mit der Kontrolle ohne Protein. Allerdings konnten auch hier sieben Verbindungen identifiziert werden, die eine stabilisierende Wirkung aufwiesen, wie die aus MI tooth mousse<sup>TM</sup> extrahierten Peptide (BioMin 60). Weitere Vertreter dieser Gruppe sind BioMin 65, BioMin 92, BioMin 93, BioMin 113, BioMin 115 und BioMin 163 (Diagramm 3.9). In Anwesenheit dieser Proteine wurde die Nukleation verzögert (verglichen mit der Kontrolle) oder in einigen Fällen vollständig unterbunden.



**Diagramm 3.9:** Abnahme der Calciumkonzentration in der Nukleationslösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5. Dargestellt sind Proteine, die eine stabilisierende Wirkung auf die Nukleation besitzen.

Im Gegensatz hierzu konnten andererseits sieben Proteine identifiziert werden, deren Anwesenheit in einer Beschleunigung der Nukleation resultierte. Während in der Kontrolle ohne Proteine über drei Stunden eine stabile Konzentration von 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$  beibehalten wurde, zeigten einige Verbindungen bereits innerhalb der ersten beiden Stunden eine deutliche Abnahme in der Calciumkonzentration. Als Beispiel hierfür ist in Diagramm 3.8 das *full length* Amelogenin (BioMin 1-2) aufgeführt. Zu den beschleunigend wirkenden Proteinen gehörten weiterhin BioMin 4-3, BioMin 7-2, BioMin 77-5, BioMin 107, BioMin 144 und BioMin 145 (Diagramm 3.10). Das Hydrophobinkonstrukt BioMin 144 zeigte dabei den deutlichsten Einfluss auf die Nukleation.

### 3 Ergebnisse



**Diagramm 3.10:** Abnahme der Calciumkonzentration in der Nukleationslösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5. Dargestellt sind Proteine, die eine beschleunigende Wirkung auf die Nukleation besitzen.

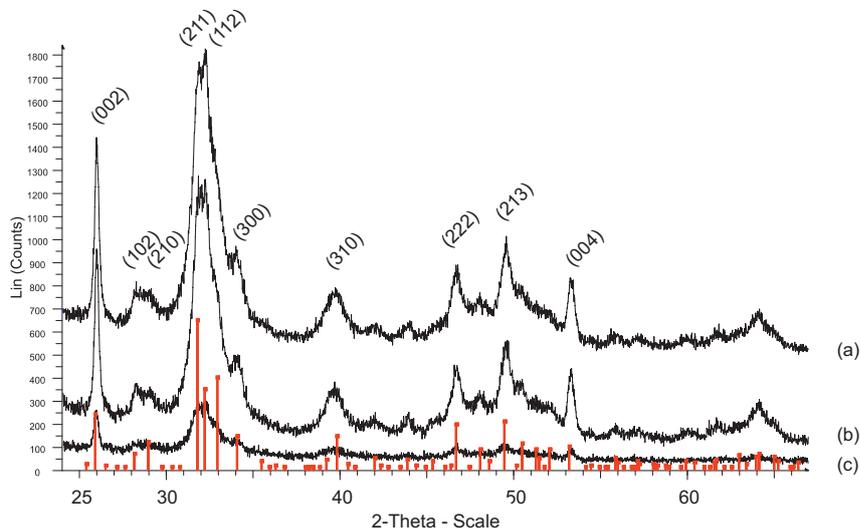
Die gesamten Nukleationsergebnisse des CPC-Assays in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die grafische Darstellung der Nukleationsverläufe aller Proteine befindet sich im Anhang unter 7.2.

Das während der Nukleation gebildete Präzipitat wurde für ausgewählte Proteine über Röntgen-Pulverdiffraktometrie charakterisiert. Abbildung 3.8 zeigt die entsprechenden Pulverspektren für die Präzipitate, gebildet in Anwesenheit der Hydrophobinkonstrukte BioMin 145 (a) und BioMin 144 (b) sowie für die Kontrolle ohne Protein (c). In allen Proben wurden Hauptsignale bei  $2\Theta = 25,9^\circ$ ,  $2\Theta = 31,8^\circ$  sowie  $2\Theta = 32,2^\circ$  detektiert, die den kristallografischen (002) und (211) bzw. (112) Flächen von Hydroxylapatit entsprechen. Weiterhin wurde das gebildete Mineral für die Amelogeninderivate BioMin 1-2, BioMin 4-3, BioMin 107, sowie für das unphosphorylierte Statherinpeptid (BioMin 114), das Histidin-reiche Calcium bindende Protein HRC (BioMin 146) und das Hydrophobinfusionsprotein BioMin 104-1 untersucht. In allen Fällen konnte Hydroxylapatit als gebildete Phase identifiziert werden. Die entsprechenden Spektren für diese Proteine befinden sich im Anhang unter 7.2.1.

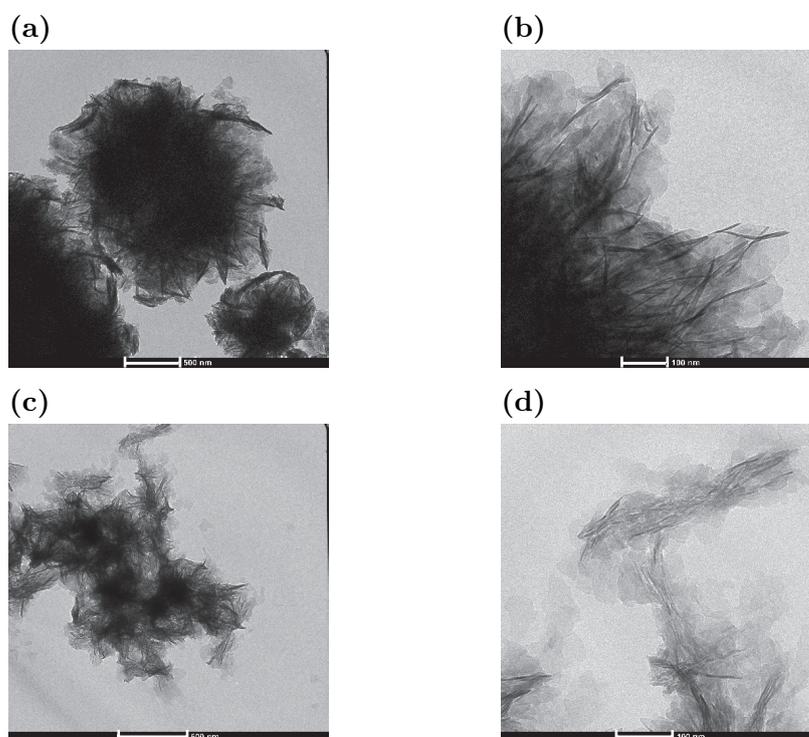
Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der entstandenen Präzipitate sind in Abbildung 3.9 dargestellt und zeigen plättchenförmige Kristalle. In Abwesenheit von Proteinen lagerten sich diese Kristalle zu sphärischen Strukturen zusammen. Dabei entstanden runde Gebilde mit einem Durchmesser von 1 - 2  $\mu\text{m}$  (Abbildungen 3.9a und 3.9b). In Gegenwart des Fusionskonstruktes BioMin 144 (40aaYaaD-CPL12-DewA) bildeten sich

### 3 Ergebnisse

ebenfalls plättchenförmige Kristalle. Im Gegensatz zu den sphärischen Partikel ohne Protein wurden in Anwesenheit von BioMin 144 feinere, netzartige Strukturen ausgebildet (Abbildung 3.9c und 3.9d).



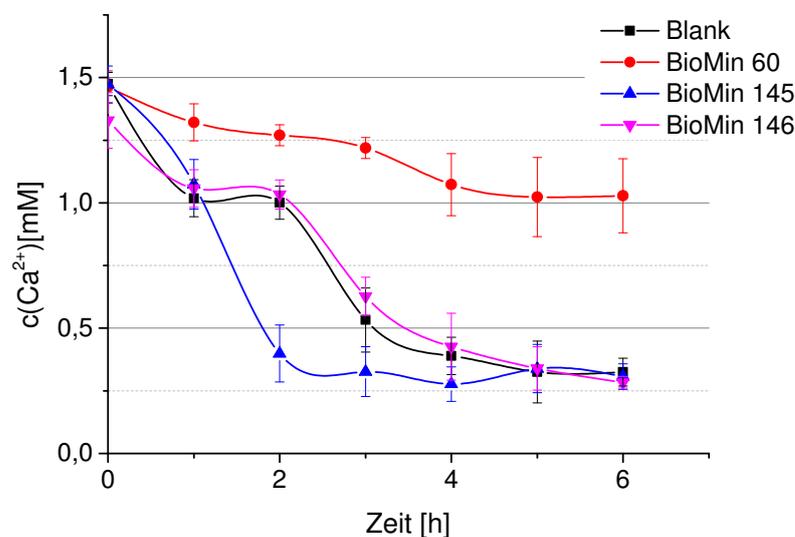
**Abbildung 3.8:** Pulverdiffraktogramm der Präzipitate gebildet in der Nukleationslösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 in der Gegenwart von BioMin 145 (a), BioMin 144 (b) und ohne Protein (c).



**Abbildung 3.9:** TEM-Aufnahmen des Präzipitats gebildet in der Nukleationslösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 in Abwesenheit von Proteinen in (a) und (b). TEM-Aufnahmen des Präzipitats gebildet in Gegenwart von 25  $\mu\text{M}$  BioMin 144 in (c) und (d). Balken entsprechen in (a)/(c) 500 nm und (b)/(d) 100 nm.

### 3.1.2.2 Nukleation in artifiziellem Speichel

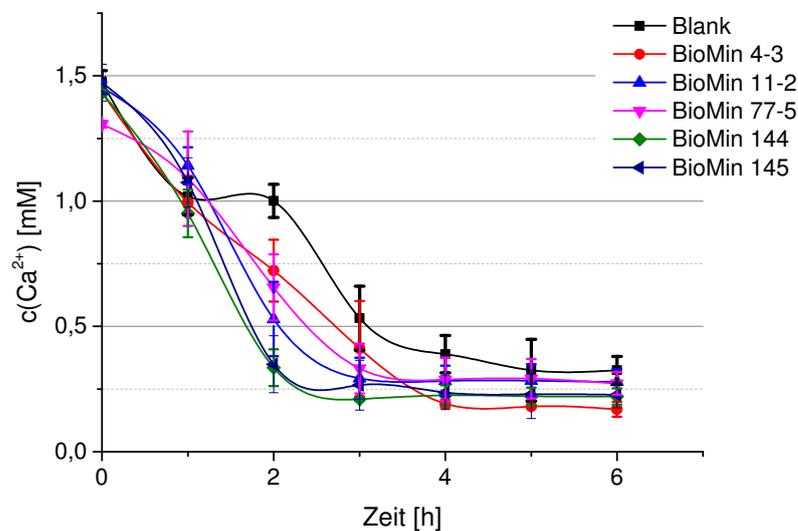
Um die Nukleationsexperimente der späteren Anwendung gegenüber relevanter zu gestalten, wurden Versuche zur Abnahme in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in artifiziellem Speichel durchgeführt. Dies entspricht einer möglichen Applikation in Mundspülungen. Mögliche Kandidaten sollten nach der Bindung an die Zahnoberfläche in der Lage sein, die gerichtete Abscheidung von Hydroxylapatit aus dem Calcium- und Phosphathaltigen Speichel an der Zahnoberfläche zu fördern. Für die Versuche wurde die Speichelzusammensetzung nach Panich<sup>78</sup> gewählt, auf den Zusatz von Carboxymethylcellulose wurde verzichtet. Die Abnahme in der Calciumkonzentration wurde wie in HEPES-Puffer durchgeführt. Über einen Zeitraum von 6 h wurden stündlich Proben entnommen und der Überstand auf die aktuelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration untersucht. Dem CPC-Reagenz wurden für diese Versuche 455 mM 8-Hydroxyquinolin zugesetzt, um die enthaltenen  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen zu maskieren.<sup>85</sup> Wie in den voraus gegangenen Versuchen wurde drei unterschiedliche Nukleationstrends detektiert. In der Kontrolle ohne Proteine sinkt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb der ersten Stunde von 1,45 mM auf 1,2 mM (Diagramm 3.11).



**Diagramm 3.11:** Abnahme der Calciumkonzentration in artifiziellem Speichel nach Panich.<sup>78</sup> Es wurden Proteine identifiziert, die eine beschleunigende Wirkung (z. B. BioMin 145), eine stabilisierende Wirkung (z. B. BioMin 60) und keinen Einfluss (BioMin 146) auf die Nukleation besitzen, verglichen mit der Kontrolle ohne Protein (Blank).

### 3 Ergebnisse

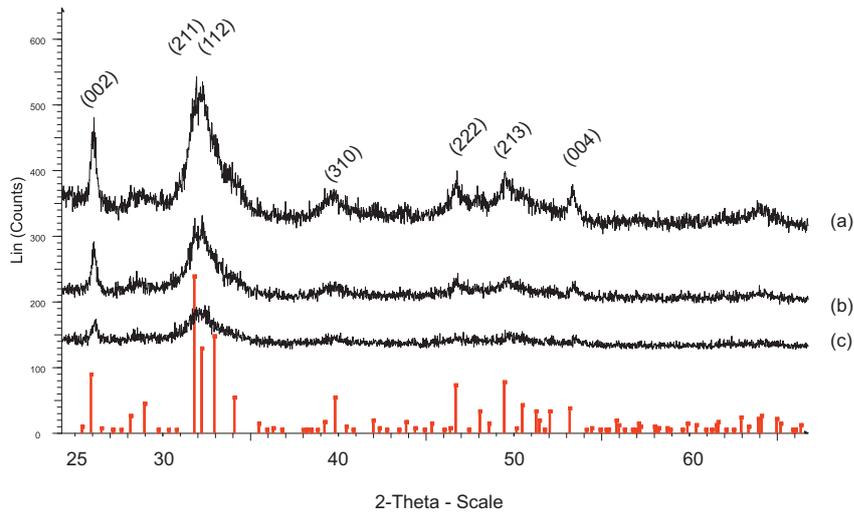
Während der zweiten Stunde fällt die Konzentration leicht auf einen Wert von 1,0 mM, innerhalb der dritten Stunde beginnt die eigentliche Präzipitation und nach 4 h ist eine Konzentration von ca. 0,4 mM erreicht, die innerhalb der folgenden zwei Stunden noch leicht auf einen Endwert von 0,3 mM absinkt. Wie bereits in HEPES-Puffer wiesen die meisten der untersuchten Proteine einen ähnlichen Nukleationsverlauf wie die Kontrolle ohne Protein auf. Während der Versuche in artifiziellem Speichel konnten sieben Proteine identifiziert werden, die eine stabilisierende Wirkung auf die Nukleation ausübten. Dies resultierte in einer zeitlichen Verzögerung im Nukleationsverlauf bzw. die Mineralbildung wurde über sechs Stunden hinweg komplett unterbunden. Zu diesen Proteinen zählten BioMin 8-2-1, BioMin 60, BioMin 65, BioMin 92, BioMin 104-1, BioMin 113 und BioMin 115 (s. BioMin 60 in Diagramm 3.11). Weiterhin zeigten fünf Verbindungen eine beschleunigende Wirkung auf den Nukleationsverlauf. Zu diesen gehörten BioMin 4-3, BioMin 11-2, BioMin 77-5, BioMin 144 und BioMin 145. Erneut zeigten die Hydrophobinfusionskonstrukte BioMin 144 (40aaYaaD-CPL12-DewA) und BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11</sub>-4-DewA) die stärkste Beschleunigung im Nukleationsverlauf. Innerhalb von zwei Stunden wurde eine stabile Endkonzentration von 0,2 mM erreicht (Diagramm 3.12). Die Nukleationsverläufe aller Proteine befinden sich im Anhang unter 7.3.



**Diagramm 3.12:** Abnahme der Calciumkonzentration in artifiziellem Speichel nach Panich.<sup>78</sup> Dargestellt sind Proteine, die eine beschleunigende Wirkung auf die Nukleation besitzen, verglichen mit der Kontrolle ohne Protein (Blank).

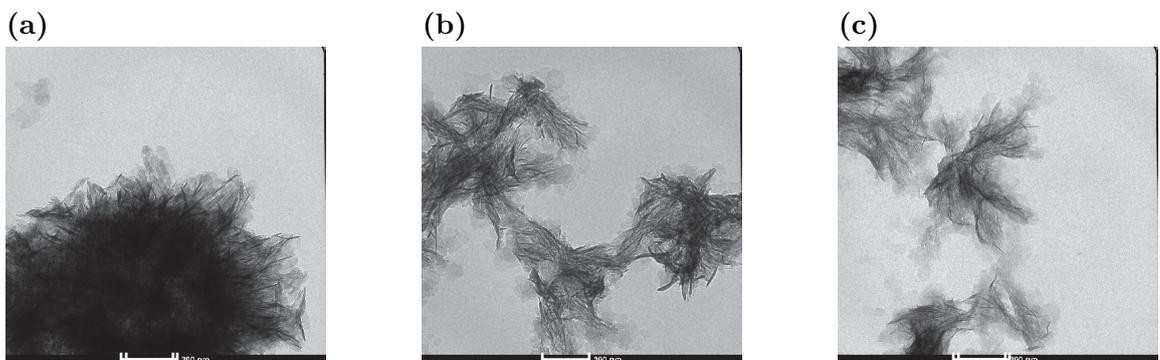
### 3 Ergebnisse

Für die beiden Hydrophobinkonstrukte BioMin 145 und BioMin 144 und die Kontrolle ohne Protein wurden die gebildeten Präzipitate über Pulverdiffraktometrie charakterisiert. Wie Abbildung 3.10 zeigt, konnte in allen Fällen Hydroxylapatit als Hauptphase identifiziert werden. Es wurden Hauptsignale bei  $2\Theta = 25,9^\circ$ ,  $2\Theta = 31,8^\circ$  sowie  $2\Theta = 32,2^\circ$  gefunden, die indikativ sind für Hydroxylapatit.



**Abbildung 3.10:** Pulverdiffraktogramme der Präzipitate gebildet in artifiziellem Speichel in Gegenwart von BioMin 145 (a), BioMin 144 (b) und ohne Protein (c).

Die Aufnahmen über Transmissionselektronen-Mikroskopie zeigen für die gebildeten Präzipitate plättchenförmige Kristalle (Abbildung 3.11). In Abwesenheit von Protein wurden sphärische Zusammenlagerungen dieser Kristalle gefunden (Abbildung 3.11a). Kristalle, die in Gegenwart der Hydrophobinkonstrukte BioMin 144 bzw. BioMin 145 gebildet worden waren, zeigten hingegen eine feinere Struktur (Abbildung 3.11b bzw. 3.11c).



**Abbildung 3.11:** TEM-Aufnahme des Präzipitats gebildet in artifiziellem Speichel in Abwesenheit von Proteinen in (a). TEM-Aufnahmen des Präzipitats gebildet in Gegenwart von  $25 \mu\text{M}$  BioMin 144 (b) und BioMin 145 (c). Balken entsprechen 100 nm.

### 3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Nukleation in HEPES Puffer und artifiziellem Speichel sind in Tabelle 3.2 gegenübergestellt. Diese zeigen, dass die Nukleationseigenschaften einiger Proteine von der verwendeten Nukleationslösung (Puffer oder Speichel) abhängig sind. Dies betrifft vor allem Proteine, die einen weniger stark ausgeprägten Effekt auf die Nukleation ausüben. Ein Beispiel ist das *full length* Amelogenin (BioMin 1-2). Während in artifiziellem Speichel keine Wirkung zu beobachten ist und somit der Nukleation ohne Protein ähnelt, ist in HEPES-Puffer eine beschleunigende Wirkung zu beobachten. Als weiteres Beispiel zeigte das Konstrukt aus dem verkürzten YaaD und dem Hydrophobin DewA (BioMin 93) in HEPES-Puffer einen etwas verzögerten Nukleationsverlauf, die Nukleation in artifiziellem Speichel verläuft hingegen wie die Kontrolle ohne Protein. Im Gegensatz dazu zeigen Proteine, die die Nukleation über einen Zeitraum von sechs Stunden vollständig inhibieren (BioMin 60, BioMin 65, BioMin 113, BioMin 115), diesen inhibierenden Effekt sowohl in einer gepufferten Salzlösung als auch in artifiziellem Speichel. Ebenso weisen die beiden Hydrophobinkonstrukte BioMin 144 und BioMin 145 in beiden Lösungen eine deutlich beschleunigende Wirkung auf.

**Tabelle 3.2:** Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den Nukleationsexperimenten in einer Nukleationslösung aus 3,0 mM CaCl<sub>2</sub> und 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 und artifiziellem Speichel.

BioMin Nr.	Name	Nukleation	
		HEPES	Speichel
1-2	Amelogenin*	+	o
4-3	LRAP*	+	+
7-2	Amelogenin-Hydrophobin*	+	o
8-2-1	Amelogenin-Perlucin*	o	-
10	(Amelogenin $\Delta$ 42aa N-term. + $\Delta$ 17aa C-term.)-DewA*	o	o
11-2	(Amelogenin: 23aa C)-DewA*	o	+
47	DMP1 Derivat (#64)*	o	o
50-2	Carboanhydrase*	o	o
60	Peptides out of MI tooth mousse <sup>TM</sup>	-	-
65	homemade Recaldent after Trypsin treatment of Casein	-	-
77-5	R5-Amelogenin*	+	+
78	6xDSS	o	o
79	#3-1 (LIKHILHRL)	o	o
92	YaaD-DewA*	-	-
93	40aaYaaD-DewA*	-	o

### 3 Ergebnisse

BioMin Nr.	Name	Nukleation	
		HEPES	Speichel
104-1	R5-40aaYaad-DewA*	o	-
107	Amelogenin (M11A, P21A)*	+	o
113	VP1-100aa-StatherinDD*	-	-
114	Statherinpeptid (unphosph.)	o	o
115	Statherinpeptid (phosph.)	-	-
144	40aaYaaD-CPL12-DewA*	+	+
145	40aaYaaD-P <sub>11</sub> -4-DewA*	+	+
146	40aa YaaD-HRC*	o	o
163	CPL12-G2-BioMin107*	-	o

\* enthält C-terminal einen His<sub>6</sub>-Tag

- zeigt im Vergleich zur Kontrolle ohne Proteine eine Verzögerung im Nukleationsverlauf

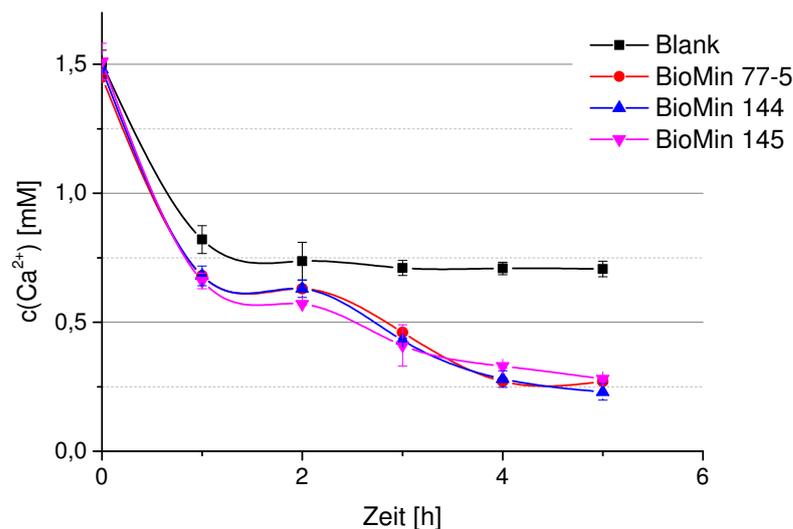
o zeigt einen Nukleationsverlauf wie die Kontrolle ohne Protein

+ zeigt im Vergleich zur Kontrolle ohne Protein eine Beschleunigung im Nukleationsverlauf

### 3.1.2.3 Nukleation in artifiziellem Speichel unter Zusatz von Fluorid

Der positive Effekt von Fluorid auf die Remineralisierung der Zahnoberfläche wurde durch verschiedene Studien untersucht und bestätigt. Der Effekt ist hauptsächlich auf die Bildung von Fluorapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ) zurückzuführen. Dies entsteht durch Substitution der Hydroxylgruppen in Hydroxylapatit und besitzt im Vergleich zu diesem eine höhere Stabilität in einem breiten pH Bereich.<sup>20, 55, 87, 88</sup> Daher wird Fluorid bereits in vielen *oral care* Produkten zugesetzt.

In dieser Arbeit wurde weiterhin der Einfluss von Fluorid auf die Nukleation von Hydroxylapatit in artifiziellem Speichel untersucht. Nach Validierung unterschiedlicher Konzentrationen im Bereich von 100 - 500 ppm Fluorid erfolgte die Festsetzung auf eine Endkonzentration auf 250 ppm. Die unter 2.10 aufgeführten Proteine wurden bezüglich ihres Nukleationsverhaltens in artifiziellem Speichel in Gegenwart von 250 ppm Fluorid bewertet. Bei Untersuchung der unterschiedlichen Proteine zeigten lediglich drei Verbindungen eine beschleunigende Wirkung auf den Nukleationsverlauf (Diagramm 3.13). Während in der Lösung ohne Protein die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb der ersten Stunde von 1,5 mM auf 0,8 mM abfällt und auf diesem Niveau verbleibt, wurden in Anwesenheit der Fusionskonstrukte aus dem  $\text{TiO}_2$ -mineralisierenden Peptid R5<sup>80</sup> und dem *full length* Amelogenin (BioMin 77-5), der Hydrophobinkonstrukte BioMin 144 (40aaYaaD-CPL12<sup>86</sup>-DewA) und BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11</sub>-4<sup>76</sup>-DewA) weiter  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Lösung verbraucht. Nach 5 h wird eine Endkonzentration von 0,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  erreicht.



**Diagramm 3.13:** Nukleation in artifiziellem Speichel in Gegenwart von 250 ppm Fluorid. Gezeigt sind Proteine, die eine beschleunigende Wirkung auf den Nukleationsverlauf besitzen verglichen mit der Kontrolle ohne Protein (Blank).

### 3.1.3 Zusammenfassung Screening

Für die Applikation in Mundpflegeprodukten wurden insgesamt 24 Protein und Peptide auf ihr Bindevverhalten gegenüber Hydroxylapatit in HBST-Puffer und zwei Mundwasserformulierungen hin untersucht. Außerdem wurden diese Proteine bezüglich ihrer Nukleationseigenschaften in HEPES-Puffer und artifiziellem Speichel bewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Bei Bewertung dieser Proteine zeigten lediglich zwei Verbindungen (BioMin 144 und BioMin 145) sowohl bindende Eigenschaften in den Mundwasserformulierungen als auch eine beschleunigende Wirkung auf die Nukleation in HEPES-Puffer und in artifiziellem Speichel.

**Tabelle 3.3:** Zusammenfassung der Bindungsergebnisse in HBST-Puffer und den Mundwasserformulierungen dargestellt als % an gebundenem Protein sowie der Nukleationsergebnisse in HEPES-Puffer und artifiziellm Speichel und in Gegenwart von 250 ppm Fluorid.

BioMin	Name	Bindung			Nukleation		
		HBST	Mundw. A	Mundw. B	HEPES	Speichel	Fluorid
1-2	Amelogenin*	22±5	n.d.	n.d.	+	o	o
4-3	Leucinreiches Amelogeninpolypeptid*	59±1	n.d.	n.d.	+	+	o
7-2	Amelogenin-Hydrophobin*	56±1	n.d.	n.d.	+	o	o
8-2-1	Amelogenin-Perlucin*	60±1	2±1	n.d.	o	–	o
10	(AmelogeninΔ42aa N-term. + Δ 17aa C-term.)-DewA*	58±5	n.d.	n.d.	o	o	o
11-2	(Amelogenin: 23aaC)-DewA*	62±3	n.d.	n.d.	o	+	o
47	DMP1 Derivate (#64) <sup>79</sup> *	49±4	n.d.	n.d.	o	o	o
50-1	Carboanhydrase (CanA)*	55±1	n.d.	n.d.	o	o	o
60	Peptides out of MI tooth mousse <sup>TM</sup>	70±9	37±3	30±1	–	–	o
65	homemade Recaldent after Trypsin treatment of Casein	14±1	4±1	5±1	–	–	o
77-5	R5 <sup>80</sup> -Amelogenin*	12±2	n.d.	n.d.	+	+	+
78	(DSS) <sub>6</sub> <sup>35</sup>	84±9	n.d.	n.d.	o	o	o
79	#3-1 (LIKHILHRL) <sup>35</sup>	3±1	n.d.	n.d.	o	o	o
92	YaaD-DewA	30±5	n.d.	n.d.	–	–	o

BioMin	Name	Bindung			Nukleation		
		HBST	Mundw. A	Mundw. B	HEPES	Speichel	Fluorid
<b>93</b>	40aaYaaD-DewA	43±11	19±4	25±3	–	o	o
<b>104-1</b>	R5 <sup>80</sup> -40aaYaaD-DewA*	63±1	2±1	2±1	o	–	o
<b>107</b>	Amelogenin (M11A, P21A)*	69±2	n.d.	n.d.	+	o	o
<b>113</b>	VP1-100aa-StatherinDD*	75±2	n.d.	n.d.	–	–	o
<b>114</b>	Statherinpeptid (unphosphoryliert)	16±4	n.d.	n.d.	o	o	o
<b>115</b>	Statherinpeptid (phosphoryliert)	86±2	20±4	14±3	–	–	o
<b>144</b>	40aaYaaD-CPL12 <sup>86</sup> -DewA*	50±3	27±3	36±2	+	+	+
<b>145</b>	40aaYaaD-P <sub>11</sub> -4 <sup>76</sup> -DewA*	72±1	31±2	30±1	+	+	+
<b>146</b>	40aaYaaD-HRC*	96±1	8±3	10±4	o	o	o
<b>163</b>	CPL12 <sup>86</sup> -G2-BioMin 107*	60±12	n.d.	n.d.	–	o	o

\* enthält C-terminal einen His<sub>6</sub>-Tag

n.d. nicht detektierbar

+ Nukleation beschleunigt im Vergleich zur Kontrolle ohne Protein

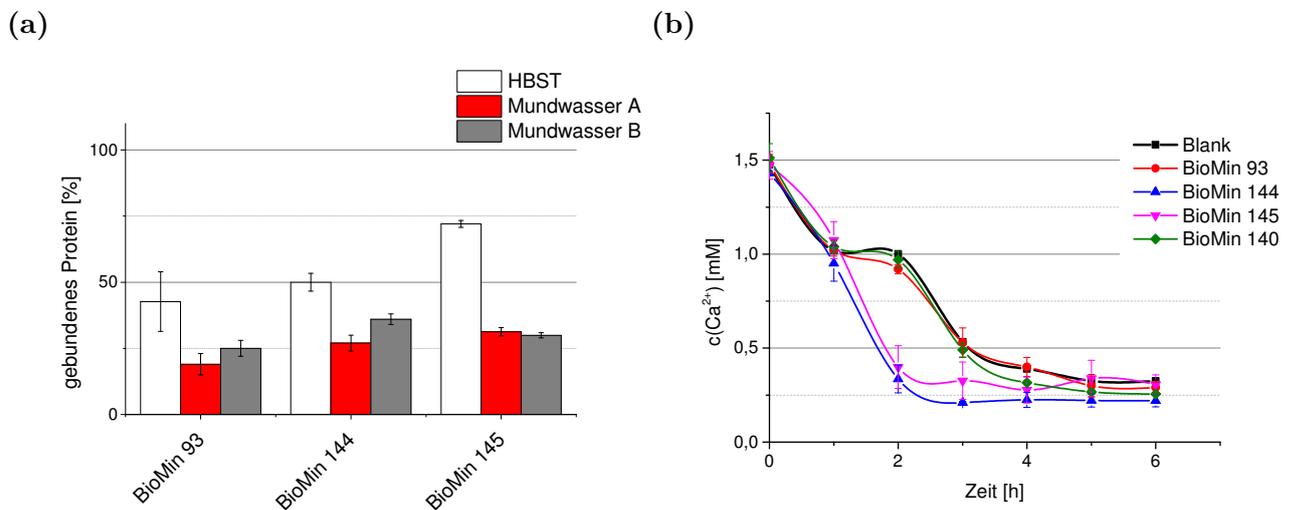
o Nukleation verläuft wie die Kontrolle ohne Protein

- Nukleation verzögert im Vergleich zur Kontrolle ohne Protein



### 3 Ergebnisse

BioMin 145 erhöht. In Hinblick auf die Nukleationseigenschaften in artifiziellem Speichel zeigte BioMin 93 einen Nukleationsverlauf wie die Kontrolle ohne Protein (Diagramm 3.14b). Beide Konstrukte, BioMin 144 als auch BioMin 145, hingegen weisen eine deutliche Beschleunigung der Nukleation auf, verglichen mit der Kontrolle ohne Protein (Blank, schwarz). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass in den Konstrukten BioMin 144 und BioMin 145 das Hydrophobin DewA für die Bindungsfähigkeit an Hydroxylapatit verantwortlich ist, während die Nukleationsaktivität auf das jeweilige Peptid zurückzuführen ist. Neben den bindenden Eigenschaften scheint DewA außerdem eine stabilisierende Funktion auf die eingeführten Peptide zu besitzen. Wie in Diagramm 3.14b gezeigt, weist das einfache Peptid P<sub>11-4</sub> (BioMin 140) alleine ebenfalls keine Nukleationsaktivität auf.



**Diagramm 3.14:** (a) Graphische Darstellung der Bindefähigkeit von BioMin 93, BioMin 144 und BioMin 145 in HBST-Puffer (weiß) und den Mundwasserformulierungen A (rot) und B (grau). Durch Einbau der Peptide CPL12 (BioMin 144) und P<sub>11-4</sub> (BioMin 145) wird die Bindungskapazität weiter erhöht. (b) Übersicht über das Nukleationsverhalten der Konstrukte BioMin 93, BioMin 140 (P<sub>11-4</sub>), BioMin 144 und BioMin 145 in artifiziellem Speichel im Vergleich mit der Kontrolle ohne Protein (Blank).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden anhand der Sequenz von BioMin 144 und BioMin 145 Mutanten erstellt, um den Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Nukleation von Hydroxylapatit zu untersuchen. Dabei dienten ausschließlich die Aminosäuresequenzen der eingeführten Peptide CPL12 (BioMin 144) und P<sub>11-4</sub> (BioMin 145) sowie die zusätzlich eingeführten Aminosäuren (MGKK) als Target für die ortsgerichtete Mutagenese. Die gewünschten Mutationen wurden über die QuikChange Methode (siehe 2.11.1) unter Verwendung der entsprechenden Primer (siehe 2.7) eingeführt. Die Plasmide mit den Genen, codierend für die Wildtypkonstrukte BioMin 144 und BioMin 145, wurden

### 3 Ergebnisse

freundlicherweise von der BASF SE zur Verfügung gestellt. Als Vektor diente das Qiagen-Plasmid pQE60. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung bestätigt.

Nach Expression wurden die erstellten Mutanten bezüglich ihrer Bindeaktivität in HBST-Puffer und 50% igem Mundwasser B sowie auf ihr Nukleationsverhalten in artifiziellem Speichel hin bewertet.

#### 3.2.1 BioMin 144 Varianten

BioMin 144 enthält das 12mer CPL12 (QPYHPTIPQSVH), das über Phage Display gegen Hydroxylapatit-Kristalle identifiziert wurde.<sup>86</sup> Chung *et al.* konnten neben der Bindung dieses Peptides an Hydroxylapatit auch eine beschleunigende Wirkung auf die Nukleation nachweisen.<sup>86</sup> Außer den 12 Aminosäuren von CPL12 wurden durch die Klonierung der Peptidsequenz in BioMin 93 die vier Aminosäuren MGKK N-terminal von CPL12 eingeführt.

BioMin 144 wurde als Target für die ersten Mutageneseexperimente gewählt. Für die ortsgerichtete Mutagenese wurden ausschließlich die Aminosäuren von CPL12 sowie die zusätzlichen Aminosäuren Methionin (M), Glycin (G), Lysin (K), die N-terminal an CPL12 anschließen, in Betracht gezogen. In ersten Versuchen sollte der Einfluss positiv geladener Aminosäuren auf die Nukleation von Hydroxylapatit untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden das Lysin an Position 47 sowie das Histidin 52 durch Alanin substituiert. Weiterhin wurde eine Doppelmutante KK47/48AA und eine Tripelmutante KK47/48/H52AAA erstellt und durch Sequenzierung bestätigt (Abbildung 3.13).

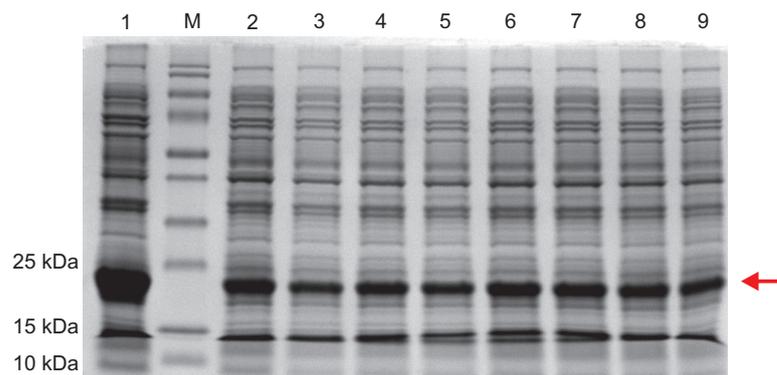


**Abbildung 3.13:** Schematischer Aufbau von BioMin 144 (40aaYaaD-CPL12-DewA) und den erstellten Alaninmutanten. Die Peptidsequenz von CPL12 sowie die zusätzlich eingeführten Aminosäuren MGKK sind zwischen der verkürzten Form des YaaD (gelb) und dem Hydrophobin DewA (orange) dargestellt. Eingeführte Alaninmutationen sind rot markiert.

### 3.2.1.1 Expression und Renaturierung der BioMin 144-Alaninmutanten

Hydrophobine können aus der Natur nur mit geringen Ausbeuten extrahiert werden. Durch Fusion von Proteine, die eine hohe Expressionsrate in *E. coli* aufweisen, an den N-Terminus des Hydrophobins DewA konnte die BASF SE die rekombinante Expression solcher Hydrophobinfusionskonstrukte als *Inclusion bodies* in *E. coli* etablieren. Als guter Fusionspartner hatte sich in diesen Untersuchungen die Synthase YaaD aus *B. subtilis* sowie die verkürzte Form 40aaYaaD herausgestellt.<sup>89</sup>

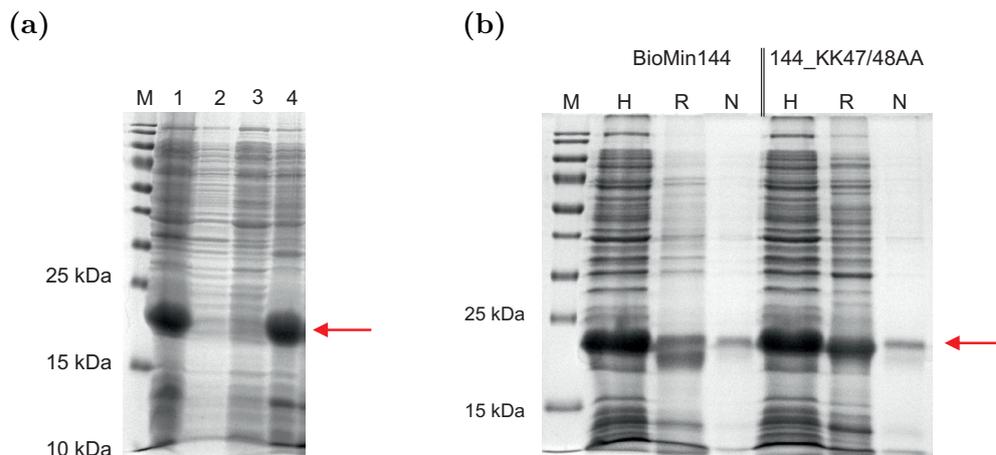
Für die Expression wurde der *E. coli* Stamm M15 [pREP4] gewählt, der für die Expression der pQE-Vektoren von Qiagen empfohlen wird.<sup>81</sup> Wie die SDS-PAGE Analyse in Abbildung 3.14 zeigt, konnte in *E. coli* M15 [pREP4] eine ausreichende Expression von BioMin 144 und der Alaninmutanten gewährleistet werden. Bei 21 kDa sind deutliche Banden erkennbar, welche dem Molekulargewicht der Zielproteine entsprechen (in der Abbildung 3.14 durch den roten Pfeil gekennzeichnet). Für die Mutanten wurde die Expression jeweils für zwei Klone im 3 mL Maßstab getestet (Bahnen 2-9). Als Positivkontrolle für die SDS-PAGE dienten Zellen von BioMin 144 exprimiert bei der BASF SE (Bahn 1).



**Abbildung 3.14:** Expressionsübersicht der Alaninmutanten auf Basis von BioMin 144 in *E. coli* M15 [pREP4]. SDS-Gel von Proteinproben 3 h nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 37 °C und 180 rpm. Aufgetragen sind als Positivkontrolle Zellen von BioMin 144 exprimiert bei der BASF SE (1) sowie die Alaninmutanten K47A-1 (2), K47A-2 (3), H52A-1 (4), H52A-2 (5), KK47/48AA-1 (6), KK47/48AA-2 (7), KK47/48/H52AAA-1 (8), KK47/48/H52AAA-2 (9), Molekulargewichtsstandard (M). Durch den roten Pfeil werden die Zielproteine gekennzeichnet (21 kDa).

### 3 Ergebnisse

Nachdem eine ausreichende Expression der Mutanten in *E. coli* M15 [pREP4] nachgewiesen werden konnte, wurden diese in 500 mL EC3 als *Inclusion bodies* exprimiert (siehe 2.12.1). 4 h nach Induktion mit 0,5 mM IPTG wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und das erhaltene Pellet in TBS-Puffer resuspendiert und mittels Homogenisator aufgeschlossen. Abbildung 3.15a zeigt die SDS-PAGE Analyse der einzelnen Aufarbeitungsschritte. Nach Aufschluss der Zellen mittels Homogenisator ist eine deutliche Bande bei 21 kDa zu erkennen, die dem Zielprotein zuzuordnen ist (Bahn 1). Durch anschließende Zentrifugation wurden lösliche Proteine abgetrennt (Bahn 2). Durch Waschen in TBS-Puffer wurden noch vorhandene Proteine der löslichen Fraktion entfernt (Bahn 3). Das Zielprotein wurde durch Zugabe von 1 M NaOH<sub>aq</sub> auf eine Endkonzentration von 100 mM für 10 min bei Raumtemperatur renaturiert. Die anschließende Einstellung des pH-Wertes auf 7,5 erfolgte durch Titration mit 2% iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Ausgefällene Proteine wurden durch erneute Zentrifugation abgetrennt und das Targetprotein konnte in löslicher Form erhalten werden (Bahn 4). Für die Renaturierung wird an dieser Stelle lediglich die SDS-PAGE Analyse für den Wildtyp gezeigt, die Aufarbeitung der Mutanten lieferte ähnliche Ergebnisse.



**Abbildung 3.15:** (a) Coomassie gefärbtes SDS-Gel (15%) der einzelnen Schritte der Proteinaufarbeitung am Beispiel von BioMin 144. Aufgetragen sind das Homogenisat nach Aufschluss (1), die lösliche Fraktion nach Zentrifugation (2), der Waschschritt mit TBS (3) und Überstand nach Renaturierung mit NaOH und abschließender Zentrifugation (4). (b) Übersicht über die Reinigung des Wildtyps BioMin 144 und der Doppelmutante 144\_KK47/48AA. SDS-Gel von Proteinproben nach Zellaufschluss (H), Renaturierung mit NaOH (R) und nach Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatografie (N). Durch den roten Pfeil werden die Zielproteine gekennzeichnet (21 kDa).

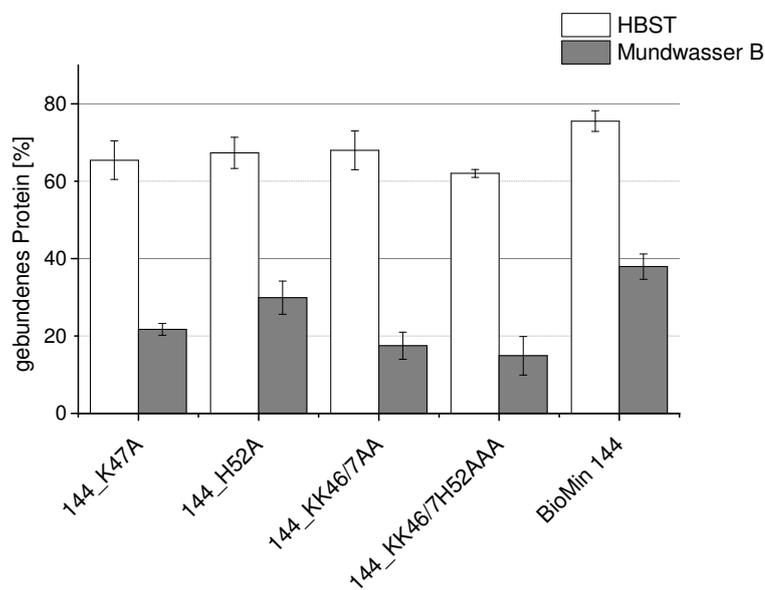
### 3 Ergebnisse

Während die von der BASF SE gestellte Proteinprobe von BioMin 144 eine deutliche Beschleunigung im Nukleationsverlauf in artifiziellem Speichel aufwies (siehe Diagramm 3.14b (S. 74)), zeigte die in dieser Arbeit erstellte Proteinprobe keinen Unterschied im Nukleationsverlauf verglichen mit der Probe ohne Protein. Um eventuell störende Faktoren bzw. Substanzen zu entfernen, wurden die hier erstellten Mutanten ebenso wie der Wildtyp nach Renaturierung über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatografie im Batchverfahren aufgereinigt. Abbildung 3.15b zeigt beispielhaft die einzelnen Aufarbeitungsschritte für den Wildtyp BioMin 144 und die Doppelmutante 144\_KK47/48AA. Die Aufreinigung der übrigen Mutanten lieferte ähnliche Ergebnisse. Dargestellt sind die Proteine nach Zellaufschluss (H), nach Renaturierung (R) und nach  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatografie (N). Die SDS-PAGE Analyse zeigt zum einen den zusätzlichen Reinigungseffekt durch die IMAC (immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie), allerdings auch, dass durch Aufreinigung über die  $\text{Ni}^{2+}$ -Batchsäule ein Großteil des Proteins verloren geht. Die Ausbeute an aufgereinigtem Zielprotein konnte weder durch Variation des Bindepuffers noch der Imidazolkonzentration oder der Inkubationszeit verbessert werden. Die Proteinkonzentrationen befanden sich nach Aufreinigung unter 1 mg/mL.

### 3.2.1.2 Untersuchung der Bindeeigenschaften der BioMin 144-Alaninmutanten an Hydroxylapatit

Die erstellten Mutanten wurden mit 5(6)-Carboxyfluorescein markiert und in Bindeversuchen eingesetzt (siehe 2.13.1 und 2.13.3). In Diagramm 3.15 sind die Bindungsergebnisse zusammengefasst. Für die Bindung in HBST-Puffer zeigten sich nur minimale Unterschiede, die Bindung des Wildtypes BioMin 144 befand sich bei 75 ( $\pm 3$ )%, für die Einfach- und Doppelmutanten im Bereich von 70%. Für die Tripelmutante 144\_KK47/48/H52AAA konnte eine leichte Verschlechterung der Bindung (60 ( $\pm 1$ )%) festgestellt werden. Bei Betrachtung der Bindung in 50% igem Mundwasser B wiesen bereits die Alaninsubstitutionen an Position K47 eine leichte Abnahme in der Bindekapazität auf. Während die Binderate für den Wildtyp bei 37 ( $\pm 3$ )% lag, zeigten sowohl die Einzelmutante 144\_K47A mit 21 ( $\pm 2$ )% als auch die Doppelmutante 144\_KK47/48AA mit 17 ( $\pm 4$ )% eine Verschlechterung in der Bindung in 50% igem Mundwasser B. Für die Tripelmutante wurde lediglich 14 ( $\pm 4$ )% gebundenes Protein detektiert. Die Mutation an Stelle H52 hingegen zeigte mit 30 ( $\pm 4$ )% eine geringe Abnahme in Bezug auf die Bindung in Mundwasser B.

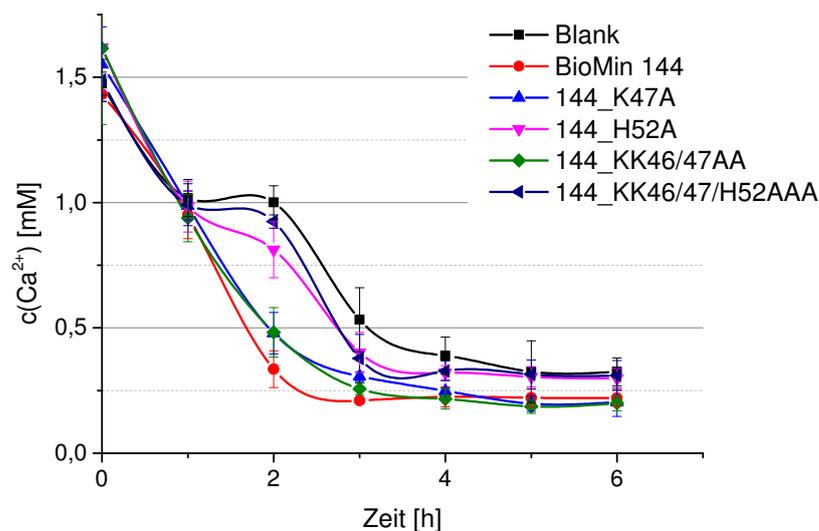
Für das Konstrukt BioMin 144 sind demnach für die Bindung in 50% igem Mundwasser B die positiven Ladungen an den Positionen K47 und K48 von größerer Bedeutung als die Ladung an der Position H52. In HBST-Puffer sind diese Effekte weniger deutlich zu beobachten.



**Diagramm 3.15:** Ergebnisse der Bindungsversuche der erstellten Alaninmutanten und des BioMin 144 Wildtypes. Bindungsversuche wurden mit 2  $\mu$ M 5(6)-Carboxyfluorescein-markiertem Protein an 10 mg Hydroxylapatit in HBST-Puffer (weiße Balken) und 50% igem Mundwasser B (graue Balken) durchgeführt.

### 3.2.1.3 Untersuchung der Nukleationseigenschaften der BioMin 144-Alaninvarianten

Nach Aufreinigung über IMAC und anschließender Dialyse in 5 mM Tris-HCl pH 7,5 wurden die erstellten Alaninmutanten auf ihr Nukleationsverhalten in artifiziellem Speichel hin bewertet (siehe 2.14.3). Wie Diagramm 3.16 zeigt, wies BioMin 144 (rot) eine deutliche Beschleunigung in der Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf verglichen mit der Kontrolle ohne Protein (Blank, schwarz). Innerhalb von zwei Stunden sank die Konzentration von 1,5 mM auf eine stabile Endkonzentration von 0,3 mM. Einen ähnlichen Nukleationsverlauf zeigten die Mutanten 144\_K47A und 144\_KK47/48AA. Für diese Alaninmutanten konnte lediglich eine geringe Verzögerung im Nukleationsverlauf detektiert werden. Nach 2 h lag die Konzentration an freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Lösung noch bei 0,5 mM, nach einer weiteren Stunde wurde die Endkonzentration von 0,3 mM erreicht. Die Mutante 144\_H52A hingegen zeigte eine deutliche Verzögerung in der Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Lösung verglichen mit dem Wildtyp BioMin 144. Nach 2 h lag die  $c(\text{Ca}^{2+})$  noch bei 0,8 mM. Durch Substitution aller drei Aminosäuren durch Alanin (Tripelmutante 144\_KK47/48/H52AAA) wurde dieser Effekt noch weiter verstärkt. Im Gegensatz zu den Bindungsversuchen (3.2.1.2) zeigte die Mutation an Position H52 in den Nukleationsversuchen in artifiziellem Speichel eine deutliche Verschlechterung im Vergleich zum Wildtypkonstrukt BioMin 144. Die positiven Ladungen an den Positionen K47 und K48 sind von geringer Bedeutung für die Nukleation in artifiziellem Speichel.



**Diagramm 3.16:** Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in artifiziellem Speichel in Anwesenheit der BioMin 144-Alaninmutanten, des Wildtypes BioMin 144 (rot) und ohne Protein (schwarz).

## 3.2.2 BioMin 145 Varianten

### 3.2.2.1 Alanin- und Deletionsmutanten

Als weiterer Ausgangspunkt für die Untersuchung durch ortsgerichtete Mutagenese wurde das Konstrukt BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11</sub>-4-DewA) gewählt. BioMin 145, besitzt wie in Abbildung 3.12 (S. 73) gezeigt, dasselbe Grundgerüst wie BioMin 144. Es enthält am N-Terminus eine verkürzte Form der Synthase YaaD (40aaYaaD) und am C-Terminus das Hydrophobin DewA. Zwischen diesen Proteinen befindet sich die Peptidsequenz von P<sub>11</sub>-4, QQRFEWEFEQQ, ein von Kirkham *et al.* rational entworfenes Peptid.<sup>76</sup> Dieses Peptid ist aufgrund seiner Aminosäuresequenz in der Lage, sich durch pH-Änderung oder Änderungen in der Salzkonzentration zu antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern zusammenzulagern. Dies wird durch Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten im Peptid ermöglicht. Die Hydrogelbildung wird zum einen durch hydrophobe Wechselwirkungen der Glutaminreste (Q) an N- und C-Terminus des Peptides, zum anderen durch  $\pi$ - $\pi$ -Stapelkräfte zwischen den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (F) und Tryptophan (W) erreicht. Durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem Arginin an Position 3 und dem Glutamat an Position 9 wird die antiparallele Ausrichtung der Peptide zueinander gewährleistet.<sup>75</sup> Durch das Glutamat an Position 7 erhalten die geformten *Nanotapes* eine negativ geladene Oberfläche, die als Templat für die Nukleation von Hydroxylapatit dient.<sup>76</sup>

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurden ausschließlich die eingeführten Aminosäuren von P<sub>11</sub>-4 in Betracht gezogen. Um die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren auf das Nukleationsverhalten zu ermitteln wurde zunächst ein Alaninscan durchgeführt. Hierfür wurden die Aminosäuren schrittweise durch Alanin substituiert. Es wurden acht Einfachmutanten, drei Doppel- und zwei Tripelmutanten erstellt (Abbildung 3.16a). Ab einer Konzentration von 15 mg/mL bildet P<sub>11</sub>-4 Hydrogele aus. Wie Diagramm 3.14b (S. 74) zeigt, besitzt das Peptid alleine (BioMin 140), in der Konzentration, die in dieser Arbeit für die Nukleationsexperimente verwendet wurde (25  $\mu$ M), keinen Einfluss auf die Nukleation. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass bei dieser Konzentration (25  $\mu$ M  $\equiv$  0,04 mg/mL) die Zusammenlagerung der einzelnen Peptide zu einem makroskopischen Gebilde, welches als Templat für die Nukleation dienen könnte, nicht gewährleistet ist. In BioMin 145 wird die Stabilisierung des Peptids offenbar durch den Fusionspartner DewA gewährleistet. In einem nächsten Schritt sollte daher der für die Nukleation essentielle Bereich innerhalb P<sub>11</sub>-4 identifiziert werden. Hierfür wurden ausgehend von der Peptidsequenz von P<sub>11</sub>-4 schrittweise sowohl N-terminal als auch C-terminal Aminosäuren deletiert (Abbildung 3.16b). Auf diese Weise wurden zwölf Deletionsmutanten erstellt. Die Deletionsvariante 145- $\Delta$ 2 (40aaYaaD-QRFWEFEQQF-DewA) enthält die Sequenz des abgewandelten

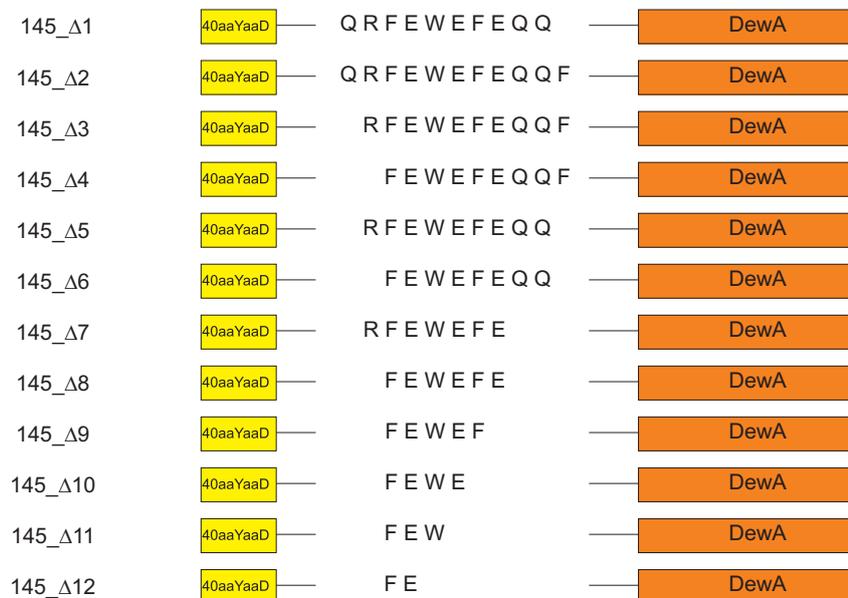
### 3 Ergebnisse

P<sub>11</sub>-4, das als Curodot™ vertrieben wird. Verglichen mit P<sub>11</sub>-4 wurde in diesem Peptid ein N-terminales Glutamin deletiert, C-terminal ein zusätzliches Phenylalanin eingeführt.

(a)



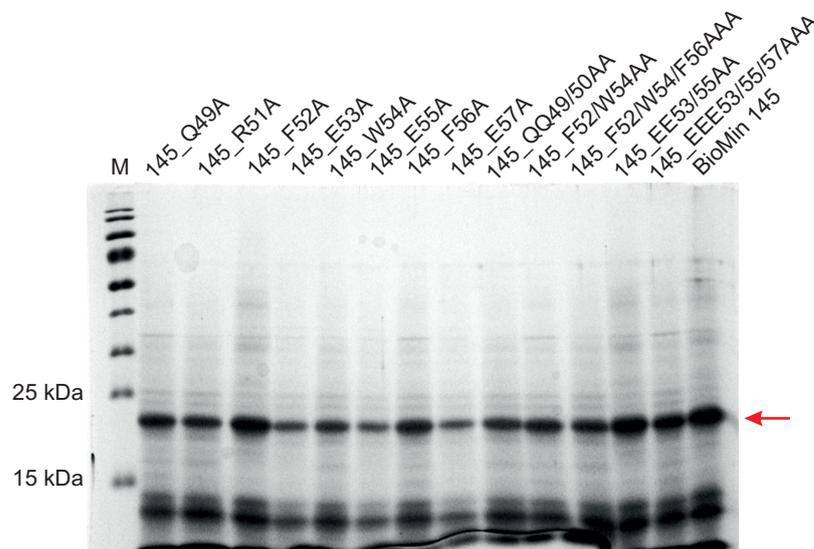
(b)



**Abbildung 3.16:** Schematische Darstellung der erstellten Alaninmutanten (a) und Deletionsmutanten (b) auf Basis von BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11</sub>-4-DewA). Die Peptidsequenz von P<sub>11</sub>-4 sowie die verkürzten Sequenzen sind zwischen der verkürzten Form des YaaD (gelb) und dem Hydrophobin DewA (orange) dargestellt. Alaninsubstitutionen sind rot markiert.

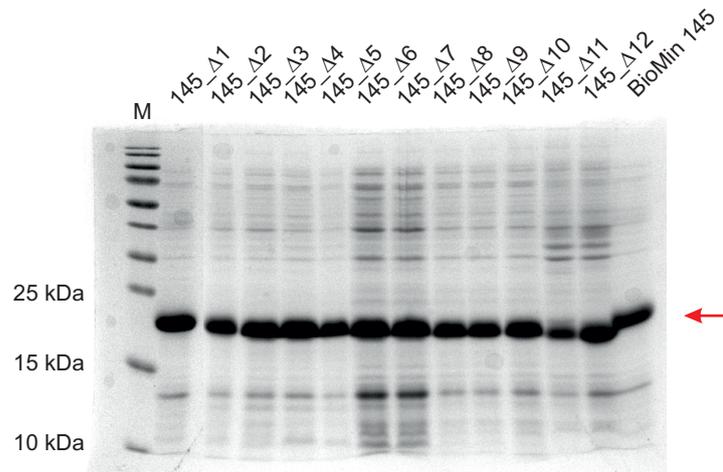
### 3.2.2.1.1 Expression und Renaturierung der BioMin 145-Alanin- und Deletionsmutanten

Wie für die BioMin144-Mutanten wurde für die Expression der Mutanten von BioMin 145 *E. coli* M15 [pREP4] gewählt. Nach Überprüfung einer erfolgreichen Expression im 3 mL-Maßstab, wurde die Expression wie unter 2.12.1 in 500 mL EC3 Medium durchgeführt. Die so gezüchteten Zellen wurden mit dem Homogenisator aufgeschlossen und gemäß dem NaOH-Protokoll renaturiert (siehe 2.12.2). Wie bereits bei der Expression von BioMin 144 zeigte BioMin 145 ebenfalls einen veränderten Nukleationsverlauf im Vergleich zur BASF-Proteinprobe. In verschiedenen Versuchen konnte noch vorhandene DNA als Störfaktor identifiziert werden. Da die Aufreinigung über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatografie zu einem hohen Verlust in der Proteinausbeute geführt hatte, wurde für die Aufarbeitung dieser und aller folgenden BioMin145-Varianten ein DNase I-Verdau gewählt, um vorhandene DNA zu entfernen. Hierfür wurden die Proteinproben nach Renaturierung und Dialyse in 5 mM Tris-HCl pH 7,5 mit DNase I sowie 4 mM  $\text{MgCl}_2$  versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte eine erneute Dialyse in 5 mM Tris-HCl pH 7,5. Alle Mutanten konnten erfolgreich exprimiert werden, die Proteinkonzentrationen lagen im Bereich zwischen 2 - 4 mg/mL (Abbildung 3.17 und 3.18).



**Abbildung 3.17:** Coomassie gefärbtes SDS-Gel (15%) der erstellten Alaninmutanten auf Basis von BioMin 145. Aufgetragen sind die Proteinproben nach Renaturierung und anschließendem DNase I-Verdau. Durch den roten Pfeil werden die Zielproteine gekennzeichnet (21 kDa).

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.18:** Coomassie gefärbtes SDS-Gel (15%) der erstellten Deletionsmutanten auf Basis von BioMin 145. Aufgetragen sind die Proteinproben nach Renaturierung und anschließendem DNase I-Verdau. Durch den roten Pfeil werden die Zielproteine gekennzeichnet (21 kDa).

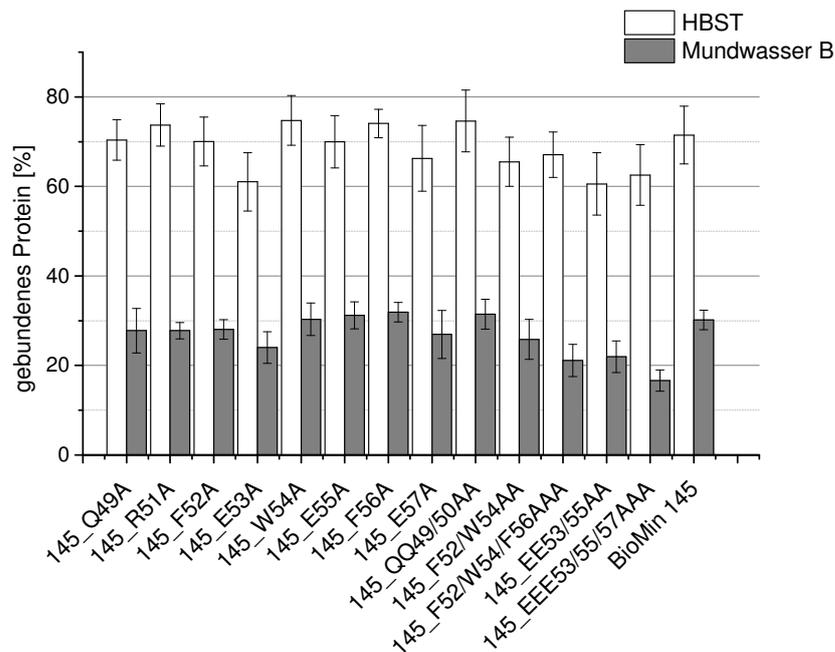
#### 3.2.2.1.2 Untersuchung der Bindeeigenschaften der BioMin 145-Alanin- und Deletionsmutanten an Hydroxylapatit

Um den Einfluss der Alaninsubstitutionen sowie der Deletionen zu untersuchen, wurden die erstellten Mutanten auf ihr Bindevverhalten in HBST-Puffer und 50% igem Mundwasser B hin bewertet. Nach Fluoreszenzmarkierung wurden die Mutanten wie unter 2.13.3 an 10 mg Hydroxylapatit für 2 h, 37 °C gebunden und der Anteil an gebundenem Protein über Messung der Fluorezenzintensitäten bestimmt.

Die Bindungsergebnisse sind in Diagramm 3.17 zusammengefasst. In HBST-Puffer zeigten einfache Alaninsubstitutionen nur einen geringen Einfluss auf die Bindungskapazität des Konstruktes. Für die Bindung des Wildtyps BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11</sub>-4-DewA) konnte ein Anteil von 71 ( $\pm 6$ )% gebundenem Protein detektiert werden. Die Bindung der Einzelmutanten befand sich in einem vergleichbaren Bereich. Lediglich die Alaninsubstitution an der Position E53 resultierte in einer leicht erniedrigten Bindung. Für die Mutante 145\_E53A wurde eine Bindung von 61 ( $\pm 6$ )% nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Bindung der Einfachmutanten in 50% igem Mundwasser B erhalten. Die Bindung des Wildtypkonstruktes BioMin 145 befand sich bei 30 ( $\pm 2$ )%, für die Einfachmutanten wurden Binderaten im Bereich von 28 - 32 % gebundenem Protein detektiert. Wie bereits in HBST-Puffer zeigte auch hier die Mutante 145\_E53A mit 24 ( $\pm 3$ ) % eine Verschlechterung in der Bindekapazität, verglichen mit dem Wildtyp. Die Doppelsubstitution an den Positionen QQ49/50 zeigte keinen Einfluss auf die Bindung. Die Binderaten befanden sich bei 74 ( $\pm 7$ )% in HBST-Puffer bzw. bei 31 ( $\pm 3$ )% in 50% igem Mundwasser

### 3 Ergebnisse

B. Bei Betrachtung der Alaninsubstitutionen an den Positionen der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (F52, F56) und Tryptophan (W54) zeigte sowohl die Doppelmutante 145\_F52/W54AA als auch die Tripelmutante 145\_F52/W54/F56AAA in HBST-Puffer nur eine minimale Verschlechterung in der Bindefähigkeit (66 ( $\pm 5$ )% (145\_F52/W54AA) bzw. 67 ( $\pm 5$ )% (145\_F52/W54/F56AAA)). In den Bindeversuchen in 50 % igem Mundwasser B wurde vor allem für die Tripelmutante 145\_F52/W54/F56AAA eine Verschlechterung in den Bindeeigenschaften (21 ( $\pm 1$ )%) nachgewiesen. In Hinblick auf die negativ geladenen Glutamatreste führte bereits die Doppelsubstitution an den Positionen EE53/55 zu einer geringeren Bindung mit 61 ( $\pm 7$ )% in HBST-Puffer, die Bindekapazität der Tripelmutante befand sich mit 62 ( $\pm 6$ )% im selben Bereich. Deutlicher werden die Unterschiede bei Betrachtung der Bindung in der Mundwasserformulierung. Hier konnte für die Mutante 145\_EE53/55AA noch 22 ( $\pm 2$ )% an gebundenem Protein detektiert werden, für die Tripelmutante lediglich 16 ( $\pm 6$ )%.

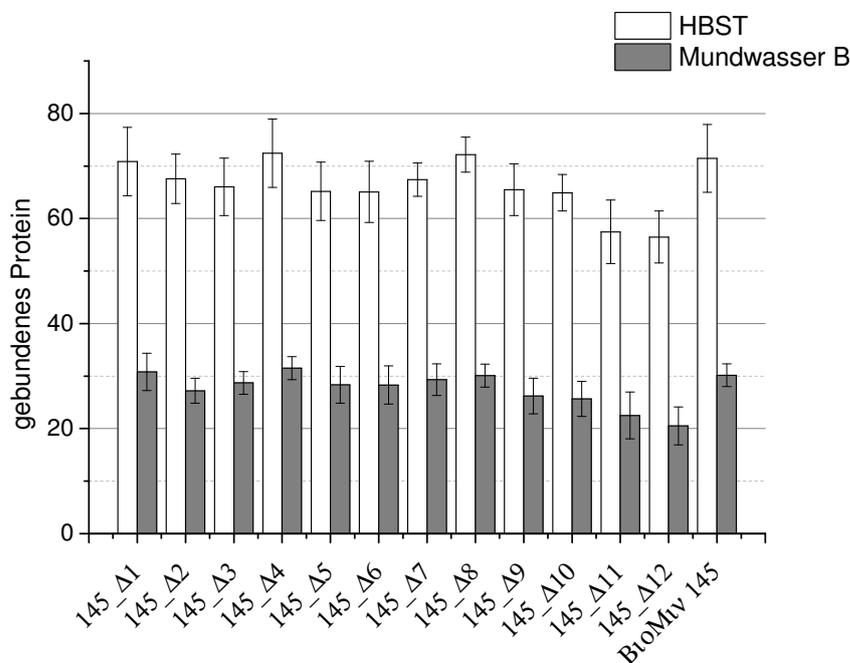


**Diagramm 3.17:** Ergebnisse der Bindungsversuche der erstellten Alaninmutanten auf Basis von BioMin 145 (40YaaD-P<sub>11</sub>-DewA) an 10 mg Hydroxylapatit in HBST (weiß) und 50% igem Mundwasser B (grau).

Für die Deletionsmutanten wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Diagramm 3.18). Sowohl die Glutaminreste an den Positionen 49, 50, 58 und 59 (145\_Δ1, Δ5, Δ7), als auch das Arginin an der Position 51 (145\_Δ6, Δ8) konnten deletiert werden ohne die Bindungsfähigkeit des Konstruktes in HBST-Puffer und der Mundwasserformulierung zu beeinflussen. Mit 65 - 72% in HBST-Puffer und 28 - 30% in der Mundwasserformulierung B befand

### 3 Ergebnisse

sich die Bindung dieser Mutanten im Bereich des Wildtyps (BioMin 145). Auch die C-terminale Einführung eines zusätzlichen Phenylalanins in 145\_Δ2 (sowie 145\_Δ3 und Δ4) zeigte keinen Effekt auf die Bindung. Für diese Mutanten konnten 67 - 72% bzw. 27 - 31% an gebundenem Protein detektiert werden. Die Deletion des negativ geladenen Glutamatrestes in 145\_Δ9 (40aaYaaD-FEWEF-DewA) resultierte jedoch in einer leichten Verringerung der Bindekapazität. In HBST-Puffer wurde ein Anteil an gebundenem Protein von 65(±4)% und 26 (±3)% in Mundwasser B detektiert. Durch weitere Deletion der C-terminalen Aminosäuren Phenylalanin und des zweiten Glutamatrestes in 145\_Δ11 (40aaYaaD-FEW-DewA) wurde die Bindefähigkeit weiter erniedrigt. Die Bindungsergebnisse von 145\_Δ11 befanden sich bei 57 (±6)% in HBST-Puffer und bei 22 (±4)% in 50% igem Mundwasser B.



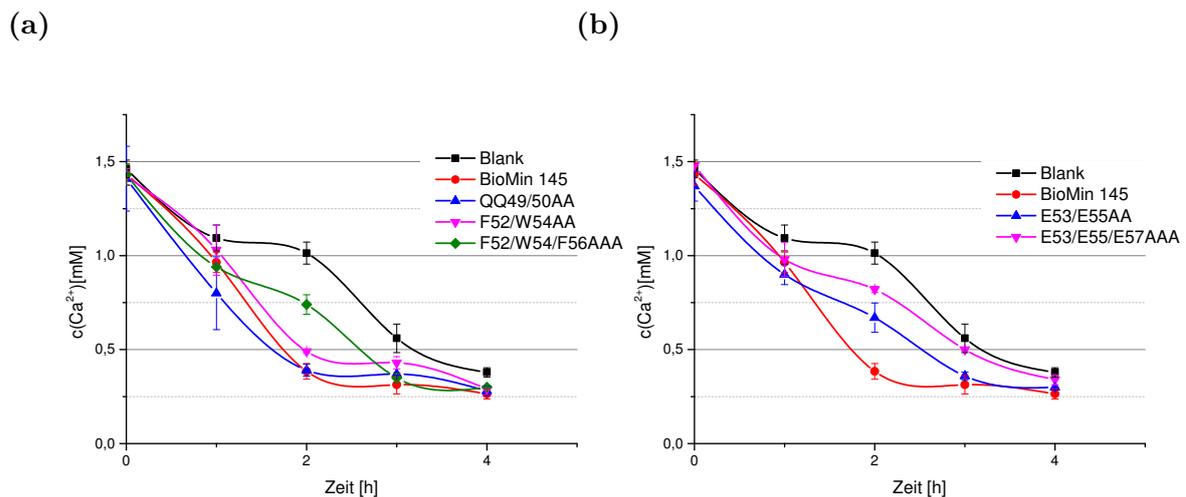
**Diagramm 3.18:** Ergebnisse der Bindungsversuche der erstellten Deletionsmutanten auf Basis von BioMin 145 (40YaaD-P<sub>11</sub>-DewA) an 10 mg Hydroxylapatit in HBST (weiß) und 50% igem Mundwasser B (grau).

Die Analyse der Bindefähigkeit der verschiedenen Alaninvarianten sowie der Deletionsmutanten auf Basis von BioMin 145 (40YaaD-P<sub>11</sub>-4-DewA) hat gezeigt, dass vor allem die negativ geladenen Glutamatreste an den Positionen E53, E55 und E57 einen großen Einfluss auf die Bindekapazität des Konstruktes besitzen. Substitutionen durch Alanin an mehr als einer dieser Stellen oder auch die Deletion einer dieser Aminosäuren resultierte in einer Verschlechterung der Bindefähigkeit.

### 3.2.2.1.3 Untersuchung der Nukleationseigenschaften der BioMin 145-Alanin- und Deletionsmutanten

Die erstellten BioMin 145-Alanin- und Deletionsmutanten wurden neben ihrer Bindefähigkeit auch auf ihr Nukleationsverhalten in artifiziellem Speichel untersucht.

Bezüglich der Nukleationsaktivität konnte für die erstellten Einfachmutanten im Alanin-Scan kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (BioMin 145) festgestellt werden. Ebenso zeigte die Mutante 145\_QQ49/50AA eine vergleichbare Nukleation wie der Wildtyp. Bei Substitution aller drei aromatischen Aminosäuren durch Alanin in der Mutante 145\_F52/W54/F56AAA konnte eine leichte Verzögerung detektiert werden. Während in Proben mit dem Wildtyp BioMin 145 die Präzipitation bereits nach zwei Stunden beendet war, erreichte diese Mutante dieses stabile Niveau erst nach drei Stunden (Diagramm 3.19a). Einen deutlichen Einfluss auf die Nukleationsaktivität konnte für die Substitution von Glutamat durch Alanin verzeichnet werden. Wie Diagramm 3.19b zeigt, besitzt die Doppelmutante 145\_EE53/55AA bereits eine verminderte Nukleationsaktivität. Ähnlich wie die Mutante 145\_F52/W54/F56AAA wurde in Anwesenheit der Mutante 145\_EE53/55AA das stabile Endniveau von 0,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  erst nach drei Stunden erreicht. Noch deutlicher wird dieser Effekt bei Substitution aller drei Glutamatreste. Für die Mutante 145\_EEE53/55/57AAA konnte eine deutliche Verzögerung der Nukleation, im Vergleich zum Wildtyp (BioMin 145), festgestellt werden, die Nukleation verlief ähnlich wie die Kontrolle ohne Protein.

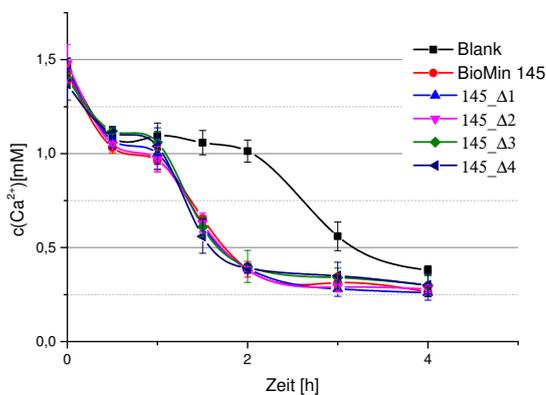


**Diagramm 3.19:** Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in artifiziellem Speichel in Anwesenheit der Alaninmutanten ausgehend von BioMin 145. Dargestellt ist der Einfluss der Doppel- und Tripelmutanten für die Glutaminreste und aromatischen Aminosäuren in (a) und der Doppel- bzw. Tripelmutante für die Glutamatreste (b). In schwarz dargestellt ist die Kontrolle ohne Protein, rot der Nukleationsverlauf für den Wildtyp BioMin 145.

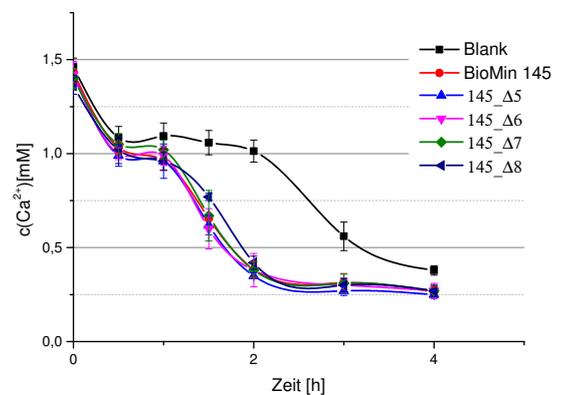
### 3 Ergebnisse

Die Deletionsmutante 145\_Δ2, die das in Curodont aktive Peptid QRFEWEFEQQF enthält, zeigte dasselbe Nukleationsverhalten wie der Wildtyp (BioMin 145). Durch Deletion der N-terminalen Aminosäuren Q und R in 145\_Δ3 bzw. 145\_Δ4 wurde die Nukleationsfähigkeit ebenfalls nicht beeinträchtigt (Diagramm 3.20a). Entsprechendes gilt für die Deletionsmutanten 145\_Δ5 bzw. 145\_Δ6, die C-terminal kein zusätzliches Phenylalanin enthalten. Auch die Deletion der C-terminalen Glutaminreste in 145\_Δ7 bzw. 145\_Δ8 zeigte keine Verschlechterung des Nukleationsverhaltens (Diagramm 3.20b).

(a)



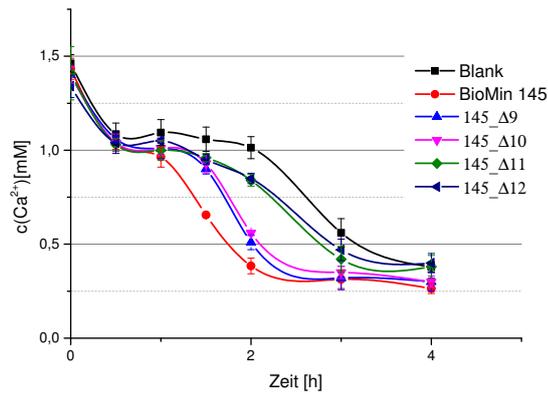
(b)



**Diagramm 3.20:** Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in artifiziellem Speichel in Anwesenheit der Deletionsmutanten 145\_Δ1 - Δ4 (a) und 145\_Δ5 - Δ8 (b) ausgehend von BioMin 145. In schwarz dargestellt ist die Kontrolle ohne Protein, rot der Nukleationsverlauf für den Wildtyp BioMin 145.

Die Deletion des C-terminalen Glutamatrestes in 145\_Δ9 (40aaYaaD-FEWEF-DewA) führte hingegen zu einer detektierbaren Verschlechterung in den Nukleationseigenschaften. Die Deletion eines weiteren Glutamatrestes in 145\_Δ11 (40aaYaaD-FEW-DewA) resultierte im fast vollständigen Verlust der Nukleationsaktivität. Die Nukleation verlief in Anwesenheit von 145\_Δ11 ähnlich wie die Kontrolle ohne Protein (Blank). Nach 2 h befand sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration noch bei 0,84 mM, wohingegen in Anwesenheit des Wildtyps BioMin 145 eine Konzentration von 0,38 mM in der Nukleationlösung detektiert werden konnte. Die Deletion der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (F) in 145\_Δ10 (40aaYaaD-FEWE-DewA) und Tryptophan (W) in 145\_Δ12 (40aaYaaD-FE-DewA) führten zu keiner weiteren Verschlechterung. (Diagramm 3.21).

### 3 Ergebnisse

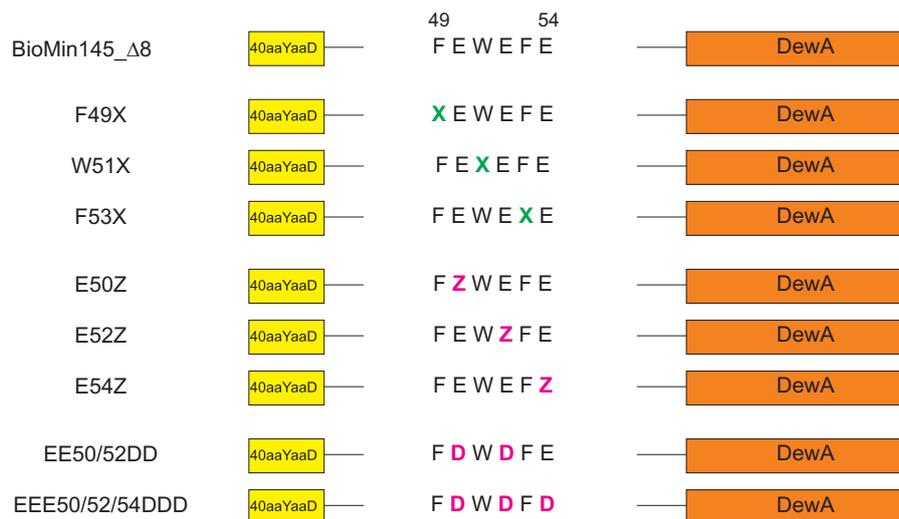


**Diagramm 3.21:** Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in artifiziellem Speichel in Anwesenheit der Deletionsmutanten 145\_Δ9-12 ausgehend von BioMin 145. In schwarz dargestellt ist die Kontrolle ohne Protein, rot der Nukleationsverlauf für den Wildtyp BioMin 145.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenz von P<sub>11-4</sub> innerhalb des Konstruktes BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11-4</sub>-DewA) auf die sechs Aminosäuren F E W E F E in 145\_Δ8 reduziert werden kann, ohne die Nukleationsaktivität des Konstruktes zu beeinflussen (Diagramm 3.20b). Durch weitere Deletion der Glutamatreste in 145\_Δ9 und 145\_Δ11 hingegen geht die Nukleationsfähigkeit schrittweise verloren (Diagramm 3.21). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Alaninmutationen. Hier zeigten die Substitutionen an den Positionen E53, E55 und E57 durch Alanin die deutlichsten Effekte bezüglich der Nukleationsaktivität (Diagramm 3.19b).

## 3.2.2.2 Fokussierte Bibliothek

Im vorherigen Abschnitt war das Hauptaugenmerk auf die Bedeutung der in P<sub>11-4</sub> enthaltenen Aminosäuren gelegt. Durch Untersuchung der Deletionsvarianten konnte für die Deletionsmutante 145\_Δ8, die von den ursprünglich elf Aminosäuren noch sechs (FEWEFE) enthält, eine wildtyp-ähnliche Nukleationsaktivität nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt wurde nun versucht, die Nukleationsaktivität weiter zu steigern. Hierfür wurde auf Basis der verkürzten Sequenz FEWEFE in 145\_Δ8 eine fokussierte Bibliothek erstellt (Abbildung 3.19). Dabei wurden zum einen die negativ geladenen Glutamatreste an den Positionen 50, 52 und 54 durch das ungeladene Homolog Glutamin (Q) ersetzt. Zum anderen wurden diese durch das ebenfalls negativ geladene, jedoch eine kürzere Seitenkette besitzende Aspartat substituiert. Ausgehend von der Substitution E50D wurde weiterhin eine Doppelmutante (EE50/52DD) und eine Tripelmutante (EEE50/52/54DDD) erstellt. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (F) an den Positionen 49, 53 sowie das Tryptophan an Position 51 wurden durch Histidin (H) substituiert, um eine positiv geladene Aminosäure einzuführen. Außerdem wurde an diesen Positionen ein Tyrosin eingeführt, um den Einfluss einer hydroxylierten Aminosäure zu untersuchen. Um mögliche Unterschiede von Aminosäuren mit aromatischen und nicht-aromatischen Seitenketten auf die Nukleation von Hydroxylapatit zu ermitteln, wurden an den Positionen 49, 51 und 53 außerdem die Aminosäuren Arginin (R, positiv geladen), Serin (S, hydroxyliert) und Valin (V, ungeladen) eingeführt.

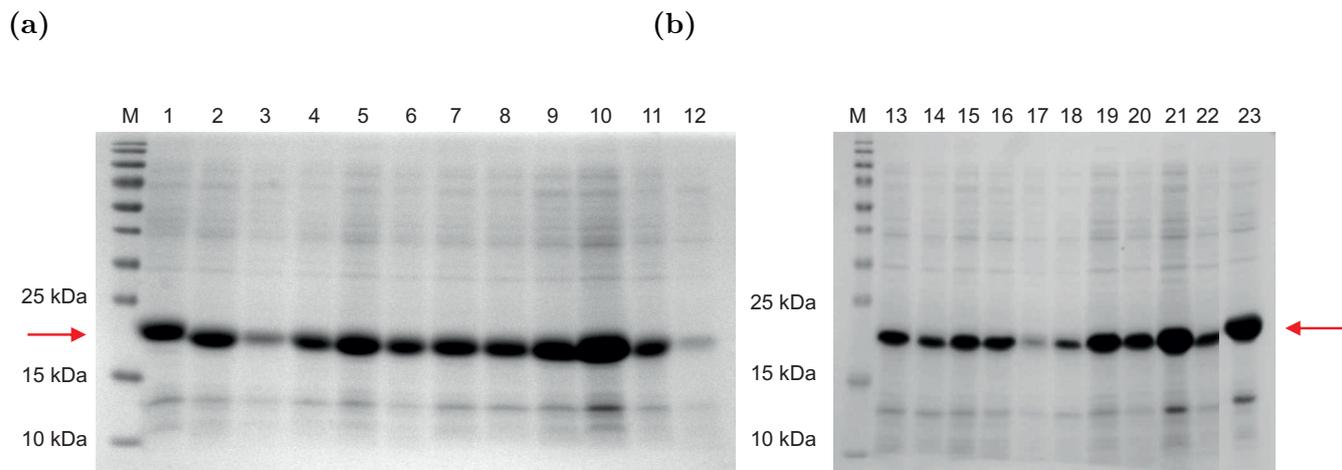


**Abbildung 3.19:** Schematische Darstellung der erstellten fokussierten Bibliothek auf Basis der verkürzten Mutante 145\_Δ8. Substitutionen der aromatischen Aminosäuren F49, W51 und F53 sind grün gekennzeichnet, dabei ist X = R, H, S, Y, V. Substitutionen an den Glutamatresten E50, E52 und E54 sind pink gekennzeichnet, dabei ist Z = Q, D. Außerdem wurden eine Doppel- (EE50/52DD) und eine Tripelmutante (EEE50/52/54DDD) erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2.2.2.1 Expression und Renaturierung der fokussierten Bibliothek

Die gewünschten Mutationen wurden über die QuikChange Methode eingeführt und konnten durch Sequenzierung bestätigt werden. Lediglich die Mutante E54Q konnte nicht generiert werden. Die insgesamt 22 Mutanten der fokussierten Bibliothek wurden in 100 mL EC3 Medium exprimiert. 4 h nach Induktion mit 0,5 mM IPTG wurden die Zellen geerntet und mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach Renaturierung mit NaOH wurde vorhandene DNA durch DNase I verdaut (siehe 2.12.2). Die Proteinkonzentrationen befanden sich nach Aufarbeitung im Bereich von 1,5 - 3 mg/mL (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20:** Expressionsübersicht der fokussierten Bibliothek auf Basis der Deletionsmutante 145\_Δ8. Dargestellt sind die Proteine nach Renaturierung; in (a) BioMin 145 (1), E50D (2), E52D (3), E54D (4), EE50/52DD (5), EEE50/52/54DDD (6), F49Y (7), W51Y (8), F53Y (9), F49S (10), W51S (11), F53S (12); in (b) E50Q (13), E52Q (14), F49H (15), W51H (16), F53H (17), F49R (18), W51R (19), F53R (20), F49V (21), W51V (22), F53V (23). Durch den roten Pfeil werden die Zielproteine gekennzeichnet (21 kDa).

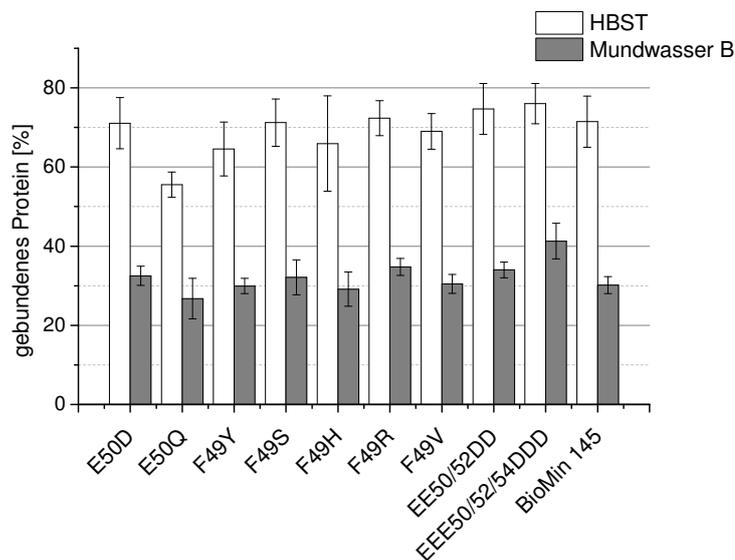
#### 3.2.2.2.2 Untersuchung der Bindeeigenschaften der fokussierten Bibliothek

Ziel der fokussierten Bibliothek war die Steigerung der Nukleationsaktivität des Konstruktes. Dennoch wurden ausgewählte Mutanten, nach Expression und Fluoreszenzmarkierung, auf ihre Bindevverhalten an Hydroxylapatit hin bewertet. Es wurde stellvertretend für die einzuführenden Aminosäuren jeweils nur die Substitution an Position F49 bzw. E50 sowie die Doppelmutante EE50/52DD und die Tripelmutante EEE50/52/54DDD untersucht (Diagramm 3.22). Bei Betrachtung der Bindungsergebnisse ist auffallend, dass die Einführung der funktionellen Gruppen durch eine Aminosäure mit einer aromatischen

### 3 Ergebnisse

Seitenkette (Y/H) jeweils zu einer leicht verminderten Bindefähigkeit führte verglichen mit der Einführung der entsprechenden nicht-aromatischen Aminosäure (R/S). So befand sich die Bindung für die Mutanten F49Y bzw. F49H bei 64 ( $\pm 6$ )% bzw. 66 ( $\pm 6$ )% in HBST-Puffer, für die entsprechenden Mutanten F49S bzw. F49R konnte eine Bindung von 71 ( $\pm 6$ )% bzw. 72 ( $\pm 4$ )% detektiert werden. Ähnliches konnte bei den Bindeversuchen in der Mundwasserformulierung B beobachtet werden. Während die Bindung der Mutante F49H bei 29 ( $\pm 4$ )% lag, konnte für die Mutante F49R eine leicht erhöhte Bindefähigkeit von 34 ( $\pm 2$ )% detektiert werden. Die Substitution durch Valin an der Position 49 hatte keinen Einfluss auf die Bindefähigkeit.

Die Substitution des Glutamatrestes an der Position E50 durch das ungeladene Glutamin bewirkte eine signifikante Verminderung der Bindefähigkeit. In HBST-Puffer konnten 55 ( $\pm 3$ )%, in der Mundwasserformulierung lediglich 26 ( $\pm 4$ )% detektiert werden. Im Gegensatz zur Substitution durch das ungeladene Glutamin, führte die einfache Substitution durch das negativ geladene, jedoch etwas kleinere Aspartat zu keiner Veränderung in der Bindefähigkeit in HBST-Puffer (71 ( $\pm 6$ )%). In der Mundwasserformulierung wurde für die Mutante E50D eine minimale Verbesserung der Bindefähigkeit von 30 ( $\pm 2$ )% auf 33 ( $\pm 2$ )% beobachtet. Der simultane Austausch von Glutamat durch Aspartat an den Positionen E50 und E52 bewirkte eine leichte Steigerung der Bindekapazität. Für die Mutante EE50/52DD konnten in HBST-Puffer eine Bindung 74 ( $\pm 4$ )%, in der Mundwasserformulierung 34 ( $\pm 2$ )% gezeigt werden. Durch zusätzlichen Austausch des Glutamatrestes an der Position E54 durch Aspartat in der Dreifachmutante EEE50/52/54DDD konnte die Bindung auf 76 ( $\pm 4$ )% bzw. 41 ( $\pm 4$ )% in HBST-Puffer bzw. 50% igem Mundwasser B gesteigert werden.

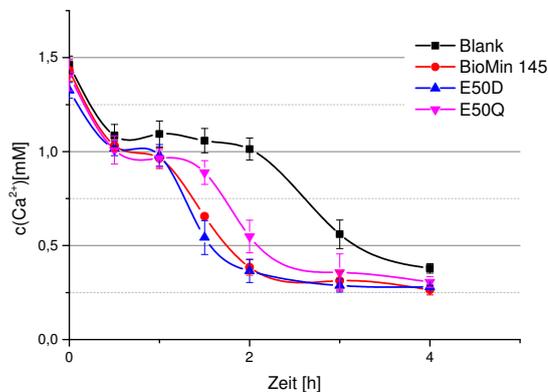


**Diagramm 3.22:** Bindungsübersicht der fokussierten Bibliothek an 10 mg Hydroxylapatit in HBST (weiß) und 50% igem Mundwasser B (grau). Es wurde jeweils nur ein Vertreter pro eingeführter Aminosäure auf sein Bindeverhalten hin untersucht.

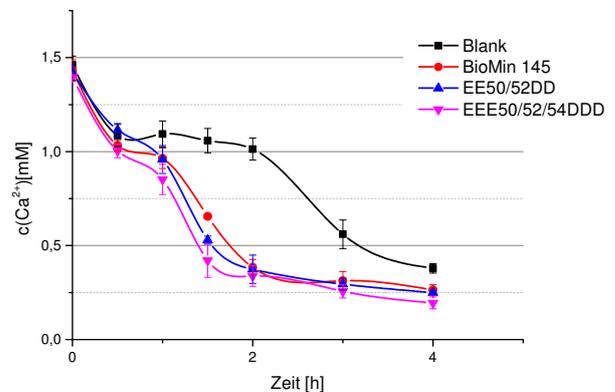
### 3.2.2.2.3 Untersuchung der Nukleationseigenschaften der fokussierten Bibliothek

Durch die erstellten Mutanten der fokussierten Bibliothek sollte vor allem der Einfluss der unterschiedlichen Aminosäuren und der damit eingeführten Funktionalitäten auf das Nukleationsverhalten untersucht werden. Die Substitution der negativ geladenen Glutamatreste durch das ungeladene Homolog Glutamin resultierte in einer deutlichen Verzögerung im Nukleationsverlauf. Dies ist in Abbildung 3.23a beispielhaft für die Mutante E50Q dargestellt. Der Austausch der einzelnen Glutamatreste E50, E52 und E54 durch das ebenfalls negativ geladene Aspartat (D) führte bereits zu einer leichten Beschleunigung der Nukleation verglichen mit dem Wildtypkonstrukt BioMin 145 (in Abbildung 3.23a durch die Mutante E50D dargestellt). Deutlicher zu erkennen ist dies bei Betrachtung der Doppelmutante (EE50/52DD) bzw. der Tripelmutante (EEE50/52/54DDD) (Diagramm 3.23b). Die Doppelmutante EE50/52DD wies bereits eine beschleunigte Nukleation auf, dieser Effekt konnte durch Substitution des dritten Glutamatrestes mit Aspartat an der Position E54 weiter verstärkt werden.

(a)



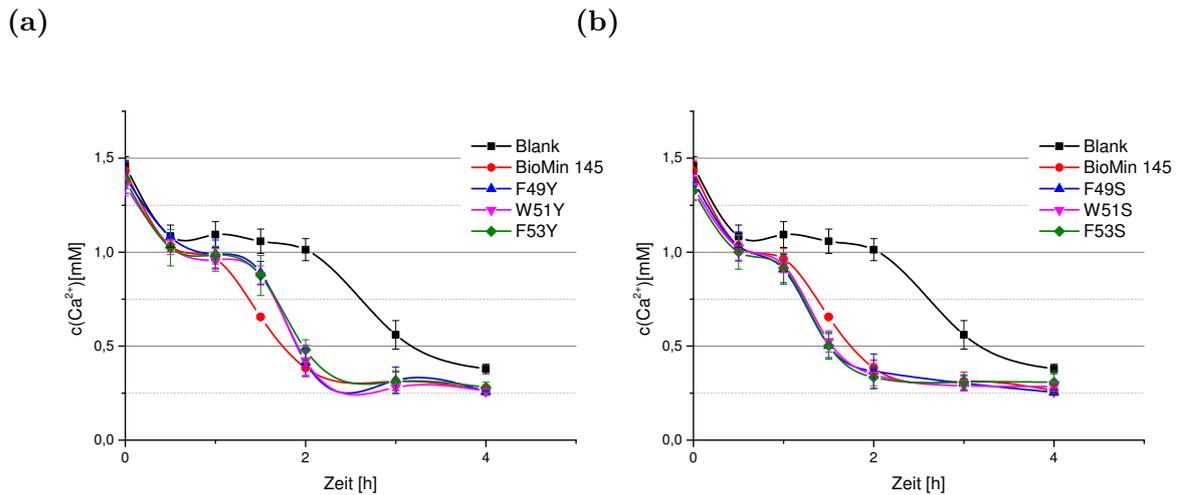
(b)



**Diagramm 3.23:** Abnahme in der Calciumkonzentration in artifiziellem Speichel in Gegenwart der Mutanten der fokussierten Bibliothek. Dargestellt sind Mutanten mit einfacher Substitution an Position E50 (a) und die Doppelmutante EE50/52DD bzw. Tripelmutante EEE50/52/54DDD (b) jeweils im Vergleich zur Kontrolle ohne Protein (Blank).

### 3 Ergebnisse

In Hinblick auf die aromatischen Aminosäuren F49, W51 und F53 führte die Substitution durch das nicht-aromatische, ungeladene Valin (V) zu keiner Veränderung im Nukleationsverhalten. Die Einführung der hydroxylierten Aminosäuren Tyrosin (Y) und Serin (S) resultierte für das aromatische Tyrosin in einer Verzögerung der Nukleation. Im Gegensatz dazu führten die Substitutionen durch Serin an den Stellen F49, W51 bzw. F53 in allen drei Fällen zu einer Beschleunigung im Nukleationsverlauf (Diagramm 3.24b).

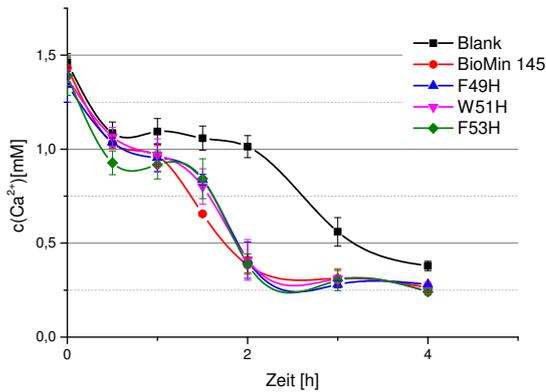


**Diagramm 3.24:** Abnahme der Calciumkonzentration in artifiziellem Speichel in Gegenwart der Mutanten der fokussierten Bibliothek. Dargestellt sind Mutanten mit Substitution an den Position F49, W51, F53 durch die hydroxylierten Aminosäuren Tyrosin (a) und Serin (b) jeweils im Vergleich zur Kontrolle ohne Protein (Blank).

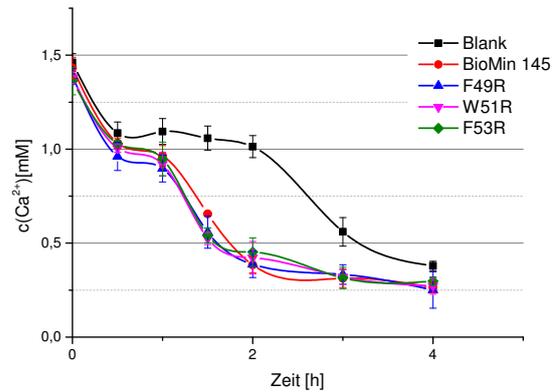
Die Einführung von Histidin an den Positionen F49, W51 und F53 führte zu einer leichten Verzögerung im Nukleationsverlauf (Diagramm 3.25a). Die Substitution durch das ebenfalls positiv geladene Arginin resultierte in einer leichten Beschleunigung in der Nukleation (Diagramm 3.25b). Dies lässt den Schluss zu, dass in dem Konstrukt 145\_Δ8 nicht-aromatische Aminosäuren (R, S) einen beschleunigendere Wirkung auf die Nukleation besitzen als Aminosäuren, die einen Aromaten (H, Y) in der Seitenkette aufweisen.

### 3 Ergebnisse

(a)



(b)

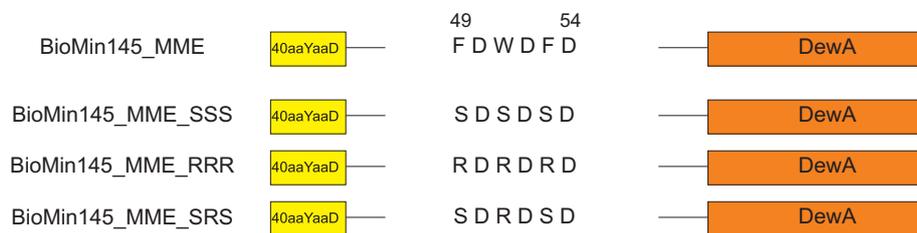


**Diagramm 3.25:** Abnahme der Calciumkonzentration in artifiziellem Speichel in Gegenwart der Mutanten der fokussierten Bibliothek. Dargestellt sind Mutanten mit Substitutionen an den Position F49, W51, F53 durch die positiv geladenen Aminosäuren Histidin (a) und Arginin (b) jeweils im Vergleich zur Kontrolle ohne Protein (Blank).

Durch Untersuchung der fokussierten Bibliothek konnten weitere Erkenntnisse über den Einfluss verschiedener Aminosäuren auf die Nukleation erlangt werden. So konnte durch die Bewertung der Mutanten E50Q und E52Q nochmals gezeigt werden, dass eine negative Ladung an diesen Stellen von großer Bedeutung für die Nukleation in artifiziellem Speichel ist. Wird diese Ladung durch Aspartat ausgetauscht, zeigte sich eine Beschleunigung der Nukleation verglichen mit Glutamat. Ebenfalls resultierte die Einführung einer hydroxylierten sowie einer positiv geladenen Aminosäure an den Positionen 49, 51 und 53 in einer verstärkten Nukleation. Dieser Effekt wird jedoch nur bei Einführung nicht-aromatischer Aminosäuren beobachtet. Dabei konnte allerdings kein Unterschied zwischen den verschiedenen Positionen festgestellt werden.

### 3.2.2.3 Kombinationsvarianten

Auf Basis dieser Erkenntnisse, dass sich nicht-aromatische, geladene oder hydroxylierte Aminosäuren positiv auf die Nukleation auswirken, wurden weitere Mutanten erstellt. Mutationen, die bei Untersuchung der fokussierten Bibliothek einen beschleunigenden Effekt auf die Nukleation gezeigt hatten, wurden in einem weiteren Schritt kombiniert. Hierfür wurden in die Mutante EEE50/52/54DDD (hier und im folgenden als BioMin 145\_MME bezeichnet) an Stelle der aromatischen Aminosäuren F49, W51 und F53 zum einen Serinreste eingeführt und in einer zweiten Mutante durch Arginin ersetzt. Eine Kombination aus Serin und Arginin wurde ebenfalls erstellt (Abbildung 3.21).

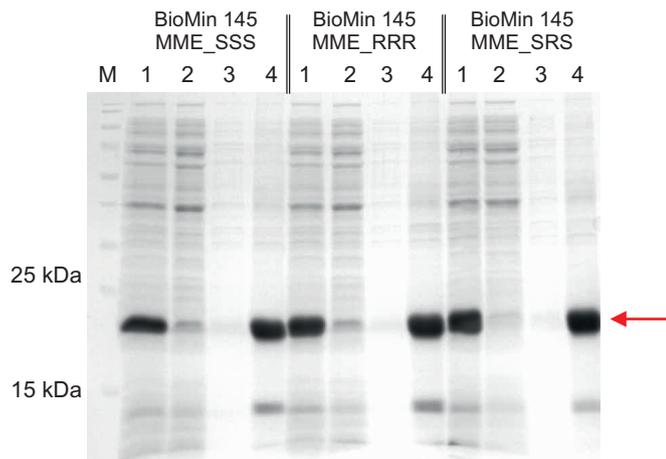


**Abbildung 3.21:** Schematische Darstellung der erstellten Kombinationsmutanten auf Basis von BioMin 145\_MME (40aaYaaD-FDWDFD-DewA).

#### 3.2.2.3.1 Expression und Renaturierung der Kombinationsmutanten

Die Expression der drei Kombinationsmutanten erfolgte in 100 mL EC3 Medium. 4 h nach Induktion mit 0,5 mM IPTG bei 37 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Das erhaltene Zellpellet wurde durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die Zielproteine gemäß 2.12.2 renaturiert. Abbildung 3.22 zeigt die SDS-PAGE Analyse der einzelnen Aufarbeitungsschritte für die Kombinationsmutanten. Nach Renaturierung und DNase I-Verdau konnten die Zielproteine in löslicher Form erhalten werden (Bahn 4). Die Proteinkonzentrationen befanden sich im Bereich von 2,0 - 3,0 mg/mL (Abbildung 3.22).

### 3 Ergebnisse

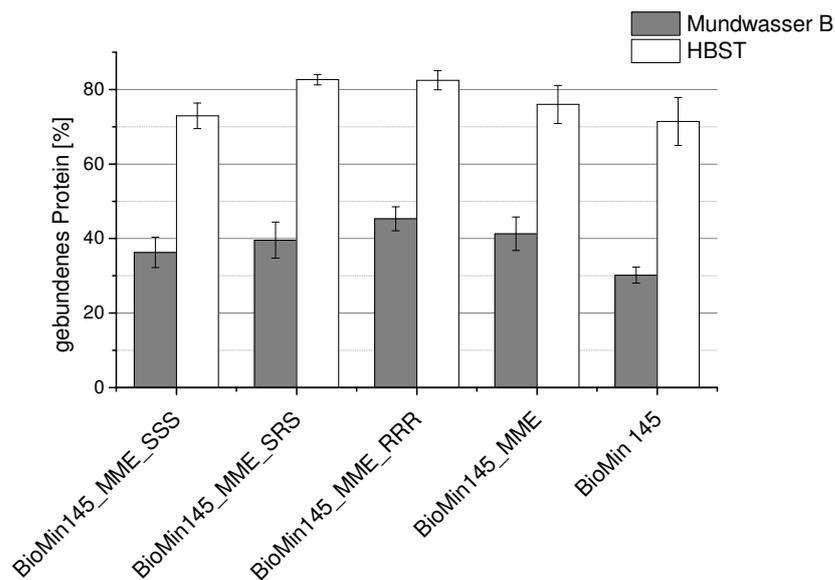


**Abbildung 3.22:** Coomassie gefärbtes SDS-Gel (15%) der Aufarbeitungsschritte der Kombinationsmutanten. Aufgetragen sind für die Variante BioMin 145\_MME\_SSS, BioMin 145\_MME\_RRR und BioMin 145\_MME\_SRS das Homogenisat (1), die lösliche Fraktion (2), der Waschschriff in TBS-Puffer (3) und das Protein nach Renaturierung (4). Durch den roten Pfeil werden die Zielproteine gekennzeichnet (21 kDa).

#### 3.2.2.3.2 Untersuchung der Bindeeigenschaften der Kombinationsvarianten

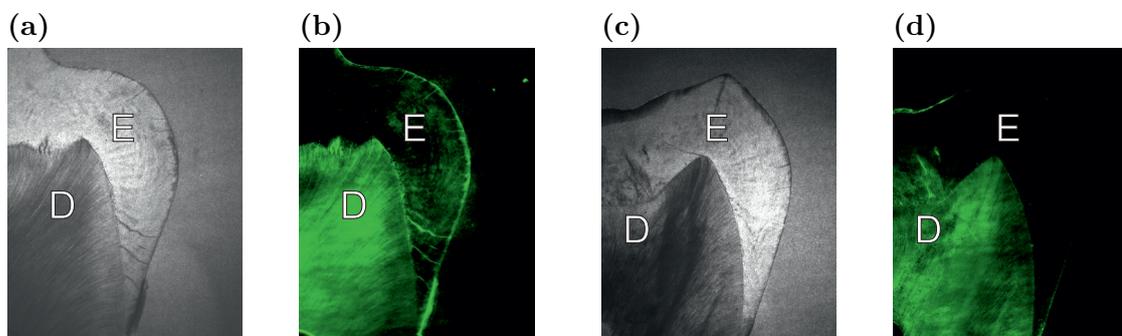
Die Untersuchung der Kombinationsmutanten bezüglich ihrer Bindeeigenschaften an Hydroxylapatit zeigte eine weitere Verbesserung für die Mutanten BioMin 145\_MME\_SRS und BioMin 145\_MME\_RRR gegenüber der Mutante BioMin 145\_MME. In beiden Fällen konnte die Bindung in HBST-Puffer von 76 ( $\pm 4\%$ ) auf ca. 82% gesteigert werden. In Hinblick auf die Bindung in Mundwasser B wies lediglich die Mutante BioMin 145\_MME\_RRR eine weitere Verbesserung auf. Während für die Mutante BioMin 145\_MME eine Bindung von 41 ( $\pm 3\%$ ) detektiert wurde, lag der Wert für die Kombinationsmutante BioMin 145\_MME\_RRR bei 45 ( $\pm 3\%$ ). Für die Mutante BioMin 145\_MME\_SRS wurde in Mundwasser B keine weitere Verbesserung detektiert (40 ( $\pm 4\%$ )). Im Gegensatz hierzu zeigte die Kombination aus Aspartat und Serin in der Mutante BioMin 145\_MME\_SSS verglichen mit BioMin 145\_MME eine geringere Bindefähigkeit gegenüber Hydroxylapatit. Mit 72 ( $\pm 2\%$ )% gebundenem Protein in HBST-Puffer bzw. 33 ( $\pm 4\%$ )% in der Mundwasserformulierung befindet sich die Bindefähigkeit dieser Mutante unter den Werten, die für die Mutante BioMin 145\_MME detektiert worden waren, jedoch in einem vergleichbaren Bereich wie für den Wildtyp BioMin 145 (70 ( $\pm 2\%$ )% bzw. 30 ( $\pm 2\%$ )).

### 3 Ergebnisse



**Diagramm 3.26:** Ergebnisse der Bindungsversuche der erstellten Kombinationsvarianten und des BioMin 145 Wildtypes. Bindungsversuche wurden mit 2  $\mu$ M 5(6)-Carboxyfluorescein-markiertem Protein an 10 mg Hydroxylapatit in HBST-Puffer (weiße Balken) und 50% igem Mundwasser B (graue Balken) durchgeführt.

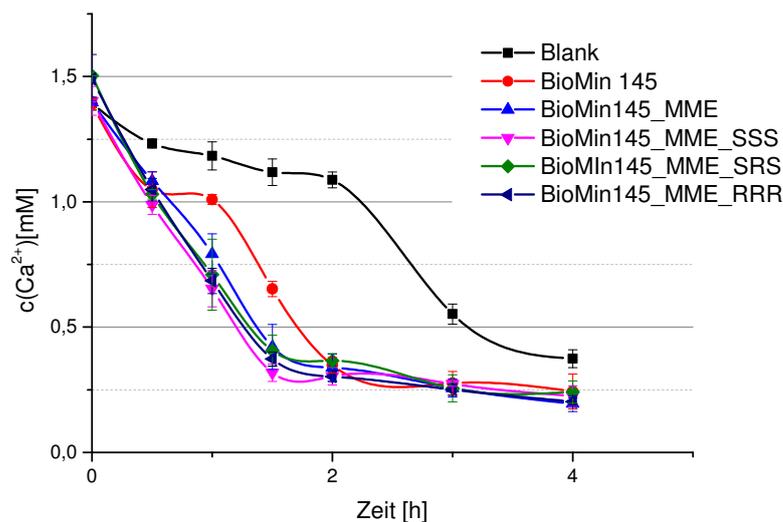
Die erstellten Kombinationsmutanten wurden neben ihrer Bindeeigenschaft an Hydroxylapatitpulver auch an menschliche Zahnschnitte in 50% igem Mundwasser B gebunden. Gebundene Proteine wurden nach Inkubation für 2 h bei 37 °C und fünfmaligem Waschen unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Abbildung 3.23 zeigt die entsprechenden Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen. Wie bereits bei vorherigen Bindeversuchen an Zahnschnitte konnte auch für die hier untersuchten Mutanten lediglich eine Bindung an das Dentin (D), nicht aber an das härtere Enamel (E) nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.23:** Menschliche Zahnschnitte nach Bindung der Kombinationsmutanten BioMin 145\_MME\_SSS (a)/(b) und BioMin 145\_MME\_RRR (c)/(d) in 50% igem Mundwasser B. (a)/(c) zeigen Durchlichtaufnahmen, (b)/(d) die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen. Die unterschiedlichen Kompartimente Dentin (D) und Enamel (E) sind durch die weißen Buchstaben gekennzeichnet.

### 3.2.2.3.3 Untersuchung der Nukleationseigenschaften der Kombinationsmutanten

Neben der Bindung war das Hauptaugenmerk auf den Einfluss der Mutationen auf das Nukleationsverhalten gelegt. Die neu erstellten Kombinationsvarianten wurden daher auf ihre Nukleationseigenschaften in artifiziellem Speichel hin untersucht (Diagramm 3.27). Im Gegensatz zu den Bindeversuchen zeigte hier die Kombination aus Aspartat und Serin in der Variante BioMin 145\_MME\_SSS (40aaYaaD-(SD)<sub>3</sub>-DewA) eine leichte Beschleunigung in der Mineralbildung verglichen mit der Variante BioMin 145\_MME (40aaYaaD-FDWDFD-DewA). Für die beiden anderen Kombinationsmutanten BioMin 145\_MME\_SRS (40aaYaaD-SDRDSD-DewA) und BioMin 145\_MME\_RRR (40aaYaaD-(RD)<sub>3</sub>-DewA) wurde ebenfalls eine leichte Steigerung der Nukleationsaktivität detektiert.

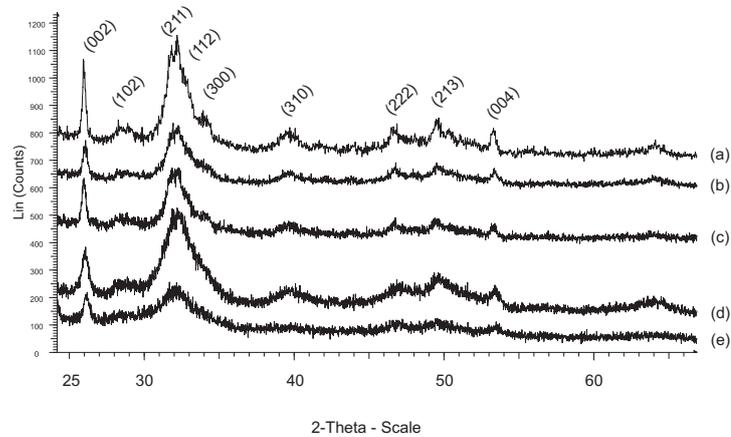


**Diagramm 3.27:** Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in artifiziellem Speichel in Anwesenheit der Kombinationsmutanten im Vergleich mit der Kontrolle ohne Protein (Blank).

Die während der Nukleation gebildeten Präzipitate wurden über Pulverdiffraktometrie analysiert. Die Analyse lieferte für die drei Kombinationsvarianten als auch die Mutante BioMin 145\_MME die für Hydroxylapatit charakteristischen Signale (Abbildung 3.24). Für die Kombinationsvarianten ((a)-(c)) und die Mutante BioMin 145\_MME (d) wurden Signale bei  $2\Theta = 25,9^\circ$ ,  $2\Theta = 31,8^\circ$  sowie  $2\Theta = 32,2^\circ$  detektiert, die den kristallografischen (002) und (211) bzw. (112) Flächen in Hydroxylapatit entsprechen. Mit den Kombinationsvarianten war es demnach möglich das Fusionskonstrukt BioMin 145 in Hinblick

### 3 Ergebnisse

auf eine beschleunigte Nukleation zu optimieren, ohne dabei die Fähigkeit zur Bildung von Hydroxylapatit zu verlieren.



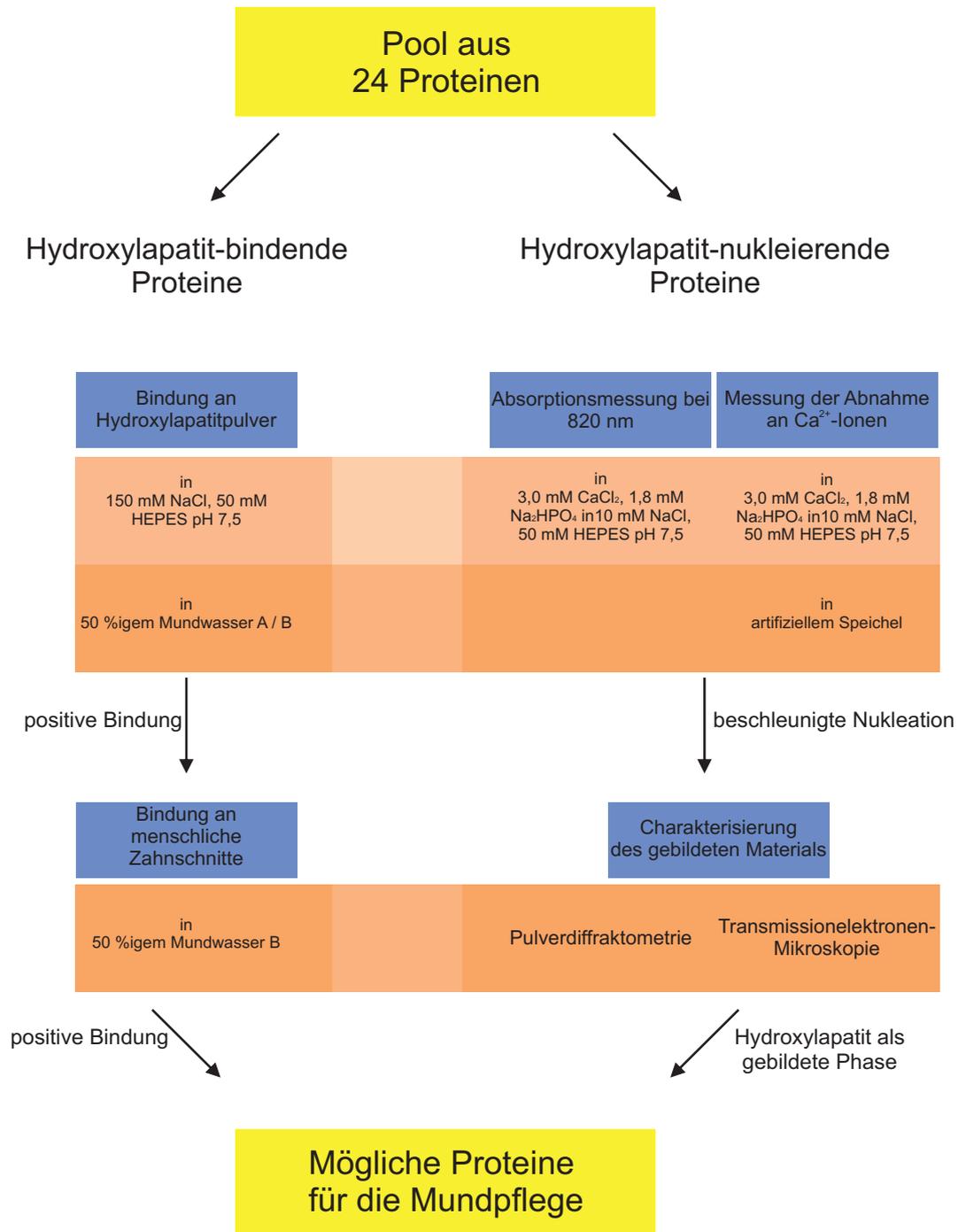
**Abbildung 3.24:** Pulverdiffraktogramm des während der Nukleationsexperimente in artifiziellem Speichel gebildeten Präzipitates in Anwesenheit der Kombinationsmutanten BioMin 145\_MME\_SSS (a), BioMin 145\_MME\_SRS (b), BioMin 145\_MME\_RRR (c), der Mutanten BioMin 145\_MME (d) und ohne Protein (e).

# 4 Diskussion

## 4.1 Screening

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von potentiellen Proteinen für den Einsatz in Mundpflegeprodukten. Hierfür wurden von der BASF SE, Ludwigshafen, 24 unterschiedliche Proteine gestellt. Um diese in Bezug auf ihre Bindeeigenschaften und Nukleationsfähigkeit gegenüber Hydroxylapatit, dem mineralischen Hauptbestandteil der Zahnhartsubstanzen, zu bewerten, wurde ein Screeningsystem aufgebaut. In Abbildung 4.1 ist schematisch der Aufbau der Screeningkaskade dargestellt. Hierbei sollten mögliche Kandidaten in der Lage sein, die gerichtete Remineralisierung der Zahnoberfläche zu fördern. Sie sollten daher eine deutliche Bindefähigkeit gegenüber Hydroxylapatit aufweisen, andererseits auch eine beschleunigende Wirkung auf die Nukleation besitzen. Die Versuche wurden zum einen in einer Pufferlösung durchgeführt, zum anderen erfolgte eine weitere Versuchsreihe unter realitätsnäheren Bedingungen. Bindeversuche wurden in zwei 50% igen Mundwasserformulierungen, Nukleationsexperimente in artifiziellem Speichel durchgeführt. Proteine, die sowohl eine gute Bindung in den Mundwasserformulierungen als auch eine beschleunigte Nukleation in artifiziellem Speichel zeigen, stellen mögliche Kandidaten für die Verwendung in Mundpflegeprodukten dar.

#### 4 Diskussion



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der in dieser Arbeit erstellten Screeningkaskade.

## 4.2 Auswahl der Proteine

In dieser Arbeit wurden 24 Proteine auf ihr Binde- und Nukleationsvermögen gegenüber Hydroxylapatit untersucht. Hierfür wurden auf der einen Seite Proteine gewählt, deren natürliche Funktion im Bereich des Zahnaufbaus liegt. Hierzu zählen die unterschiedlichen Amelogeninderivate. Dabei wurde neben dem *full length* Amelogenin (BioMin 1-2) und der natürlichen *splicing* Variante LRAP (BioMin 4-3) auch Fusionskonstrukte an das oberflächenaktive Hydrophobin DewA (BioMin 7-2) sowie an Perlucin (BioMin 8-2-1), ein Protein aus der Perlmutter-Mineralisation untersucht. In Kombination an DewA wurden außerdem der hydrophobe Mittelteil (BioMin 10) und der hydrophile C-terminale Bereich (BioMin 11-2) des Amelogenins getestet. Durch die Mutationen M11A und P21A im *full length* Amelogenin (BioMin 107) wurde eine bessere Expression gewährleistet und eine Fragmentierung konnte vermieden werden (persönliche Mitteilung Dr. Thomas Subkowski, BASF SE).

Als ein Beispiel für ein Protein, das während der Dentinogenese aktiv ist, wurde das DMP1 Derivat (#64) getestet (BioMin 47). Dieses Protein wurde von Tsuji *et al.* ausgehend von den Motiven A (ESQES) und B (QESQSEQDS) des DMP1 entworfen.<sup>79</sup> Für das Derivat #64 konnte von der Forschergruppe eine beschleunigte Nukleation von Hydroxylapatit nachgewiesen werden.

Eine weitere Gruppe untersuchter Proteine stellen die Statherinderivate dar. Als Speichelprotein ist Statherin an der Stabilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Speichel mitverantwortlich. In verschiedenen Studien konnte die Bindung an Hydroxylapatit über den N-terminalen Bereich nachgewiesen werden.<sup>48,49,90-93</sup> Daher wurden in dieser Arbeit zwei Statherinpeptide, die die 21 N-terminalen Aminosäuren enthalten untersucht. Um zusätzlich die Bedeutung von Phosphoserinresten zu ermitteln, wurde zum einen eine phosphorylierte Variante (BioMin 115) sowie eine unphosphorylierte getestet (BioMin 114).

Das Hydrophobin DewA aus *A. nidulans* wurde aufgrund seiner oberflächenaktiven Eigenschaften gewählt. Die Fusion an die Synthase YaaD aus *B. subtilis* (BioMin 92) sowie an die verkürzte Form 40aaYaaD (BioMin 93) diente dabei lediglich der rekombinanten Expression des Proteins.<sup>89</sup> Für eine gezielte Bindung und Nukleation von Hydroxylapatit wurden an das Konstrukt BioMin 93 außerdem die Hydroxylapatit-bindenden Peptide CPL12 (BioMin 144) und P<sub>11</sub>-4 (BioMin 145) fusioniert.<sup>76,86</sup>

Aufgrund seiner  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindefähigkeit wurde weiterhin das Histidinreiche Calcium-bindende Protein HRC (BioMin 146) in das Screening aufgenommen.<sup>94</sup> Als Kontrolle dienten für die Bindung aus MI tooth mousse<sup>TM</sup> extrahierte Peptide, die aus dem Milchprotein Casein gewonnen wurden (BioMin 60). Wie bereits erwähnt konnte für diese in unterschiedlichen klinischen Studien eine remineralisierende Wirkung nachgewiesen werden.<sup>20</sup>

Als ein vergleichbares Produkt wurde das *homemade* Recaldent (BioMin 65) verwendet. Dieses wurde bei der BASF SE durch tryptischen Verdau von Casein erhalten. Als weitere Positivkontrolle diente das Peptid DSS<sub>6</sub>, für das von Yarbrough *et al.* die Bindung an Hydroxylapatit nachgewiesen werden konnte.<sup>35</sup> Dieselbe Forschergruppe beschrieben das Peptid #3-1 als nicht-bindend gegenüber Hydroxylapatit.<sup>35</sup> Dieses Peptid diente in dieser Arbeit als Negativkontrolle.

### 4.3 Identifikation Hydroxylapatit-bindender Proteine

Für eine gerichtete Mineralisierung ist die Bindung eines potentiellen Kandidaten an die Zahnoberfläche für die Applikation in *oral care* Produkten unumgänglich. Außerdem führt die Mineralisierung von Hydroxylapatit an unerwünschten Stellen zu pathologischen Produkten, wie z. B. Zahnstein.<sup>14</sup> In dieser Arbeit wurden daher die möglichen Kandidaten bezüglich ihrer Bindeeigenschaften an Hydroxylapatitpulver bewertet (siehe 3.1.1.1). Zum Nachweis der Bindung dienten in diesem Fall Fluoreszenzmessungen. Diese bieten den Vorteil, dass zum einen quantitative Messungen über die Fluoreszenzintensität aus der Lösung, zum anderen die dabei erhaltenen Ergebnisse über Fluoreszenzmikroskopie qualitativ überprüft werden können. Als Markierungsreagenz wurde 5(6)-Carboxyfluoresceinsuccinimidylester gewählt. Dies reagiert mit primären Amingruppen unter Bildung einer Amidbindung und ermöglicht so die N-terminale Markierung der Proteine. Der C-Terminus, der vor allem für die Amelogeninderivate als ausschlaggebend für die Bindung postuliert wird, bleibt frei zugänglich.<sup>45,95,96</sup>

#### 4.3.1 Bindeversuche an Hydroxylapatitpulver

Das Peptid #3 (LIKHILHRL), das in dieser Arbeit als Negativkontrolle verwendet wurde, zeigte lediglich in HBST-Puffer eine geringe, unspezifische Bindung unter 5% an Hydroxylapatitpulver. In Mundwasser konnte keine Bindung detektiert werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Yarbrough *et al.* überein, die dieses Peptid, ebenfalls nach Fluoreszenzmarkierung, als nicht-bindend gegenüber Hydroxylapatit beschrieben hatten.<sup>35</sup> Das Peptid (DSS)<sub>6</sub>, das von der gleichen Gruppe auf die Bindung an Hydroxylapatit untersucht wurde, zeigte gute Bindeeigenschaften in HBST-Puffer. In den Mundwasserformulierungen konnte hingegen keine Bindung detektiert werden. Die aus MI tooth mousse<sup>TM</sup> extrahierten Peptide (BioMin 60) zeigten sowohl in HBST-Puffer als auch in beiden Mundwasserformulierungen gute Bindeeigenschaften. Die enthaltenen Peptide wurden durch tryptischen Verdau des Milchproteins Casein erhalten. Dieses ist bekannt für seine hohe Affi-

#### 4 Diskussion

nität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>69</sup> Im Gegensatz dazu zeigte ein vergleichbares Produkt der BASF SE, BioMin 65 (homemade Recaldent), lediglich eine mäßige Bindeaktivität gegenüber Hydroxylapatit in den Mundwasserformulierungen. Ähnlich wie BioMin 60 wurde dieses Produkt ebenfalls durch tryptischen Verdau von Casein erhalten. Das unterschiedliche Bindeverhalten lässt sich vermutlich auf die abweichende Zusammensetzung der Produkte zurückführen. Während BioMin 65 ein Gemisch aus verschiedenen Peptiden darstellt, ist in BioMin 60 vermutlich nur ein Peptid (T1: EMEAES(P)S(P)IS(P)S(P)EEIVEQK) enthalten.<sup>51,65</sup> Dieses Peptid ist durch den hohen Anteil an Glutamat (E) und phosphorylierten Serinresten (S(P)) stark negativ geladen, wodurch die guten Bindeeigenschaften an Hydroxylapatit, selbst in einer komplexen Lösung, wie Mundwasser, erklärt werden können.

Eine vergleichbare Bindung wie die Positivkontrolle BioMin 60 weist das phosphorylierte Statherinpeptid BioMin 115 auf. BioMin 115 besteht aus den 21 N-terminalen Aminosäuren des Speichelproteins Statherin (DS(P)S(P)EEKFLRRIGRFGYGYGPY). Es enthält, ähnlich wie BioMin 60, einen hohen Anteil an negativ geladenen Aminosäuren und zu dem phosphorylierte Serinreste. Die Bedeutung der Phosphorylierung für die Bindung wird durch Vergleich mit dem entsprechenden Statherinpeptid ohne Phosphoserinreste, BioMin 114, deutlich. Für dieses Peptid wurde in HBST-Puffer eine deutlich geringere Bindung mit lediglich 20% nachgewiesen, für die phosphorylierte Variante konnte ein Wert von 85% erreicht werden. In keiner der beiden Mundwasserformulierungen wurde für BioMin 114 eine Bindung detektiert (Diagramm 3.3). Die Bedeutung der Phosphorylierung für die Bindung an Hydroxylapatit wurde bereits für Statherin und andere Speichelproteine nachgewiesen. 2003 konnten Yin *et al.* bei der Untersuchung des Speichelproteins Histatin 1 eine deutlich höhere Bindeaffinität für das phosphorylierte Protein an Hydroxylapatit beobachten, verglichen mit dem Protein ohne Phosphorylierung.<sup>97</sup> Nach Dephosphorylierung zeigten ebenso die Prolin-reichen Proteine A und C eine verminderte Bindung an Hydroxylapatit.<sup>49,98</sup> Dies wurde ebenfalls für Statherin nachgewiesen.<sup>99-102</sup>

Für die verschiedenen Amelogeninderivate konnte lediglich eine Bindung in HBST-Puffer detektiert werden (Diagramm 3.2). Dabei zeigte das *full length* Amelogenin, ebenso wie das Fusionsprodukt aus Amelogenin und dem  $\text{TiO}_2$  mineralisierendem Peptid R5,<sup>80</sup> die niedrigste Binderate. Für Amelogenin ist bekannt, dass die Bindung an Hydroxylapatit hauptsächlich über den C-terminalen Bereich stattfindet. Dieser enthält einen hohen Anteil an geladenen Aminosäuren.<sup>43</sup> Shaw *et al.* konnten die Bindung dieses Bereiches an Hydroxylapatit über Festkörper-NMR-Messungen bestätigen.<sup>96</sup> Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Deletion des C-terminalen Bereiches *in vitro* zu einer verminderten Affinität gegenüber Hydroxylapatitkristallen führt.<sup>103</sup> Während in der Literatur für Amelogenin und die *splicing* Variante LRAP (Leucinreiches Amelogenin-Polypeptid)

## 4 Diskussion

ein vergleichbares Bindeverhalten beschrieben wird, zeigte in dieser Arbeit das Entfernen des hydrophoben Mittelteils des Amelogenins in BioMin 1-2 eine erhöhte Binderate für das Leucinreiche Amelogenin-Polypeptid LRAP (BioMin 4-3). Interessanterweise führten die Substitutionen M11A und P21A in Amelogenin (BioMin 107) zu einer gesteigerten Bindefähigkeit. Für den N-terminalen Bereich des Amelogenins wurde lediglich eine geringe Affinität zu Hydroxylapatit nachgewiesen.<sup>95</sup> Durch Austausch des Methioninrestes an Position 11 und des Prolinrestes an Position 21 durch das kleinere Alanin konnte die Bindefähigkeit des Konstruktes gesteigert werden. Auch die Fusion an das oberflächenaktive Hydrophobin DewA aus *A. nidulans* erhöhte die Bindefähigkeit (BioMin 7-2). Die Kombination des substituierten Amelogenins an das 12mer CPL12 (BioMin 163) führte zu keiner Verbesserung der Bindefähigkeit.

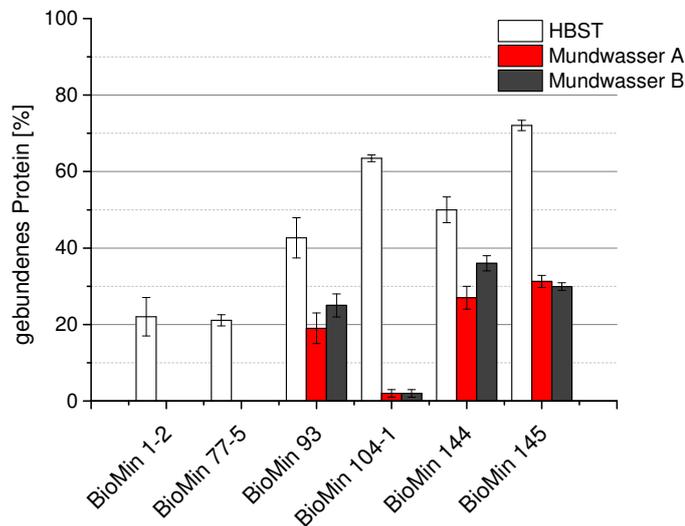
Eine vergleichbare Bindung in den Mundwasserformulierungen, wie die Positivkontrolle BioMin 60, zeigten die Hydrophobinfusionskonstrukte BioMin 144 und BioMin 145. Hydrophobine sind oberflächenaktive amphiphile Proteine aus Pilzen, die eine starke Tendenz zum *self-assembly* besitzen und auf hydrophoben und hydrophilen Oberflächen stabile Monolayer ausbilden. Aufgrund ihrer hohen Oberflächenaktivität finden Hydrophobine unter anderem Anwendung in der Modifikation von Oberflächen bis hin zum Coating von Medikamenten.<sup>104-109</sup> Sie besitzen keine enzymatische Aktivität und werden daher auch als *performance proteine* bezeichnet.<sup>110</sup> Aus der Natur können Hydrophobine nur in geringen Ausbeuten extrahiert werden. Durch Fusion an Proteine, die eine hohe Expressionsrate in *E. coli* besitzen, konnte von der BASF SE die rekombinante Expression des Hydrophobins DewA aus *A. nidulans* in *E. coli* ermöglicht werden. Als optimaler Fusionspartner erwies sich in den Untersuchungen die Synthase YaaD aus *B. subtilis* sowie eine verkürzte Version von YaaD.<sup>89</sup>

Das Hydrophobin DewA gehört zur Klasse I der Hydrophobine. Diese zeichnen sich durch eine hohe Stabilität und eine erhöhte Resistenz gegenüber hohen Temperaturen sowie Detergenzien und Lösemitteln aus.<sup>110</sup> Kürzlich wurde die Struktur des Hydrophobins DewA in Lösung über NMR-Messungen gelöst.<sup>111</sup> Für beide Konstrukte, YaaD-DewA (BioMin 92) und 40aaYaaD-DewA (BioMin 93), konnte eine gute Bindung in HBST-Puffer detektiert werden. In den Mundwasserformulierungen behielt jedoch nur BioMin 93 seine Bindefähigkeit. Für das Fusionskonstrukt YaaD-DewA (BioMin 92) konnte keine Bindung nachgewiesen werden, möglicherweise aus sterischen Gründen des größeren YaaD. Durch Einbau der Hydroxylapatit-bindenden Peptide CPL12<sup>86</sup> und P<sub>11-4</sub><sup>76</sup> konnte die Bindefähigkeit noch weiter gesteigert werden (Diagramm 3.4). Die Fusion an das TiO<sub>2</sub> mineralisierende R5 führte zu einer Verschlechterung in der Bindekapazität. In Verbindung von DewA mit Amelogeninderivaten wie in BioMin 7-2 (Amelogenin-DewA), BioMin 10 (Amelogenin $\Delta$ 42aaN-term.+ $\Delta$ 17aaC-term.-DewA) und BioMin 11-2 (Amelo-

## 4 Diskussion

genin: 23aaC-term.-DewA) konnten gute Binderaten in HBST-Puffer detektiert werden, in den Mundwasserformulierungen konnte jedoch keine Bindung nachgewiesen werden. Möglicherweise wird hier, wie auch bei BioMin 92, die Bindung bzw. die Ausbildung eines Monolayers aufgrund sterischer Gründe gestört.

In den Bindeversuchen konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Bindung unterschiedlicher Proteine durch Fusion von Peptiden zu beeinflussen. So führte die Fusion der Hydroxylapatit-bindenden Peptide CPL12 (BioMin 144) und P<sub>11-4</sub> (BioMin 145) an das Hydrophobin DewA zu einer deutlich gesteigerten Bindung. Im Gegensatz dazu, resultierte die Kombination mit dem TiO<sub>2</sub> mineralisierendem Peptid R5 an Amelogenin (BioMin 77-5) zu keiner Verbesserung und die Kombination an das Hydrophobin DewA (BioMin 104-1) sogar zu einer Erniedrigung in der Bindefähigkeit (Diagramm 4.1).



**Diagramm 4.1:** Vergleich der Bindung verschiedener Fusionsproteine nach Einbau von Hydroxylapatit-bindender bzw. -nichtbindender Peptide an Hydroxylapatit. BioMin 1-2: Amelogenin, BioMin 77-5: R5-Amelogenin, BioMin 93: 40aaYaaD-DewA, BioMin 104-1: R5-40aaYaaD-DewA, BioMin 144: 40aaYaaD-CPL12-DewA, BioMin 145: 40aaYaaD-P<sub>11-4</sub>-DewA.

Generell ist festzuhalten, dass die Bindeergebnisse der Versuche in HBST-Puffer und den Mundwasserformulierungen stark von einander abweichen. Proteine, die eine hervorragende Bindung in HBST-Puffer aufwiesen (z. B. BioMin 113 oder BioMin 146), verloren ihre Bindefähigkeit in den Mundspülungen teilweise vollständig. Möglicher Grund hierfür könnte die komplexe Zusammensetzung der Mundwasserformulierungen sein. Denkbar wäre auch, dass die höhere Viskosität der Mundwasser durch den Zusatz von Glycerol, die Bindung einiger Proteine beeinflusst. Dies müssten durch entsprechende Experimente bestätigt werden. Zwischen den beiden Mundwasserformulierungen konnten lediglich

geringe Unterschiede detektiert werden. Beide Mundwasserformulierungen unterscheiden sich nur im enthaltenen Detergenz. Mundwasser A enthält Polysorbat 20, in Mundwasser B ist das nicht-schäumende Pluronic 127 enthalten. Die Wahl des Detergenz scheint demnach einen geringeren Einfluss auf die Bindung auszuüben.

### 4.3.2 Bindung an menschliche Zahnschnitte

In Mundwasser bindende Proteine wurden weiterhin auf ihr Bindeverhalten an menschliche Zahnschnitte untersucht. Dabei konnte in allen Fällen eine Bindung hauptsächlich an Dentin beobachtet werden (siehe 3.1.1.2). An Enamel wurde, wenn überhaupt, nur ein geringer Anteil an gebundenem Protein nachgewiesen. Dies wurde bereits von Yarbrough *et al.* beschrieben. Für das Peptid (DSS)<sub>6</sub> wurde, ebenfalls nach Markierung mit 5(6)-Carboxyfluorescein, lediglich eine Bindung an Dentin festgestellt.<sup>35</sup> In Dentin liegen die Hydroxylapatitkristalle in einer weniger geordneten Struktur vor als im Zahnschmelz. Yarbrough *et al.* führten die spezifische Bindung an Dentin auf die Präferenz des Peptides an weniger geordnete Strukturen zurück. Möglich wäre jedoch auch, dass aufgrund der weicheren Struktur des Dentin, die Bindung an diesem erleichtert wird.

## 4.4 Identifikation Hydroxylapatit-nukleierender Proteine

Nukleation, oder auch Keimbildung, ist der wichtigste Schritt der Mineralisation. Dabei kommt es zur Phasentrennung in einer übersättigten Lösung und damit verbunden zur Bildung der ersten Keime. Über die Nukleation kann demnach die Mineralisierung kontrolliert werden.<sup>4,7</sup> Daher wurden die in dieser Arbeit untersuchten Proteine neben ihrer Bindefähigkeit gegenüber Hydroxylapatit auch bezüglich ihre Nukleationseigenschaften bewertet. Hierfür wurde zum einen die Mineralbildung durch Messung der Absorption bei 820 nm untersucht, zum anderen durch Messung der Abnahme in der Calciumkonzentration (siehe 3.1.2.1). Um der späteren Applikation entsprechend eine zügige Mineralisierung der Zahnoberfläche zu gewährleisten, wurde in dieser Arbeit eine beschleunigte Nukleation als positiv bewertet.

Der verwendete Nukleationsassay durch Messung der Absorption bei 820 nm wurde nach Gungormus *et al.* 2008, angepasst.<sup>84</sup> Die Forschergruppe verwendete dabei eine alkalische Phosphatase, um die biologischen Verhältnisse während der Dentinogenese zu imitieren. In dieser Arbeit wurde stattdessen anorganisches Phosphat verwendet. Im Vergleich zu Detektion der Nukleation durch Verfolgung der Abnahme in der Calciumkonzentration, erwies sich Absorptionsmessung bei 820 nm als eher anfällig für Störungen. Durch Messung der Absorption bei 820 nm kann nicht zwischen der Bildung eines anorganischen Präzipitates und dem eventuellen Ausfällen von Proteinen unterschieden werden. Daher wurde zusätzlich die Abnahme der Calciumkonzentration untersucht. Die eigentlich relevanten Nukleationsversuche in artifiziellm Speichel erfolgten ausschließlich durch Messung der Calciumkonzentration (siehe 3.1.2.2). Zur Bestimmung der  $c(\text{Ca}^{2+})$  wurde das Reagenz o-Cresolphthalein verwendet. Dieses bildet im alkalischen pH-Bereichen mit vorhandenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einen stabilen violetten Komplex.<sup>85</sup>

Gungormus *et al.* untersuchten 2008 den Einfluss der beiden 7mer Peptide HABP1 und HABP2, die über Phage Display gegen Hydroxylapatit identifiziert worden waren. Für beide Peptide wurde eine Verzögerung der Nukleation detektiert verglichen mit der Kontrolle ohne Peptid.<sup>84</sup> Dieselbe Forschergruppe untersuchte 2012 das Nukleationsverhalten von Amelogenin-basierten Peptiden (ADPs). Dabei wurden drei unterschiedliche Nukleationsverhalten beobachtet. Der Großteil der Peptide zeigte einen Nukleationsverlauf wie die Kontrolle ohne Peptid. Das Peptid ADP7, für das eine hohe Bindeaffinität an Hydroxylapatit über Quartz Crystal Microbalance nachgewiesen werden konnte, bewirkte eine Verzögerung der Nukleation. Für das *full length* Amelogenin rM180 sowie für das Peptid ADP5, für das keine Bindeaffinität an Hydroxylapatit detektiert werden konnte, zeigten einen beschleunigten Nukleationsverlauf.<sup>112</sup> Diese drei unterschiedlichen Nukleationsverhalten wurden auch in dieser Arbeit beobachtet. Es wurden Proteine gefunden, die

## 4 Diskussion

einen stabilisierenden Effekt auf die Nukleationslösung ausübten, als auch solche die einen Nukleationsverlauf wie die Kontrolle ohne Protein zeigten. Außerdem konnten Proteine identifiziert werden, die eine beschleunigende Wirkung auf die Nukleation hatten.

BioMin 60 und auch das phosphorylierte Statherinpeptid BioMin 115 zeigten beide einen deutlich stabilisierenden Effekt (siehe Tabelle 4.1). Sowohl in HEPES-Puffer als auch in artifiziellem Speichel konnte die Nukleation über einen Zeitraum von 8 h bzw. 6 h vollständig unterbunden werden. Dies entspricht ihrer natürlichen Funktion in Milch bzw. Speichel. Wie bereits erwähnt weisen sowohl BioMin 60 als auch BioMin 115 einen hohen Anteil an negativ geladenen Aminosäuren wie Aspartat, Glutamat und Phosphoserin auf. Es wird vermutet, dass beide aufgrund ihrer Ladung an am Anfang gebildete Calciumphosphat-Cluster in der Milch bzw. dem Speichel binden. Auf diese Weise wird das Kristallwachstum gehemmt, so dass die Cluster die kritische Größe, die für die Nukleation erforderlich ist, nicht erreichen.<sup>69</sup> Dies erklärt zum einen die gute Bindefähigkeit als auch den stabilisierenden Charakter dieser beiden Verbindungen.

Im Gegensatz dazu zeigten die Amelogeninderivate BioMin 4-3 (LRAP) und BioMin 77-5 (R5-Amelogenin) eine beschleunigende Wirkung in artifiziellem Speichel, jedoch konnte keine Bindung in den Mundwasserformulierungen nachgewiesen werden. Dies ist ein Beispiel dafür, dass aufgrund von Bindeeigenschaften keine Aussagen über die mineralisierenden Fähigkeiten eines Proteins getroffen werden können. Dies wurde ebenfalls von Gungormus *et al.* beobachtet. Die Forschergruppe untersuchte die Bindungs- und Nukleationseigenschaften verschiedener Amelogenin-basierter Peptide. Dabei zeigte das Peptid ADP5, das auf dem N-terminalen Bereich des Amelogenins basiert, keine Bindeaffinität gegenüber Hydroxylapatit, jedoch eine beschleunigende Wirkung auf die Nukleation. Es wird vermutet, dass dieses Peptid mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Lösung wechselwirkt und so eine lokale Übersättigung bewirkt.<sup>112</sup> Das eine gute Bindefähigkeit nicht zwangsläufig auch einer mineralisierenden Wirkung entspricht, zeigt das Hydrophobinkonstrukt BioMin 93 (40aaYaaD-DewA). Obwohl es auch in den Mundwasserformulierungen gute Bindeeigenschaften besitzt, zeigte es einen Nukleationsverlauf wie die Kontrolle ohne Protein. Durch Einbau der Hydroxylapatit bindenden Peptide CPL12 (BioMin 144) und P<sub>11</sub>-4 (BioMin 145) wurde jedoch ein stark beschleunigender Effekt beobachtet, sowohl in HEPES-Puffer als auch in artifiziellem Speichel. Das freie Peptid P<sub>11</sub>-4 hingegen weist keine nukleierenden Eigenschaften in artifiziellem Speichel auf (Diagramm 3.14b). Dieses Peptid wurde rational entworfen um Hydrogele zu bilden. Ab einer Konzentration von 15 mg/mL beginnt die Hydrogelbildung.<sup>76</sup> Dabei entstehen sogenannte *Nanotapes*, die aufgrund der Primärstruktur des Peptides eine negativ geladene Oberfläche besitzen. Diese makroskopische Struktur dient anschließend als Templat für die Nukleation von Hydroxylapatit. Dieses Prinzip der Stabilisierung ist in der Natur weit verbreitet. Zahlreiche

## 4 Diskussion

natürlich vorkommende Proteine zeigen erst nach Stabilisierung an einer festen Oberfläche oder Ausbildung einer definierten Sekundärstruktur (z. B.  $\beta$ -Faltblatt) mineralisierende Eigenschaften. In freier Lösung zeigen sie keinen oder einen stabilisierenden Einfluss auf die Nukleation.<sup>3, 33, 35, 36, 79, 113–116</sup>

Da das freie P<sub>11</sub> – 4 einen Nukleationsverlauf wie die Kontrolle ohne Protein zeigt, das Fusionskonstrukt 40aaYaaD-P<sub>11</sub>-4-DewA (BioMin 145) hingegen stark beschleunigend auf die Nukleation wirkt, kann dem Hydrophobin DewA, neben den bindenden Fähigkeiten, auch eine stabilisierende Eigenschaft zu geschrieben werden.

Bei Betrachtung der Nukleationsergebnisse in HEPES-Puffer und artifiziellem Speichel lassen sich kleinere Schwankungen ausmachen (Tabelle 4.1). So zeigten beispielsweise einige Amelogeninderivate in HEPES eine beschleunigende Wirkung, in artifiziellem Speichel allerdings keinen Effekt. Die Nukleation ist stark von der Übersättigung abhängig.<sup>4, 10, 44</sup> Die Übersättigung eines Systems lässt sich unter Berücksichtigung der Aktivitäten und der Löslichkeitsprodukte berechnen. Für die Höhe der Nukleationsbarriere gilt:

$$\Delta G_{krit} = \frac{16\pi\gamma^3}{3(\rho_s|\Delta\mu|)} \quad (4.1)$$

Das bedeutet, die Höhe der Nukleationsbarriere ist  $\sim \gamma^3$  und  $\sim \frac{1}{|\Delta\mu|}$ , also stark abhängig von der Phasengrenzenergie  $\gamma$  und der Übersättigung. Die Unterschiede in den Nukleationsversuchen in artifiziellem Speichel und HEPES-Puffer sind vermutlich auf die unterschiedliche Übersättigung der beiden Lösungen zurückzuführen.

**Tabelle 4.1:** Zusammenfassung der Bindungsergebnisse in HBST-Puffer und den Mundwasserformulierungen in % sowie der Nukleations-  
ergebnisse aus dem CPC (o-Cresolphthalein Complexone) Assay in HEPES-Puffer und artifiziellem Speichel. Grün markiert  
sind Proteine, die eine Bindefähigkeit in den Mundwasserformulierungen besitzen, jedoch keine beschleunigende Wirkung auf  
die Nukleation; rot markierte Proteine weisen nur eine erhöhte Nukleationsaktivität auf; gelb markierte Proteine zeigen sowohl  
bindende als auch nukleierende Eigenschaften.

BioMin	Name	Bindung				Nukleation CPC	
		HBST	Mundw A	Mundw B	Zahnschnitt	HEPES	Speichel
60	Peptides out of MI tooth mousse <sup>TM</sup>	70±9	37±3	30±1	D	-	-
65	homemade Recaldent	14±1	4±1	5±1	D	-	-
93	40aaYaaD-DewA*	43±9 11	19±4	25±3	D	-	o
104-1	R5-40aaYaaD-DewA*	63±1	2±1	2±1	D	o	-
115	Statherinpeptid phospho.	86±2	20±4	14±3	D	-	-
1-2	Amelogenin*	22±5	n.d.	n.d.		+	o
7-2	Amelogenin+Hydrophobin*	56±1	n.d.	n.d.		+	o
107	Amelogenin (mutein 11MA, 21PA)*	69±2	n.d.	n.d.		+	o
4-3	LRAP*	59±1	n.d.	n.d.		+	+
77-5	R5-Amelogenin*	22±2	n.d.	n.d.		+	+
11-2	(Amelogenin: 23aa C)-DewA*	62±3	n.d.	n.d.		o	+
146	40aaYaaD-HRC*	96±1	8±3	10±4	D	o	o
145	40aaYaaD-P <sub>11</sub> -4-DewA*	72±1	31±2	30±1	D	+	+
144	40aaYaaD-CPL12-DewA*	50±3	27±3	36±2	D	+	+

\* enthält C-terminal einen His<sub>6</sub>-Tag

n.d. nicht detektierbar

D Bindung an Dentin

+ Nukleation beschleunigt im Vergleich zur Kontrolle ohne Protein

o Nukleation verläuft wie die Kontrolle ohne Protein

- Nukleation verzögert im Vergleich zur Kontrolle ohne Protein

#### 4.4.1 Charakterisierung der entstandenen Präzipitate

Für ausgewählte Proteine wurde der während der Nukleation gebildete Niederschlag durch Pulverdiffraktometrie analysiert. Hierfür wurde das nach 4 h in der Nukleationslösung entstandene Präzipitat untersucht. Um ausreichend Material zu erhalten, mussten die Nukleationsansätze auf 30 mL bzw. 100 mL vergrößert werden. Aufgrund der begrenzten Menge an Protein erfolgte die Analyse der gebildeten Niederschläge nicht für alle Proteine. Für zwei Amelogeninderivate (BioMin 1-2, BioMin 4-3), das unphosphorylierte Statherinpeptid (BioMin 114), drei Hydrophobinkonstrukte (BioMin 104-1, BioMin 144, BioMin 145) sowie das Histidinreiche Calciumbindende Protein (BioMin 146) wurde der entstandene Niederschlag analysiert. In allen Fällen konnte das gebildete Mineral durch Pulverdiffraktometrie als Hydroxylapatit identifiziert werden (Abbildung 3.8 & 3.10, Abschnitt 7.2.1). Dies gilt auch für die Kontrolle ohne Protein. Die dabei erhaltenen Spektren zeigen unterschiedliche Intensitäten, die vermutlich auf Unterschiede in der Materialmenge zurückzuführen sind. Eindeutige Unterschiede in der Kristallinität können daraus nicht abgeleitet werden. Dies würde sich in einer veränderten Halbwertsbreite der einzelnen Peaks deutlich machen. Diese scheinen in den hier enthaltenen Spektren jedoch gleich zu sein.

Weiterhin wurden die Morphologie der Kristalle über Transmissionselektronen-Mikroskopie untersucht. Hierbei konnten plättchenartige Kristalle gefunden werden, die bereits für Hydroxylapatit beschrieben worden sind.<sup>79,84,112</sup> Gungormus *et al.* konnten plättchenförmige Kristalle während der Nukleation von Hydroxylapatit in Gegenwart des Peptides HABP1 sowie des *full length* Amelogenins und der Peptide ADP7 und ADP5 nachweisen.<sup>84,112</sup> Dies wurde ebenfalls von Tsuji *et al.* bei der Untersuchung unterschiedlicher Peptide, die ausgehend von dem Dentin Matrix Protein 1 entworfen wurden, beschrieben.<sup>79</sup> Beide Forschergruppen beobachteten die Zusammenlagerung der Kristalle zu sphärischen Gebilden, wenn kein Peptid in der Lösung vorhanden war. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. In Abwesenheit von Proteinen lagerten sich diese Kristalle zu sphärischen Gebilden zusammen, wohingegen in Gegenwart von Proteinen feinere, netzartige Strukturen gefunden wurden (vergleiche Abbildung 3.9 & 3.11). Die Analyse über Rasterelektronenmikroskopie zeigte ebenfalls für das Präzipitat, das während der Nukleation in artifiziellem Speichel in Anwesenheit des Hydrophobinkonstruktes BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11</sub>-4-DewA) gebildet worden war, eine netzartige Struktur, wohingegen in Abwesenheit von Proteinen kugelförmige Präzipitate erhalten wurden (persönliche Mitteilung Thorsten Henkes, Universität Stuttgart).

In dieser Arbeit wurde in allen untersuchten Fällen lediglich Hydroxylapatit als gebildete Phase identifiziert. In der Literatur wird jedoch für Hydroxylapatit die Nukleation

über amorphe Zwischenstufen postuliert.<sup>3,79</sup> Dies konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist festzuhalten, dass sowohl für die Pulverdifraktometrie als auch die Analyse über Transmissionselektronen-Mikroskopie der Niederschlag nach 4h untersucht wurde. Um möglich amorphe Zwischenstufen nachzuweisen, wäre die Analyse des gebildeten Präzipitates zu einem früheren Zeitpunkt interessant gewesen. Wie in den Nukleationsverläufen in artifiziellem Speichel (Diagramm 3.11) deutlich ist, fällt die Konzentration an  $c(\text{Ca}^{2+})$  innerhalb der ersten Stunde von 1,5 mM auf etwa 1,0 mM. Dies ist eventuell auf die Bildung von amorphen *Precursors* zurückzuführen.

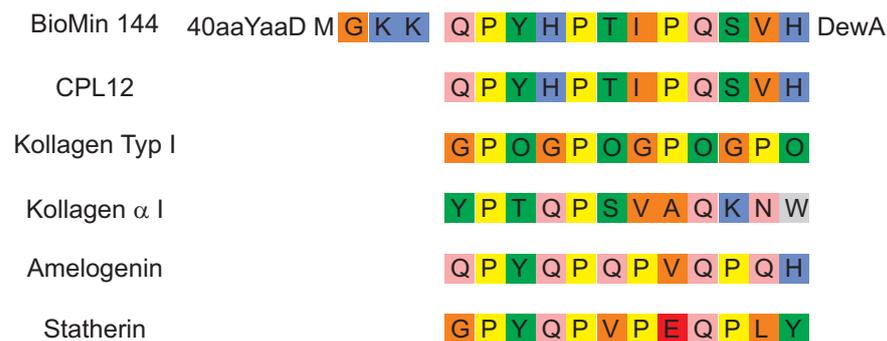
### 4.4.2 Nukleation mit Fluorid

Fluorid konnte als potenter Remineralisierungsagent identifiziert werden.<sup>53-55</sup> Auch in dieser Arbeit wurde der Einfluss von Fluorid auf die Nukleation untersucht (siehe 3.1.2.3). Hierfür wurde die Nukleation in artifiziellem Speichel in Gegenwart von 250 ppm Fluorid untersucht. Die Wirkung von Fluorid ist stark Konzentrations- und pH-abhängig. Bei geringer Konzentration wird die Bildung des stabilen Fluorapatit postuliert. Fan *et al.* beobachteten die Bildung von fluoriertem Hydroxylapatit in Anwesenheit von Amelogenin und 1 mg/mL Fluorid bei einem pH von 7,6.<sup>117</sup> Abhängig von der Konzentration und des pH Wertes ist jedoch die Bildung von  $\text{CaF}_2$  wahrscheinlicher. Vor allem in niedrigen pH Bereichen ist die Bildung von  $\text{CaF}_2$  thermodynamisch gefördert.<sup>118,119</sup> Weiterhin konnte ein Drei-Phasen-System aus  $\text{CaF}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  und Fluorapatit nachgewiesen werden.<sup>118,120</sup> Gerth *et al.* untersuchten 2007 den Wirkmechanismus von Fluorid in Bezug auf die Zahnoberfläche. Als Fluoridquelle wurde Elmex<sup>®</sup> verwendet. Dieses enthält 1% Olafur (N'-octadecyltrimethyldiamine-N,N,N'-tris(2-ethanol)-dihydrofluorid) und Dectaflur (9-octadecenylaminehydrofluorid). Menschlicher Zahnschmelz wurde *in vitro* für 1-2 min mit Elmex<sup>®</sup> bei 20 °C behandelt und anschließend über Röntgen-Photoelektronenspektroskopie analysiert. Dabei konnte ein System aus  $\text{CaF}_2$  an der äußeren Zahnoberfläche und einer Schicht Fluorapatit direkt am Zahnschmelz nachgewiesen werden. Zwischen diesen Bestandteilen wurde eine dünne Schicht  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  detektiert. Als Wirkmechanismus postulierten die Forscher anhand dieser Ergebnisse zu Beginn die Bildung einer Schicht  $\text{CaF}_2$  auf dem Zahnschmelz. Diese Schicht reagiert anschließend mit dem Hydroxylapatit der Zahnoberfläche zu Fluorapatit und  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .<sup>118</sup> Dieser Bildungsmechanismus wurde bereits 1937 von MacIntire *et al.* postuliert und 2010 von Müller *et al.* bestätigt, wobei in dieser Studie  $\text{CaF}_2$  als Hauptkomponente identifiziert wurde, während Fluorapatit und  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  nur in geringer Konzentration nachgewiesen werden konnte.<sup>120,121</sup>

## 4.5 Protein Engineering

Von den 24 untersuchten Proteinen zeigten nur zwei sowohl bindende als auch nukleierende Eigenschaften (siehe 3.1.3). BioMin 144 (40aaYaaD-CPL12-DewA) und BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11</sub>-4-DewA) besitzen das Hydrophobin DewA, das zu den Bindeeigenschaften der beiden Konstrukte beiträgt. Die Nukleationsfähigkeit beruht in beiden Fällen auf dem eingeführten Peptid. Kürzlich wurde ein ähnliches Konstrukt aus dem Hydrophobin HFB II und Polyglutamat für die Mineralisierung von CaCO<sub>3</sub> beschrieben.<sup>122</sup>

Auf Basis der Aminosäuresequenz dieser Peptide wurden Alaninvarianten erstellt, um den Einfluss der verschiedenen Aminosäuren auf die Nukleation zu untersuchen (siehe 3.2). CPL12 besitzt die Aminosäuresequenz Q P Y H P T I P Q S V H und wurde über Phage Display gegen Hydroxylapatitkristalle identifiziert. Ein Sequenzvergleich zeigt eine hohe Homologie gegenüber Kollagenfasern des Typs 1 sowie Amelogenin bzw. Statherin (Abbildung 4.2).<sup>86</sup>



**Abbildung 4.2:** Aminosäuresequenz des Peptids CPL12 sowie Aminosäurebereiche, die eine hohe Homologie zu CPL12 aufweisen, aus Kollagen Typ I, Amelogenin und Statherin.<sup>86</sup> Für BioMin 144 sind zusätzlich die vier Aminosäuren (MGKK) des Spacers aufgeführt.

Der Einfluss der positiv geladenen Aminosäuren wurde anhand von BioMin 144 bewertet. Hierfür wurden vier Alaninvarianten (K47A, H52A, KK47/48AA und KK47/48/H52AAA) erstellt. Die Bewertung dieser Mutanten bezüglich ihrer Bindeeigenschaften hat gezeigt, dass die Lysinreste K47 bzw. K48, die als Spacer zwischen YaaD und dem Peptid CPL12 dienen, einen bedeutenden Einfluss auf die Bindefähigkeit an Hydroxylapatit besitzen. Substitution dieser Aminosäuren durch Alanin führte für die Mutante 144\_K47A zu einer Verringerung in der Bindung auf 21 ( $\pm 2$ )%, für die Doppelmutante 144\_KK47/48AA auf 17 ( $\pm 4$ )% in Mundwasser B verglichen mit dem Wildtyp (37 ( $\pm 3$ )). 1992 wurde bereits von Fernandez *et al.* eine deutliche Adsorption an Hydroxylapatit für Polylysin beschrieben.<sup>123</sup> Die Bedeutung von Lysinresten für die Bindung an Hydroxylapatit wurde

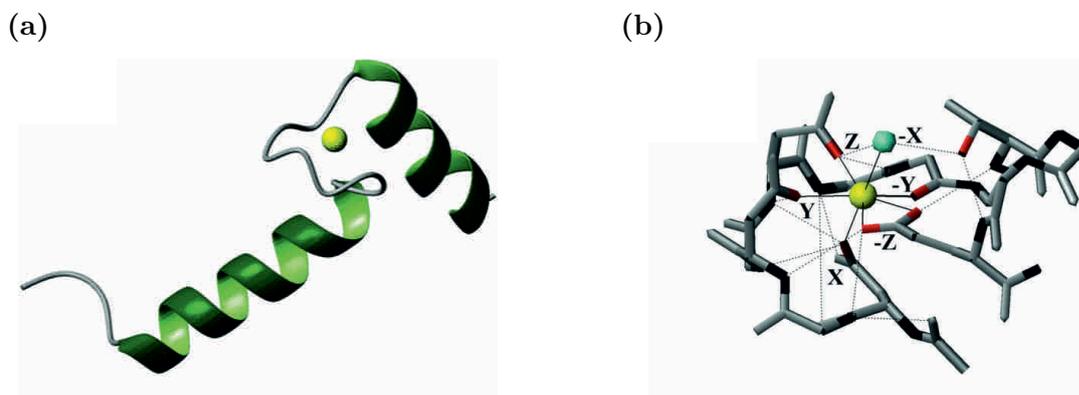
## 4 Diskussion

anhand von Statherin und Statherinpeptiden bereits über Festkörper-NMR-Messungen nachgewiesen.<sup>90</sup> Verglichen mit den Lysinresten K47 und K48 zeigte das Histidin an Position 52 mit einer Bindung von 30 ( $\pm 4$ )% nur einen geringen Einfluss auf die Bindung an Hydroxylapatit. Bezüglich der Nukleationseigenschaften allerdings führte die Substitution des Histidin 52 durch Alanin zu einer deutlich verlangsamten Nukleation verglichen mit dem Wildtyp-Konstrukt BioMin 144 (Diagramm 3.2.1.3). Bei zusätzlichem Austausch der Lysinreste K47 bzw. K48 in der Tripelmutante 144\_KK47/48/H52AAA wird dieser Effekt weiter verstärkt. Für die Nukleation spielt das Histidin an Position 52 demnach eine entscheidende Rolle. Diese Ergebnisse decken sich mit Experimenten von Chung *et al.* Durch Substitution in CPL12 von H4 und H12 durch Alanin wurde für das Peptid nach Immobilisierung keine Nukleation innerhalb von 2 h detektiert. Normalerweise zeigte CPL12 in diesen Versuchen eine deutliche Mineralbildung innerhalb von 2 h.<sup>86</sup> Für die Nukleation von großer Bedeutung sind außerdem die Proline P2, P5 und P8. Alaninsubstitutionen führten auch an diesen Positionen zu keine Nukleation innerhalb von 2h.<sup>86</sup> Diese Ergebnisse wurden ebenfalls für das Konstrukt BioMin 144 bestätigt.<sup>124</sup>

Als zweites Targetprotein für die Untersuchung durch Mutagenese wurde BioMin 145 gewählt. Dieses enthält das Peptid P<sub>11-4</sub> (QQRFEWFEQQ).<sup>76</sup> Innerhalb der Peptidsequenz wurde zu Beginn ein Alaninscan durchgeführt. Dabei zeigten vor allem die Substitutionen an den negativ geladenen Glutamatresten an den Positionen E53, E55 und E57 einen Einfluss auf die Nukleationseigenschaften des Konstruktes. Es konnte eine deutliche Verzögerung in der Nukleation detektiert werden, wenn mehr als ein Glutamat durch Alanin ersetzt worden war. Dass negativ geladene Aminosäuren eine bedeutende Rolle für das Nukleationsvermögen verschiedener Proteine gegenüber Hydroxylapatit besitzen, ist weithin bekannt.<sup>?,35,38,113,115,125,126</sup> So wurde für das stark negativ geladene Bone Sialoprotein 1993 von Hunter *et al.* eine stark beschleunigende Wirkung auf die Nukleation von Hydroxylapatit beobachtet.<sup>38</sup> Dabei wird das Nukleationsverhalten zwei Polyglutamat-Domänen im N-terminalen Bereich des Proteins zugeschrieben.<sup>125,127,128</sup> Gajjeraman *et al.* identifizierten den C-terminalen Bereich des Dentin Matrix Proteins 1 (DMP1) als ausschlaggebend für die Nukleation von Hydroxylapatit. In Nukleationsversuchen zeigte der N-terminale Bereich (Aminosäuren 1-334) eine stabilisierende Wirkung, wohingegen für den C-terminalen Bereich (334-489), der zahlreiche Glutamat- und Serinreste enthält, eine beschleunigende Wirkung auf die Nukleation von Hydroxylapatit.<sup>126</sup> In weiteren Untersuchungen konnten He *et al.* für die Cluster pA (ESQES, 386-390) und pB (QESQSE-QDS, 414-422) innerhalb der C-terminalen Domäne von DMP1 eine Nukleationsaktivität nachweisen. In Kombination zeigten diese Cluster eine beschleunigende Nukleation, wohingegen die einzelnen Cluster keine Mineralbildung induzierten.<sup>37</sup> Glutamat- und Aspartat-reiche Cluster in Osteonectin konnten als Bindungsstelle für Hydroxylapatit identifiziert

## 4 Diskussion

werden.<sup>129,130</sup> Durch elektrostatische Wechselwirkungen können mittels negativ geladener Aminosäuren  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Lösung rekrutiert werden, was eine lokale Übersättigung zur Folge hat. Auch in anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen spielen saure Aminosäuren eine wichtige Rolle.  $\text{Ca}^{2+}$  ist eines der wichtigsten Metalle in biologischen Systemen und wechselwirkt mit einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine, dabei zeigen sich jedoch nur wenige Unterschiede in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle. Das häufigste Bindemotiv ist die EF-Hand. Dieses Bindemotiv wurde 1973 von Krestinger beschrieben für Parvalbumin und besteht aus einer Helix-Loop-Helix-Struktur.<sup>131</sup> Die Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions findet über sechs der zwölf Aminosäuren des Loops statt (Abbildung 4.3a). Die Koordination erfolgt hierbei über Carbonylsauerstoffatome von Peptidbindungen und Carboxylgruppen saurer Aminosäuren in einer pentagonal bipyramidalen Anordnung ( $\text{CN}=7$ ). Die Koordination wird häufig durch ein Wassermolekül vervollständigt (Abbildung 4.3b).



**Abbildung 4.3:** (a) Die Helix-Loop-Helix-Struktur aus Calmodulin (CaM). Die Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions (gelb) erfolgt über die Aminosäuren des Loops. (b) Koordination des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions (gelb) in CaM in einer pentagonalen bipyramidalen Anordnung (durchgezogene Linien). Die NH-Gruppen der Peptidbindungen sind schwarz, Sauerstoffatome rot und das koordinierende Wassermolekül blau markiert.<sup>132</sup>

Tabelle 4.2 zeigt die Aminosäureverteilung an den einzelnen Positionen der EF-Hand. Auffällig ist auch hier, die hohe Anzahl an negativ geladenen Aminosäuren. An den Positionen, die für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Koordination zuständig sind, befinden sich hauptsächlich Aspartat- und Glutamatreste.

## 4 Diskussion

**Tabelle 4.2:** Aminosäureverteilung (in %) innerhalb der Sequenz des EF-Hand-Loops. Für Aminosäuren, die an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Koordination beteiligt sind, sind die Position (X, Y, Z, -X, -Y, -Z) und die Art der Koordination (über die Seitenreste (sc) oder über die Peptidbindung (bb)) angegeben.<sup>132</sup>

EF-Loop-Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Koordinierender Ligand	X		Y		Z		-Y		-X			-Z
	sc		sc		sc		bb		sc			sc
am häufigsten auftretend	Asp	Lys	Asp	Gly	Asp	Gly	Thr	Ile	Asp	Phe	Glu	Glu
	100%	29%	76%	56%	52%	96%	23%	68%	32%	23%	29%	92%
auch häufig vorkommend		Ala	Asn	Lys	Ser		Phe	Val	Ser	Tyr	Asp	Asp
		Gln		Arg	Asn		Lys	Leu	Thr	Ala	Lys	
		Thr		Asn			Gln		Glu	Thr	Ala	
		Val					Tyr		Asn	Leu	Pro	
		Ile					Glu		Gly	Glu	Asn	
		Glu					Arg		Gln	Lys		
		Arg										

Die Bedeutung der negativ geladenen Aminosäuren wurde weiterhin durch die Deletionsmutanten bestätigt. Die Deletion der Glutamatreste führte zu einer verzögerten Nukleation. Die Glutaminreste, die sich an N- und C-Terminus von P<sub>11-4</sub> befinden, fördern die Hydrogelbildung.<sup>76,133</sup> Sie spielen für die Nukleation eine untergeordnete Rolle. Dies wurde sowohl durch die Analyse der Alaninmutante 145\_QQ49/50AA als auch durch die Deletionsmutanten (145\_Δ6, 145\_Δ7) gezeigt. Die Stabilisierung des Peptides wird durch das Hydrophobin DewA gewährleistet und die Ausbildung eines Hydrogels ist daher nicht erforderlich. Daher führte die Deletion der Aminosäuren Q49, Q50, Q58 und Q59 zu keiner Verschlechterung der Nukleationsaktivität. Ebenso konnten die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (F52, F56) und Tryptophan (W54) durch das nicht aromatische Alanin substituiert werden, ohne eine signifikante Verschlechterung der Nukleationseigenschaften zu beobachten. Wie die Glutaminreste, tragen die aromatischen Aminosäuren in P<sub>11-4</sub> zur Hydrogelbildung bei, in diesem Fall über  $\pi - \pi$ -Stapelkräfte.<sup>75</sup> Durch Analyse der Deletionsmutanten konnte innerhalb des Fusionskonstruktes aus der verkürzten Variante des YaaD und dem Hydrophobin DewA die Kernsequenz F E W E F E als ausschlaggebend für die Nukleationseigenschaften identifiziert werden (145\_Δ8).

## 4 Diskussion

Auf Basis der verkürzten Variante 145\_Δ8 (40aaYaaD-FEWEFE-DewA) wurde eine kleine fokussierte Bibliothek erstellt. Da die Untersuchungen der Alanin- und Deletionsmutanten bereits den Einfluss der negativ geladenen Glutamatreste demonstriert haben, wurden an den Positionen E50, E52 und E54 lediglich Substitutionen durch das ungeladene Homolog Glutamin und das kleinere Aspartat durchgeführt. Wie erwartet zeigten Substitutionen durch Glutamin eine Verringerung in der Binde- als auch der Nukleationsaktivität. Dies bestätigt erneut die essentielle Rolle der negativ geladenen Aminosäuren in Bezug auf die Bindung als auch die Nukleation von Hydroxylapatit. Die Substitution durch Aspartat hingegen führte zu einer deutlichen Steigerung der Bindeeigenschaften (Diagramm 3.22). Durch gleichzeitigen Austausch der Glutamatreste E50, E52 und E54 gegen Aspartat in der 145\_Mutante EEE50/52/54DDD konnte die Bindung von 30 ( $\pm 1$ )% auf 41 ( $\pm 4$ )% in Mundwasser B gesteigert werden. Bereits durch die Bindung der einzelnen Aminosäuren sowie von Polyaspartat und Polyglutamat konnte eine höhere Affinität gegenüber Hydroxylapatit für Aspartat nachgewiesen werden.<sup>130</sup> Auch im Vergleich der Peptide DSS<sub>4</sub> und ESS<sub>4</sub> konnten Yarbrough *et al.* geringere Bindungsaffinitäten gegenüber Hydroxylapatit für das Glutamathaltige Peptid feststellen.<sup>35</sup> Ebenso ist Aspartat in der Calcium-bindenden EF-Hand häufiger als Glutamat vertreten (Tabelle 4.2). Dies wird auf die weniger sterische Beanspruchung des kleineren Aspartates zurückgeführt.<sup>132</sup> In Bezug auf die Nukleationsaktivität konnte in dieser Arbeit durch den Austausch von Glutamat zu Aspartat eine Beschleunigung erzielt werden. Dies steht jedoch im Widerspruch zur Literatur. Für Polyaspartat wird eine stark inhibierende Wirkung postuliert.<sup>128, 130, 134</sup> Su-ping *et al.* konnten einen stabilisierenden Effekt von freiem Aspartat auf die Nukleation von Hydroxylapatit nachweisen. Als Mechanismus der Inhibierung wurde die Bindung der freien Asparaginsäure an die (10 $\bar{1}$ 0) Fläche und somit die Hemmung des Kristallwachstums postuliert. Dabei wurde mit steigender Konzentration an Aspartat eine zunehmende Stabilisierung nachgewiesen.<sup>134</sup> Allerdings waren die eingesetzten Konzentrationen an Aspartat mit 2 - 10 mM deutlich über den in dieser Arbeit verwendeten Konzentration. In dieser Arbeit wurden Proteinkonzentrationen von 25  $\mu$ M verwendet, was bezogen auf Aspartat einer Konzentration von 75  $\mu$ M entspricht, also deutlich unter 2 mM. Desweiteren wurden in den Versuchen von Su-ping *et al.* freie Asparaginsäure verwendet, die demnach zwei freie Carboxylgruppen für die Chelatisierung der Ca<sup>2+</sup>-Ionen und die Bindung an die Hydroxylapatitkristalle besitzt. Fujisawa *et al.* untersuchten das Nukleationsvermögen von Glu<sub>6</sub> und Asp<sub>6</sub> in einem Gelsystem. Dabei wurde für Glu<sub>6</sub> eine beschleunigende, für Asp<sub>6</sub> eine inhibierende Wirkung auf die Nukleation von Hydroxylapatit beobachtet.<sup>130</sup> Allerdings ist für viele Proteine bekannt, dass sie *in vitro* sowohl inhibierende als auch beschleunigende Effekte auf die Nukleation von Hydroxylapatit zeigen, abhängig von den experimentellen Konditionen. So konnte für den Austausch einer Polyglutamatdomäne im

## 4 Diskussion

Bonesialoprotein durch eine entsprechende Anzahl an Aspartatresten kein Unterschied in der Nukleationsaktivität detektiert werden.<sup>125</sup> In der Natur finden sich weiterhin zahlreiche Aspartatreiche Proteine, die die Nukleation von Hydroxylapatit fördern, wie z.B das Dentinphosphoprotein.<sup>25, 26, 135</sup>

An den Positionen F49, W51 und F53 wurde weiterhin der Einfluss anderer Funktionalitäten bewertet. Hierfür wurden als positiv geladene Aminosäuren Arginin und Histidin und als hydroxylierte Aminosäuren Serin bzw. Tyrosin eingeführt. Neben den unterschiedlichen funktionellen Gruppen wurde außerdem der Einfluss von Aminosäuren, die aromatische bzw. nicht-aromatische Seitenketten aufweisen, untersucht. Als nicht-aromatische, nicht polare Aminosäure wurde zudem Valin eingesetzt. Bei Untersuchung der Bindeeigenschaften zeigte sich lediglich für die Mutante F49R eine leichte Verbesserung gegenüber dem Wildtyp. Dies deckt sich mit den Alaninsubstitutionen auf Basis von BioMin 144 (40aaYaaD-CPL12-DewA). Auch dort zeigten Substitutionen an den positiv geladenen Lysinresten den größten Einfluss auf die Bindeeigenschaften des Konstruktes. Für Statheerin wurden die sauren Aminosäuren am N-Terminus des Proteins als ausschlaggebend für die Bindung an Hydroxylapatit nachgewiesen. Es wurden jedoch auch Studien durchgeführt, die sich mit der Rolle der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin in Statheerin befassen. Über Festkörper-NMR-Messungen konnte von Ndao *et al.* zumindest eine große Nähe für die Argininreste R9 und R10 an die Hydroxylapatitoberfläche nachweisen.<sup>92</sup> Die Einführung einer positiven Ladung durch Histidin hingegen lieferte keine Verbesserung. Auch dies entspricht den Ergebnissen der Alaninmutanten auf Basis von BioMin 144. Die Einführung von hydroxylierten Aminosäuren (Serin/Tyrosin) sowie des ungeladenen Valins zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf die Bindung. In Hinblick auf die Nukleationseigenschaften konnte durch den Austausch an den Positionen F49, W51 und F53 durch Serin und Arginin eine Beschleunigung erzielt werden.

Basierend auf den Erkenntnissen der fokussierten Bibliothek wurden Mutationen, die sich beschleunigend auf die Nukleation auswirkten, in drei Mutanten kombiniert. Durch Kombination dieser Mutanten konnte die Nukleationsfähigkeit noch etwas gesteigert werden. Im Fall der Mutante BioMin 145\_MME\_RRR konnte weiterhin die Bindeeigenschaft weiter erhöht werden. Bei Betrachtung der Sequenz (RD)<sub>3</sub> lässt sich eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Peptid RADA16 (RADARADARADA) feststellen. Dieses Peptid wurde entworfen um Hydrogele auszubilden. Es findet bereits in verschiedenen Bereichen der regenerativen Medizin Anwendung.<sup>136</sup> Dabei dient es jedoch eher als Target oder Stabilisator und erleichtert die Zelladhäsion an Implantate. Weiterhin konnte für dieses Peptid eine beschleunigende Wirkung auf die Nukleation in artifiziellem Speichel nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung Thorsten Henkes, Universität Stuttgart).

Die Kombination der auf die Nukleation beschleunigend wirkenden Mutationen führte

## 4 Diskussion

außerdem zu dem Konstrukt BioMin 145\_MME\_SSS (40aaYaaD-SDSDSD-DewA). Als hartes Metallion erfolgt die Koordination von  $\text{Ca}^{2+}$  über harte Liganden, bevorzugt Sauerstoffatome.<sup>132</sup> Die zusätzliche Einführung der Hydroxylgruppen durch die Serinreste in der Mutante BioMin 145\_MME\_SSS führt daher vermutlich zu einer stärkeren Koordination der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und damit zu einer höheren lokalen Übersättigung. Dies würde die beschleunigte Nukleation erklären. Bei Betrachtung der Aminosäuresequenz ist die Analogie zu dem predominantesten Motiv DSS aus dem Dentinphosphoprotein offensichtlich. Das Dentinphosphoprotein gehört zu den nicht-kollagenen Matrixproteinen während der Dentinogenese. Dabei ist es sowohl in der Ablagerung der ersten Hydroxylapatitkristalle aber auch an der Kontrolle über die Kristallform beteiligt.<sup>3,25,27</sup> Diese Eigenschaften werden auf das Motiv D-S-S zurückgeführt. Vor allem der C-terminale Bereich des Dentinphosphoproteins weist eine hohe Anzahl an Wiederholungen dieses Aminosäuretripleetts auf. In einem geringeren Ausmaß können auch Wiederholungen des Motivs DS gefunden werden.<sup>28</sup> Zwar befinden sich alle Serinreste in diesem Fall in einem phosphorylierten Zustand, jedoch konnte auch für die unphosphorylierten Varianten eine starke Bindung als auch Nukleationsfähigkeit nachgewiesen werden. Ebenso konnten Yarbrough *et al.* einen mineralisierenden Effekt des unphosphorylierten Peptides  $(\text{DSS})_8$  nach Immobilisierung nachweisen. Wie bereits mehrfach diskutiert, scheint auch in diesem Fall das Hydrophobin das eingebaute Peptid zu stabilisieren. Das Peptid  $(\text{DSS})_6$  (BioMin 78) zeigte keinen Einfluss auf die Nukleation. Ebenso wird lediglich für immobilisierte Peptide des Motivs  $(\text{DSS})_n$  eine mineralisierende Wirkung beschrieben, nicht aber für die freien Peptide in der Lösung.<sup>35,36</sup>

Interessanterweise wurde das ursprüngliche Peptid P<sub>11-4</sub> entworfen um die strukturgebenden Eigenschaften der extrazellulären Matrix zu imitieren und so die Nukleation von Hydroxylapatit zu fördern. Durch Fusion an das Hydrophobin DewA und einen semi-rationalen Ansatz wurde die Aminosäuresequenz des Peptids P<sub>11-4</sub> schrittweise in eine von der Natur vorgegebene Sequenz zurückgeführt. Dadurch konnte die Nukleationsfähigkeit des Konstruktes weiter gesteigert werden, ohne die Fähigkeit zur Bildung von Hydroxylapatit zu verlieren. Die dabei enthaltene Sequenz ähnelt stark dem Motiv DSS aus dem Dentinphosphoprotein, einem Protein aus der extrazellulären Matrix während der Dentinogenese.

## 4.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein System zur Bewertung unterschiedlicher Proteine bezüglich ihrer Binde- und Nukleationseigenschaften gegenüber Hydroxylapatit erarbeitet. Für die Anwendung in Mundpflegeprodukten wäre die Weiterentwicklung der verwendeten Assays vor allem in Bezug auf die Mineralisierung sinnvoll. Dabei könnten die unterschiedlichen Kandidaten direkt auf ihre remineralisierende Wirkung getestet werden.

Wie bereits unter 4.4.1 angesprochen, wäre die Charakterisierung der entstandenen Präzipitate zu unterschiedlichen Zeitpunkten interessant. Auf diese Weise könnte geklärt werden über welche Zwischenstufen die Nukleation von Hydroxylapatit in diesen Versuchen verläuft.

Da bereits der Einbau der Sequenz SDSDS in das Fusionskonstrukt 40aaYaaD-DewA zu einer beschleunigten Nukleation geführt hat, könnte der Einbau des Motivs  $(DSS)_n$  zu einer weiteren Steigerung in den Nukleationsfähigkeiten führen. Interessant wäre auch die Aufklärung der Kristallstruktur dieser Mutanten. Über Festkörper-NMR könnten außerdem detaillierte Aussagen über die für die Bindung verantwortlichen Aminosäuren getroffen werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stabilisierung von Peptiden einen wichtigen Einfluss auf das Nukleationsverhalten hat. Dies konnte in den Konstrukten BioMin 144 und BioMin 145 durch das Hydrophobin DewA gewährleistet werden. Weiterhin ist DewA für die Bindung an Hydroxylapatit verantwortlich. Interessant wäre nun, ob auf diese Weise auch andere Materialien hergestellt werden könnten. Durch Einbau entsprechender Peptide könnte so eventuell die Synthese unterschiedlicher Materialien gelingen.

## 5 Zusammenfassung

Calciumphosphatmineralisation ist von großem Interesse in der Zahnpflege. Dabei stellt die Verwendung von Proteinen und Peptiden in biomimetischen Ansätzen einen vielversprechenden Weg dar, um die erodierte Zahnoberfläche zu behandeln.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Proteinen, die später in Mundpflegeprodukten Anwendung finden können. Hierfür wurden 24 unterschiedliche Proteine bezüglich ihrer Bindeeigenschaften und ihrer Nukleationsaktivität gegenüber Hydroxylapatit bewertet. Die Untersuchung der Bindeeigenschaften erfolgte, nach Fluoreszenzmarkierung der Proteine, über Messung der Fluoreszenzintensitäten und über Fluoreszenzmikroskopie. Die Bindeversuche wurden zum einen in HBST-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5, 0,1% Tween 20) und für relevantere Versuchsbedingungen in den beiden 50% igen Mundwasserformulierungen A und B durchgeführt. Für alle 24 Proteine, außer der Negativkontrolle, konnte eine gute Bindefähigkeit in HBST-Puffer nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten lediglich fünf Proteine eine gute Bindefähigkeit in den Mundwasserformulierungen mit mehr als 10% gebundenem Protein (BioMin 60, BioMin 93, BioMin 115, BioMin 144 und BioMin 145). Für Proteine, die eine Bindeaktivität gegenüber Hydroxylapatit in den Mundwasserformulierungen gezeigt hatten, wurde zusätzlich das Bindeverhalten an menschliche Zahnschnitte untersucht. Dabei konnte in der Mundwasserformulierung B lediglich eine Bindung an Dentin, nicht jedoch an den Zahnschmelz beobachtet werden.

Neben den Bindeeigenschaften wurden die 24 Proteine bezüglich ihrer Nukleationsaktivität gegenüber Hydroxylapatit bewertet. Hierfür wurden zwei Assays aus der Literatur angepasst. Die Mineralbildung wurde zum einen durch Messung der Absorption bei 820 nm bewertet. Zum anderen wurde der Verbrauch an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Lösung verfolgt. Für die Nukleation wurde eine Versuchsreihe in einer gepufferten Salzlösung (3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5) durchgeführt und für realitätsnähere Konditionen eine zweite in artifiziellem Speichel. Dabei zeigte der Großteil der Proteine einen Nukleationsverlauf wie die Kontrolle ohne Protein. Es wurden allerdings auch Proteine identifiziert, die eine stabilisierende Wirkung auf die Nukleation ausübten, und es wurden fünf Proteine identifiziert, die eine beschleunigende Wirkung auf die Nukleation in artifiziellem Speichel zeigten (BioMin 4-3, BioMin 11-2, BioMin 77-5, BioMin 144 und BioMin 145).

## 5 Zusammenfassung

Der während der Nukleation gebildete Niederschlag konnte über Pulverdiffraktometrie als Hydroxylapatit identifiziert werden. Die Analyse über Transmissionselektronen-Mikroskopie zeigte plättchenförmige Kristalle, die typisch für Hydroxylapatit sind.

In dieser Arbeit konnten Proteine identifiziert werden, die eine gute Bindung an Hydroxylapatit in den Mundwasserformulierungen zeigten, jedoch keine Beschleunigung in der Nukleation bewirkten. Auf der anderen Seite wurden auch solche Proteine gefunden, die einen beschleunigenden Effekt auf die Nukleation hatten, allerdings keine Bindeaktivität in den Mundwasserformulierungen aufwiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass aufgrund der Bindeeigenschaften keine Rückschlüsse auf die Nukleationsaktivität der einzelnen Proteine geschlossen werden können.

Von allen untersuchten Proteinen, zeigten nur die zwei Hydrophobinkonstrukte BioMin 144 (40aaYaaD-CPL12-DewA) und BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11-4</sub>-DewA) sowohl bindende Eigenschaften in den Mundwasserformulierungen als auch eine beschleunigte Nukleation in artifiziellm Speichel. Beide Konstrukte besitzen dasselbe Grundgerüst aus einer verkürzten Form der Synthase YaaD, einem Hydroxylapatit-bindenden Peptid und dem Hydrophobin DewA am C-Terminus. Das Konstrukt BioMin 145 wurde für weitere detaillierte Untersuchungen durch ortsgerichtete Mutagenese gewählt. Da die Nukleationsaktivität des Konstruktes auf die Sequenz des eingeführten Peptides (P<sub>11-4</sub>, QQRFEWEFEQQ) zurückgeführt werden kann, wurden anhand dieser Sequenz Alanin- und Deletionsmutanten erstellt, um für die Nukleation essentielle Aminosäuren zu identifizieren. Die Analyse der Alanin- und Deletionsmutanten verdeutlichte die wichtige Rolle der Glutamatreste für die Nukleationsaktivität von BioMin 145. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Deletionsvariante 145\_Δ8 (40aaYaaD-FEWEFE-DewA), die nur noch sechs der ursprünglichen elf Aminosäuren enthält, ein wildtyp-ähnliches Nukleationsverhalten besitzt. Auf Basis dieser Deletionsvariante wurde eine fokussierte Bibliothek erstellt. Die Analyse der erstellten Mutanten demonstrierte, dass nicht-aromatische, hydroxylierte (S) und geladene (R/D) Aminosäuren einen positiven Effekt auf die Bindung und die Nukleation von Hydroxylapatit besitzen. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden die drei Kombinationsmutanten BioMin 145\_MME\_SSS (40aaYaaD-SDSDSD-DewA), BioMin 145\_MME\_SRS (40aaYaaD-SDRDSD-DewA) und BioMin 145\_MME\_RRR (40aaYaaD-RDRDRD-DewA) erstellt. Mit diesen Mutanten konnte das Konstrukt BioMin 145 bezüglich einer beschleunigten Nukleation noch weiter optimiert werden. Besonders in Hinblick auf die Sequenz der Mutante 145\_MME\_SSS ist die Analogie zu einem aus der Natur bekannten Motiv zu erkennen. Interessanterweise wurde das ursprüngliche Peptid P<sub>11-4</sub> rational entworfen um die extrazelluläre Matrix zu imitieren. In dieser Arbeit konnte diese Sequenz, innerhalb eines Fusionsproteins (BioMin 145), schrittweise in ein biologisch aktives Motiv (SD) aus der Natur zurückgeführt werden. Die erhaltene Sequenz ähnelt stark dem aktiven Motiv des Dentinphosphoproteins, einem Protein der extrazellulären Matrix während der Dentinogenese.

# Summary

Calcium phosphate mineralization is of particular interest in dental repair. Thereby, a biomimetic approach using proteins or peptides seems to be a highly promising way to reconstruct eroded teeth.

The aim of this work was to identify proteins that can be applied in oral care products. Therefore a panel of 24 different proteins was screened for their binding and nucleating abilities towards hydroxyapatite. Binding abilities were determined after fluorescence labeling of the proteins by measurements of the fluorescence intensity and by fluorescence microscopy. Binding assays were performed in HBST buffer (150 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.5, 0.1 % Tween 20) and for more relevant conditions in the two 50 % mouthwash formulations A and B. For all 24 proteins, except the negative control, good binding abilities were detected in the HBST buffer. Interestingly, only five proteins maintained their binding activities in the mouthwash formulations and showed good binding with more than 10 % bound protein (BioMin 60, BioMin 93, BioMin 115, BioMin 144 and BioMin 145). Proteins that maintained binding in the mouthwash formulations were also tested for their binding behavior to human tooth slices. In the mouthwash formulation B only binding towards dentin, not to enamel was observed.

Beside their binding activities, the 24 proteins were investigated for their nucleation activity. Therefore two assays were adapted from the literature. Mineral formation was followed by absorbance measurements at 820 nm. In addition, the consumption of  $\text{Ca}^{2+}$  ions in the solution was detected. Nucleation was performed in a buffered salt solution and for more realistic conditions in artificial saliva. Most of the investigated proteins showed a nucleation behavior similar to the control without protein. But there were also proteins identified that showed a stabilizing effect on the nucleation and five proteins were found, that exhibit an increased nucleation in artificial saliva (BioMin 4-3, BioMin 11-2, BioMin 77-5, BioMin 144 and BioMin 145). The formed precipitate during nucleation was identified as hydroxyapatite by X-ray powder diffraction. TEM analysis showed plate-like crystals, that are typical for hydroxyapatite.

In this work proteins were identified that showed a good binding to hydroxyapatite in the mouthwash formulations, but had no increasing effect on the nucleation. In addition

## Summary

there were also proteins that exhibited an enhanced nucleation, but did not show binding activities in the mouthwash formulations. These results demonstrate that a strong binding affinity to hydroxyapatite is not necessarily an indication of its nucleation activity. Out of the 24 tested proteins only two hydrophobin fusion proteins BioMin 144 (40aaYaaD-CPL12-DewA) and BioMin 145 (40aaYaaD-P<sub>11-4</sub>-DewA) show binding abilities to hydroxyapatite in the mouthwash formulations and an increased nucleation in artificial saliva. Both constructs share the same core structure based on a truncated version of the synthase YaaD, a hydroxyapatite binding peptide and the hydrophobin DewA at the C-terminus. The construct BioMin 145 was chosen for further detailed investigations by site-directed mutagenesis. Because the nucleation activity of the construct can be attributed to the inserted peptide sequence (P<sub>11-4</sub>, QQRFEWEFEQQ), alanine and deletion variants were created based on this sequence to identify crucial amino acids for the nucleation activity. Investigation of the alanine mutations and the deletion variants clearly demonstrated the importance of the glutamate residues for the nucleation activity of BioMin 145. It has been also found that the truncated variant 145\_Δ8 (40aaYaaD-FEWEFE-DewA) containing only six of the originally eleven amino acid residues shows a wild-type like nucleation behavior. Based on this truncated variant a small focused library was created. Analysis demonstrated that non-aromatic, hydroxylated (S) and charged (R/D) amino acid residues show beneficial effects in the binding and nucleation of hydroxyapatite. With this knowledge the three combination variants BioMin 145\_MME\_SSS (40aaYaaD-SDSDSD-DewA), BioMin 145\_MME\_SRS (40aaYaaD-SDRDSD-DewA) and BioMin 145\_MME\_RRR (40aaYaaD-RDRDRD-DewA) were constructed. With these variants the protein BioMin 145 could be further engineered towards a faster nucleation activity. The sequence of the variant 145\_MME\_SSS is found to be similar to a motif found in nature. Interestingly, the original peptide P11-4 was designed to mimic the extracellular matrices. In this work this sequence within a fusion protein was subsequently modified into a biologically active motif (SD) that is found in nature. The obtained sequence is similar to the active motif in the dentin phosphoprotein, one of the proteins of the extracellular matrix during dentinogenesis.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(15):680–685.
- [2] Mann S. Biomineralization and biomimetic materials chemistry. *J Mater Chem*. 1995;5(7):935–946.
- [3] Addadi VL, Weiner S. Kontroll- und Designprinzipien bei der Biomineralisation. *Angew Chemie*. 1992;104:159–176.
- [4] Gebauer D, Cölfen H. Prenucleation clusters and non-classical nucleation. *Nano Today*. 2011;6:564–584.
- [5] Jackson AAP, Vincent JFV, Turner RM. The mechanical design of nacre. *R Soc*. 1988;234(1277):415–440.
- [6] Heinemann F, Launspach M, Gries K, Fritz M. Gastropod nacre: structure, properties and growth—biological, chemical and physical basics. *Biophys Chem*. 2011;153(2-3):126–53.
- [7] Gebauer D. Wie bilden sich Kristalle? *Nachrichten aus der Chemie*. 2013;61(11):1097–1100.
- [8] Meyers MA, McKittrick J, Chen PY. Structural biological materials: Critical mechanics-materials connections. *Science*. 2013;339:773–779.
- [9] Becker R, Dörning W. Kinetische Behandlung der Keimbildung in übersättigten Dämpfen. *Ann Phys*. 1935;416(8):719–753.
- [10] Wang L, Nancollas GH. Dynamics of biomineralization and biodemineralization. *Met Ions Life Sci*. 2010;4:413–456.
- [11] Gebauer D, Völkel A, Cölfen H. Stable prenucleation calcium carbonate clusters. *Science*. 2008;322:1819–1822.

## 6 Literaturverzeichnis

- [12] Epple M. 12 Biomineralisation. In: Biomaterialien und Biomineralisation. B. G. Teubner Verlag / GWV Fachverlage GmbH; 2003. .
- [13] Meldrum FC, Sear RP. Now you see them. *Science*. 2008;322:1802–1803.
- [14] Dorozhkin SV, Epple M. Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angew Chemie*. 2002;114:3260–3277.
- [15] Legeros RZ, Shannon IL. The crystalline components of dental calculi: Human vs. dog. *J Dent Res*. 1979;58(12):2371–2377.
- [16] Iijima M, Nelson DGA, Pan Y, Kreinbrink AT, Adachi M, Goto T, *et al.* Fluoride analysis of apatite crystals with a central planar OCP inclusion: Concerning the role of F ions on apatite-OCP-apatite structure formation. *Calcif Tissue Int*. 1996;59:377–384.
- [17] Simmer JP, Fincham AG. Molecular mechanism of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(2):84–108.
- [18] Termine JD, Eanes ED. Comparative chemistry of amorphous and apatitic calcium phosphate preparations. *Calcif Tissue Int*. 1972;10(1):171–197.
- [19] Dorozhkin SV. Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomater*. 2010;6(12):4457–4475.
- [20] Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res*. 2010;89(11):1187–1197.
- [21] Reynolds EC, Cain CJ, Webber FL, Black CL, Riley PE, Johnson IH, *et al.* Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat. *J Dent Res*. 1995;74(6):1272–1279.
- [22] Palmer LC, Newcomb CJ, Kaltz SR, Spoerke ED, Samuel I. Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chem Rev*. 2009;108(11):4754–4783.
- [23] Arnold WH. Mikromorphologie und Molekularbiologie der Dentinogenese und Amellogenese. *Dtsch Zahnarztl Z*. 2006;61(10):524–534.
- [24] Fincham AG, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol*. 1999;126:270–299.
- [25] Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol*. 1995;39(1):169–179.

## 6 Literaturverzeichnis

- [26] Boskey AL. Matrix proteins and mineralization: An overview. *Connect Tissue Res.* 1996;35:357–63.
- [27] Butler WT, Brunn JC, Qin C, McKee MD. Extracellular matrix proteins and the dynamics of dentin formation. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):301–307.
- [28] George A, Bannon L, Sabsay B, Dillon JW, Malone J, Veis A, *et al.* The carboxyl-terminal domain of phosphophoryn contains unique extended triplet amino acid repeat sequences forming ordered carboxyl-phosphate interaction ridges that may be essential in the biomineralization process. *J Biol Chem.* 1996;271(51):32869–32873.
- [29] Jonsson M, Fredriksson S, Jontell M, Linde A. Isoelectric focusing of the phosphoprotein of rat-incisor dentin in ampholine and acid pH gradients. *J Chromatogr.* 1978;157:235–242.
- [30] Stetler-Stevenson WG, Veis A. Bovine dentin phosphophoryn: Composition and molecular weight. *Biochemistry.* 1983;22(18):4326–4335.
- [31] Veis A. Mineral-matrix interactions in bone and dentin. *J Bone Miner Res.* 1993;8(Suppl 2):S493–497.
- [32] Linde A, Lussi A, Crenshaw MA. Molecular and cellular biology mineral induction by immobilized polyanionic proteins. *Calcif Tissue Int.* 1989;44:286–295.
- [33] Fujisawa R, Kuboki Y, Sasaki S. Changes in interaction of bovine dentin phosphophoryn with calcium and hydroxyapatite by chemical modifications. *Calcif Tissue Int.* 1986;39:248–251.
- [34] Yamakoshi Y. Dentinogenesis and dentin sialphosphoprotein. *J Oral Biosci.* 2010;12(3):243–253.
- [35] Yarbrough DK, Hagerman E, Eckert R, He J, Choi H, Cao N, *et al.* Specific binding and mineralization of calcified surfaces by small peptides. *Calcif Tissue Int.* 2010;86(1):58–66.
- [36] Chung HY, Li CC, Hsu CC. Characterization of the effects of 3DSS peptide on remineralized enamel in artificial saliva. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012;6:74–79.
- [37] He G, Dahl T, Veis A, George A. Nucleation of apatite crystals *in vitro* by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat Mater.* 2003;2:552–558.

## 6 Literaturverzeichnis

- [38] Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:8562–8565.
- [39] Reitmeier B. Entwicklung und Morphologie. In: Einführung die Zahnmedizin. Georg Thieme Verlag KG; 2006. p. 69–72.
- [40] Moradian-Oldak J. Amelogenins: Assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biol*. 2001;20(5-6):293–305.
- [41] Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP, Sarte P, Lau EC, Diekwisch TGH, *et al*. Self-assembly of a recombinant amelogenin protein generates supramolecular structure. *J Struct Biol*. 1994;112:103–109.
- [42] Moradian-Oldak J, Tan J, Fincham AG. Interaction of amelogenin with hydroxyapatite crystals: An adherence effect through amelogenin molecular self-association. *Biopolymers*. 1998;46(4):225–238.
- [43] Iijima M, Moradian-Oldak J. Control of octacalcium phosphate and apatite crystal growth by amelogenin matrices. *J Mater Chem*. 2004;14:2189–2199.
- [44] Tarasevich BJ, Howard CJ, Larson JL, Snead ML, Simmer JP, Paine M, *et al*. The nucleation and growth of calcium phosphate by amelogenin. *J Cryst Growth*. 2007;304:407–415.
- [45] Shaw WJ, Ferris K, Tarasevich BJ, Larson JL. The structure and orientation of the C-terminus of LRAP. *Biophys J*. 2008;94:3247–3257.
- [46] LeNorey E, Beniash E, Yamakoshi Y, Simmer JP, Margolis HC. Leucine-rich amelogenin peptides regulate mineralization *in vitro*. *J Dent Res*. 2011;90:1091–1097.
- [47] Robinson C, Connell S, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Smith DAM. Surface chemistry of enamel apatite during maturation in relation to pH: Implications for protein removal and crystal growth. *Arch Oral Biol*. 2005;50:267–270.
- [48] Schlesinger DH, Hay DI. Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. *J Biol Chem*. 1977;252(5):1689–1695.
- [49] Bennick A, Cannon M, Madapallimattam G. The nature of the hydroxyapatite-binding site in salivary acidic proline-rich proteins. *Biochem J*. 1979;183(1):115–126.
- [50] Stookey GK. The effect of saliva on dental caries. *J Am Dent Assoc*. 2008;139(suppl 2):11S–17S.

## 6 Literaturverzeichnis

- [51] Lussi A, Belser U, Filippi A, Gmür R, Zimmerli B, Neuhaus K, *et al.* Caseinphosphopeptid – amorphes Calciumphosphat (CPP-ACP) und seine Wirkung auf die Zahnhartsubstanz. *Schweiz Monatsschreiben Zahnmedizin.* 2009;119:109–116.
- [52] Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997;25(5):5–12.
- [53] ten Cate JM, Featherstone JDB. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(2):283–296.
- [54] Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: Role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999;27(5):31–40.
- [55] Leverett DH. Fluorides and the changing prevalence of dental caries. *Science.* 1982;217:26–30.
- [56] Kwon KY, Wang E, Nofal M, Lee SW. Microscopic study of hydroxyapatite dissolution as affected by fluoride ions. *Langmuir.* 2011;27:5335–5339.
- [57] ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand.* 1999;57(6):325–329.
- [58] Abanto Alvarez J, Rezende KMPC, Marocho SMS, Alves FBT, Celiberti P, Ciampomi AL. Dental fluorosis: Exposure, prevention and management. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009;14(2):E103–107.
- [59] Nakashima S, Yoshie M, Sano H, Bahar A. Effect of a test dentifrice containing nano-sized calcium carbonate on remineralization of enamel lesions *in vitro*. *J Oral Sci.* 2009;51(1):69–77.
- [60] Vandiver J, Dean D, Patel N, Bonfield W, Ortiz C. Nanoscale variation in surface charge of synthetic hydroxyapatite detected by chemically and spatially specific high-resolution force spectroscopy. *Biomaterials.* 2005;26(3):271–83.
- [61] Hannig M, Hannig C. Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat Nanotechnol.* 2010;5(8):565–569.
- [62] Huang Z, Newcomb CJ, Bringas P, Stupp SI, Snead ML. Biological synthesis of tooth enamel instructed by an artificial matrix. *Biomaterials.* 2010;31(35):9202–9211.
- [63] Huang SB, Gao SS, Yu HY. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion *in vitro*. *Biomed Mater.* 2009;4:1–6.

## 6 Literaturverzeichnis

- [64] Roveri N, Battistella E, Bianchi CL, Foltran I, Foresti E, Iafisco M, *et al.* Surface enamel remineralization: Biomimetic apatite nanocrystals and fluoride ions different effects. *J Nanomater.* 2009;2009:1–9.
- [65] Reynolds EC. Anticariogenic phosphopeptides [US Patent 5015628]. University of Melbourne; Victoria Dairy Industry Authority, Victoria, Australia; 1991.
- [66] Cross KJ, Huq NL, Palamara JE, Perich JW, Reynolds EC. Physicochemical characterization of casein phosphopeptide- amorphous calcium phosphate nanocomplexes. *J Biol Chem.* 2005;280(15):15362–15369.
- [67] Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res.* 1997;76(9):1587–1595.
- [68] Reynolds EC. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: The scientific evidence. *Adv Dent Res.* 2009;12:25–29.
- [69] Cochrane NJ, Reynolds EC. Calcium phosphopeptides - Mechanisms of action and evidence for clinical efficacy. *Adv Dent Res.* 2012;24(2):41–47.
- [70] Manton DJ, Cai F, Yuan Y, Walker GD, Cochrane NJ, Reynolds C, *et al.* Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate added to acidic beverages on enamel erosion *in vitro*. *Aust Dent J.* 2010;55:275–279.
- [71] Morgan MV, Adams GG, Bailey DL, Tsao CF, Fischman SL, Reynolds EC. The anticariogenic effect of sugar-free gum containing CPP- ACP nanocomplexes on approximal caries determined using digital bitewing radiography. *Caries Res.* 2008;42:171–184.
- [72] Andersson A, Skold-Larsson K, Hallgre A, Petersson LG, Twetman S. Effect of a dental cream containing amorphous calcium phosphate complexes on white spot lesion regression assessed by laser fluorescence. *Oral Health Prev Dent.* 2007;5:229–233.
- [73] Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res.* 2008;42:88–97.
- [74] Reynolds EC. Calcium phosphate-based remineralization systems: Scientific evidence? *Aust Dent J.* 2008;53:268–273.

## 6 Literaturverzeichnis

- [75] Aggeli A, Boden N, Zhang S. Self-assembly of peptides in medicine: Two sides of the coin. *Mol Med Today*. 1999;5:512–513.
- [76] Kirkham J, Firth A, Vernals D, Boden N, Robinson C, Shore RC, *et al.* Self-assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. *J Dent Res*. 2007;86(5):426–430.
- [77] Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1951;62(3):293–300.
- [78] Panich M, Poolthong S. The effect of casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate and a cola soft drink on *in vitro* enamel hardness. *J Am Dent Assoc*. 2009;140:455–460.
- [79] Tsuji T, Onuma K, Yamamoto A, Iijima M, Shiba K. Direct transformation from amorphous to crystalline calcium phosphate facilitated by motif-programmed artificial proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(44):16866–16870.
- [80] Sewell SL, Wright DW. Biomimetic synthesis of titanium dioxide utilizing the R5 peptide derived from *Cylindrotheca fusiformis*. *Chem Mater*. 2006;18(13):3108–3113.
- [81] Qiagen. The QIA expressionist™. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins; 2003.
- [82] Invitrogen. Amine-reactive probes. Molecular Probes, Inc.; 2011.
- [83] Saheki S, Takeda A. Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Anal Biochem*. 1985;148:277–281.
- [84] Gungormus M, Fong H, Kim IW, Evans JS, Tamerler C, Sarikaya M. Regulation of *in vitro* calcium phosphate mineralization by combinatorially selected hydroxyapatite-binding peptides. *Biomacromolecules*. 2008;9(3):966–973.
- [85] Kaur D. Development of a cheap and rapid method to determine calcium in milk fractions in an industrial environment [Master Thesis]. Auckland University of Technology; 2007.
- [86] Chung WJ, Kwon KY, Song J, Lee SW. Evolutionary screening of collagen-like peptides that nucleate hydroxyapatite crystals. *Langmuir*. 2011;27(12):7620–7628.
- [87] Jardim JJ, Pagot MA, Maltz M. Artificial enamel dental caries treated with different topical fluoride regimes: An *in situ* study. *J Dent*. 2008;36:396–401.

- [88] Chin KA, Nancollas GH. Dissolution of fluorapatite. A constant-composition kinetics study. *Langmuir*. 1991;7(10):2175–2179.
- [89] Wohlleben W, Subkowski T, Bollschweiler C, von Vacano B, Liu Y, Schrepp W, *et al.* Recombinantly produced hydrophobins from fungal analogues as highly surface-active performance proteins. *Eur Biophys J*. 2010;39(3):457–468.
- [90] Chen PH, Tseng YH, Mou Y, Tsai YL, Guo SM, Huang SJ, *et al.* Adsorption of a statherin peptide fragment on the surface of nanocrystallites of hydroxyapatite. *J Am Chem Soc*. 2008;130(9):2862–2868.
- [91] Johnsson M, Levine MJ, Nancollas GH. Hydroxyapatite binding domains in salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(4/3):371–378.
- [92] Ndao M, Ash JT, Stayton PS, Drobny GP. The role of basic amino acids in the molecular recognition of hydroxyapatite by statherin using solid state NMR. *Surf Sci*. 2010;604(15-16):L39–L42.
- [93] Weidner T, Dubey M, Breen NF, Ash J, Baio JE, Jaye C, *et al.* Direct observation of phenylalanine orientations in statherin bound to hydroxyapatite surfaces. *J Am Chem Soc*. 2012;134:8750–8753.
- [94] Arvanitis DA, Vafiadaki E, Sanoudou D, Kranias EG. Histidine-rich calcium binding protein: The new regulator of sarcoplasmic reticulum calcium cycling. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(1):43–49.
- [95] Aoba T, Moreno EC, Kresak M, Tanabe T. Possible roles of partial sequences at N- and C-termini of amelogenin in protein-enamel mineral interaction. *J Dent Res*. 1989;68(9):1331–1336.
- [96] Shaw WJ, Campbell AA, Paine ML, Snead ML. The COOH terminus of the amelogenin, LRAP, is oriented next to the hydroxyapatite surface. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40263–40266.
- [97] Yin A, Margolis HC, Grogan J, Yao Y, Troxler RF, Oppenheim FG. Physical parameters of hydroxyapatite adsorption and effect on candidacidal activity of histatins. *Arch Oral Biol*. 2003;48:361–368.
- [98] Bennick A, McLaughlin AC, Greyl AA, Madapallimattamt G. The location and nature of calcium-binding sites in salivary acidic proline-rich phosphoproteins. *J Biol Chem*. 1981;256:4741–4746.

## 6 Literaturverzeichnis

- [99] Moreno EC, Kresak M, Hay DI. Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite. *Calcif Tissue Int.* 1984;36:48–59.
- [100] Moreno EC, Kresak M, Hay DI. Adsorption thermodynamics of acidic proline-rich human salivary proteins onto calcium apatites. *J Biol Chem.* 1982;257:2981–2989.
- [101] Driscoll J, Zuo Y, Xu T, Choi JR, Troxler RF, Oppenheim E. Functional comparison of native and recombinant human salivary histatin 1. *J Dent Res.* 1995;74(12):1837–1844.
- [102] Lamkin MS, Arancillo AA, Oppenheim EG. Temporal and compositional characteristics of salivary protein adsorption to hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1996;75(2):803–808.
- [103] Moradian-Oldak J, Bouropoulos N, Wang L, Gharakhanian N. Analysis of self-assembly and apatite binding properties of amelogenin proteins lacking the hydrophilic C-terminal. *Matrix Biol.* 2002;21:197–205.
- [104] Valo HK, Laaksonen H, Peltonen LJ, Linder MB, Hirvonen JT, Laaksonen TJ. Multifunctional hydrophobin: Toward functional coatings for drug nanoparticles. *ACS Nano.* 2010;4(3):1750–1758.
- [105] Lumsdon SO, Green J, Stieglitz B. Adsorption of hydrophobin proteins at hydrophobic and hydrophilic interfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005;44(4):172–178.
- [106] Scholtmeijer K, Janssen MI, Gerssen B, Vocht MLD, Leeuwen BMV, Van TG, *et al.* Surface modifications created by using engineered hydrophobins. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(3):1367–1373.
- [107] Janssen MI, van Leeuwen MBM, Scholtmeijer K, van Kooten TG, Dijkhuizen L, Wösten HAB. Coating with genetic engineered hydrophobin promotes growth of fibroblasts on a hydrophobic solid. *Biomaterials.* 2002;23(24):4847–4854.
- [108] Hektor HJ, Scholtmeijer K. Hydrophobins: Proteins with potential. *Curr Opin Biotechnol.* 2005;16:434–439.
- [109] Santhiya D, Burghard Z, Greiner C, Jeurgens LPH, Subkowski T, Bill J. Bioinspired deposition of TiO<sub>2</sub> thin films induced by hydrophobins. *Langmuir.* 2010;26(9):6494–502.
- [110] Subkowski T, Karos M. Industrial performance proteins: Hydrophobin - learning from nature. *J Biotechnol.* 2007;131S:S212–S213.

## 6 Literaturverzeichnis

- [111] Morris VK, Kwan AH, Sunde M. Analysis of the structure and conformational states of DewA gives insight into the assembly of the fungal hydrophobins. *J Mol Biol.* 2013;425(2):244–256.
- [112] Gungormus M, Oren EE, Horst JA, Fong H, Hnilova M, Somerman MJ, *et al.* Cementomimetics - Constructing a cementum-like biomineralized microlayer via amelogenin-derived peptides. *Int J Oral Sci.* 2012;4:69–77.
- [113] Weiner S, Addadi L. Design strategies in mineralized biological materials. *J Mater Chem.* 1997;7(5):689–702.
- [114] Chang S, Chen H, Liu J, Wood D, Bentley P, Clarkson B. Synthesis of a potentially bioactive, hydroxyapatite-nucleating molecule. *Calcif Tissue Int.* 2006;78(1):55–61.
- [115] He G, George A. Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition *in vitro*. *J Biol Chem.* 2004;279(12):11649–11656.
- [116] Lee JY, Choo JE, Choi YS, Park JB, Min DS, Lee SJ, *et al.* Assembly of collagen-binding peptide with collagen as a bioactive scaffold for osteogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials.* 2007;28:4257–4267.
- [117] Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J. Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials.* 2009;30(4):478–483.
- [118] Gerth HUV, Dammaschke T, Schäfer E, Züchner H. A three layer structure model of fluoridated enamel containing  $\text{CaF}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  and FAp. *Dent Mater.* 2007;23(12):1521–1528.
- [119] Fulmer M, Brown PW. Low-temperature formation of fluorapatite in aqueous solution. *J Am Ceram Soc.* 1992;75(12):3401–3407.
- [120] Müller F, Zeitz C, Mantz H, Ehses KH, Soldera F, Schmauch J, *et al.* Elemental depth profiling of fluoridated hydroxyapatite: Saving your dentition by the skin of your teeth? *Langmuir.* 2010;26(24):18750–18759.
- [121] MacIntire WH, Hardin LJ, Oldham FD, Hammond JW. Development of  $\text{P}_2\text{O}_5$  insolubility in phosphatic mixtures the formation of fluorapatite as its causein. *Ind Eng Chem.* 1937;29(7):758–766.
- [122] Heinonen H, Laaksonen P, Linder MB, Hentze HP. Engineered hydrophobin for biomimetic mineralization of functional calcium carbonate microparticles. *J Biomater Nanobiotechnol.* 2014;5:1–7.

## 6 Literaturverzeichnis

- [123] Fernandez VL, Reimer JA, Denn MM. Magnetic resonance studies of polypeptides adsorbed on silica and hydroxyapatite surface. *J Am Chem Soc.* 1992;114:9634–9642.
- [124] Ilhan S. Untersuchung der Bindungseigenschaften und Nukleationsfähigkeit eines Fusionsproteins aus Hydrophobin und Chungpeptid und seiner Mutanten an Hydroxylapatit [Bachleorarbeit]. Universität Stuttgart; 2013.
- [125] Tye CE, Rattray KR, Warner KJ, Gordon JAR, Sodek J, Hunter GK, *et al.* Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. *J Biol Chem.* 2003;278(10):7949–7955.
- [126] Gajjaraman S, Narayanan K, Hao J, Qin C, George A. Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *J Biol Chem.* 2007;282(2):1193–1204.
- [127] Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.* 1996;317:59–64.
- [128] Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: Structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J.* 1994;300(3):723–728.
- [129] Bolander ME, Young MF, Fisher LW, Yamada Y, Termine JD. Osteonectin cDNA sequence reveals potential binding regions for calcium and hydroxyapatite and shows homologies with both a basement membrane protein (SPARC) and a serine proteinase inhibitor (ovomucoid). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(9):2919–2923.
- [130] Fujisawa R, Wada Y, Nodasaka Y, Kuboki Y. Acidic amino acid-rich sequences as binding sites of osteonectin to hydroxyapatite crystals. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1292:53–60.
- [131] Kretsinger RH, Nockolds CE. Carp muscle calcium-binding protein: II. Structure determination and general description. *J Biol Chem.* 1973;248(9):3313–3326.
- [132] Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J.* 2007;405(2):199–221.
- [133] Aggeli A, Bell M, Carrick LM, Fishwick CWG, Harding R, Mawer PJ, *et al.* pH as a trigger of peptide  $\beta$ -sheet self-assembly and reversible switching between nematic and isotropic phases. *J Am Chem Soc.* 2003;125(32):9619–9628.

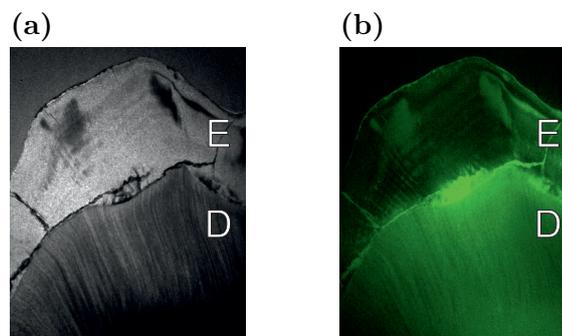
## 6 Literaturverzeichnis

- [134] Su-ping H. Inhibition mechanism of aspartic acid on crystal growth of hydroxyapatite. *Trans Nonferrous Met Soc China*. 2007;17:612–616.
- [135] Addadi VL, Weiner S. Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82(12):4110–4114.
- [136] Paradís-Bas M, Tulla-Puche J, Zompra AA, Albericio F. RADA-16: A tough peptide - strategies for synthesis and purification. *European J Org Chem*. 2013;26:5871–5878.

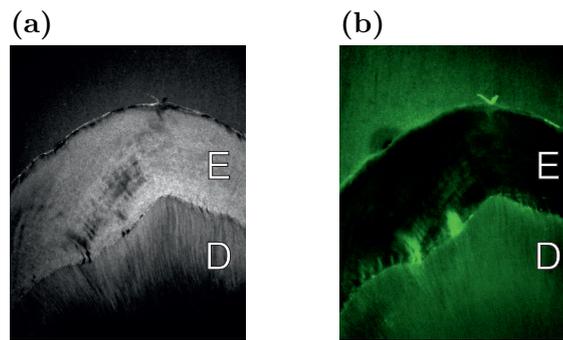
# 7 Anhang

## 7.1 Bindung an menschliche Zahnschnitte

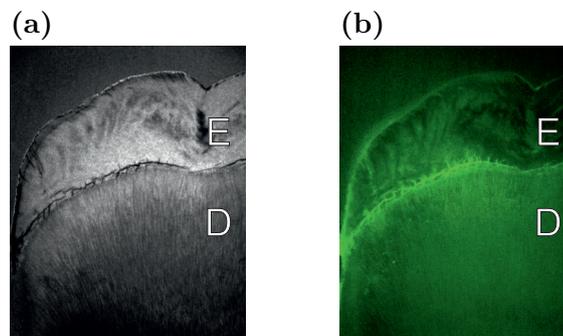
Proteine, für die eine Bindefähigkeit in den Mundwasserformulierungen A und B nachgewiesen werden konnte, wurden weiter auf ihr Bindevverhalten an menschliche Zahnschnitte untersucht (siehe 2.13.6 und 3.1.1.2). Im folgenden sind die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen angeführt. Es konnte hauptsächlich eine Bindung an Dentin, jedoch nicht an Enamel nachgewiesen werden.



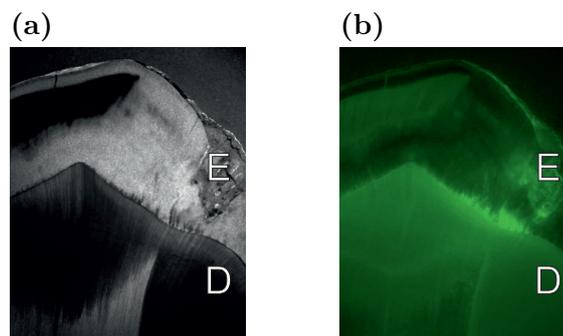
**Abbildung 7.1:** Abbildung eines menschlichen Zahnschnittes nach Bindung von BioMin 8-2-1 in 50% igem Mundwasser B. (a) zeigt das Durchlichtbild, (b) das entsprechende Fluoreszenzbild. Die unterschiedlichen Kompartimente Dentin (D) und Enamel (E) sind durch die weißen Buchstaben gekennzeichnet.



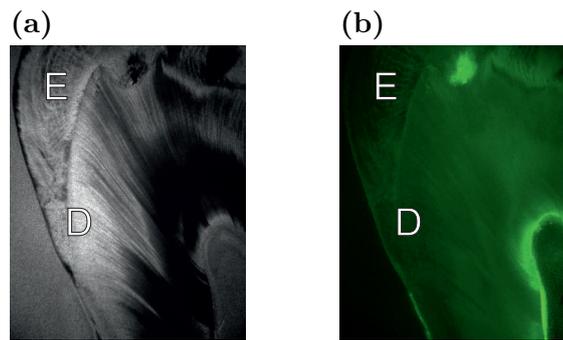
**Abbildung 7.2:** Abbildung eines menschlichen Zahnschnittes nach Bindung von BioMin 65 in 50% igem Mundwasser B. (a) zeigt das Durchlichtbild, (b) das entsprechende Fluoreszenzbild. Die unterschiedlichen Kompartimente Dentin (D) und Enamel (E) sind durch die weißen Buchstaben gekennzeichnet.



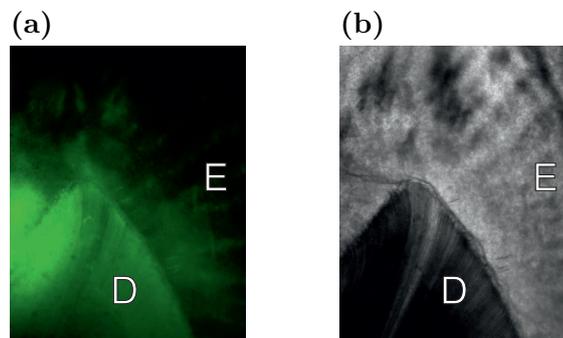
**Abbildung 7.3:** Abbildung eines menschlichen Zahnschnittes nach Bindung von BioMin 93 in 50% igem Mundwasser B. (a) zeigt das Durchlichtbild, (b) das entsprechende Fluoreszenzbild. Die unterschiedlichen Kompartimente Dentin (D) und Enamel (E) sind durch die weißen Buchstaben gekennzeichnet.



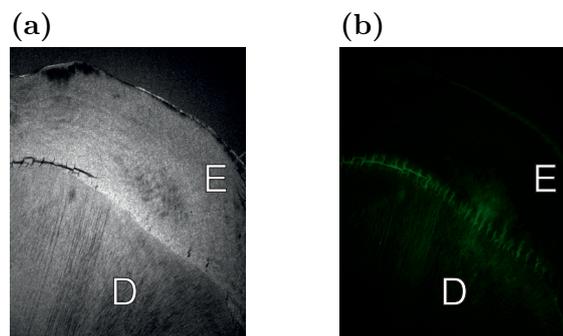
**Abbildung 7.4:** Abbildung eines menschlichen Zahnschnittes nach Bindung von BioMin 104-1 in 50% igem Mundwasser B. (a) zeigt das Durchlichtbild, (b) das entsprechende Fluoreszenzbild. Die unterschiedlichen Kompartimente Dentin (D) und Enamel (E) sind durch die weißen Buchstaben gekennzeichnet.



**Abbildung 7.5:** Abbildung eines menschlichen Zahnschnittes nach Bindung von BioMin 115 in 50% igem Mundwasser B. (a) zeigt das Durchlichtbild, (b) das entsprechende Fluoreszenzbild. Die unterschiedlichen Kompartimente Dentin (D) und Enamel (E) sind durch die weißen Buchstaben gekennzeichnet.



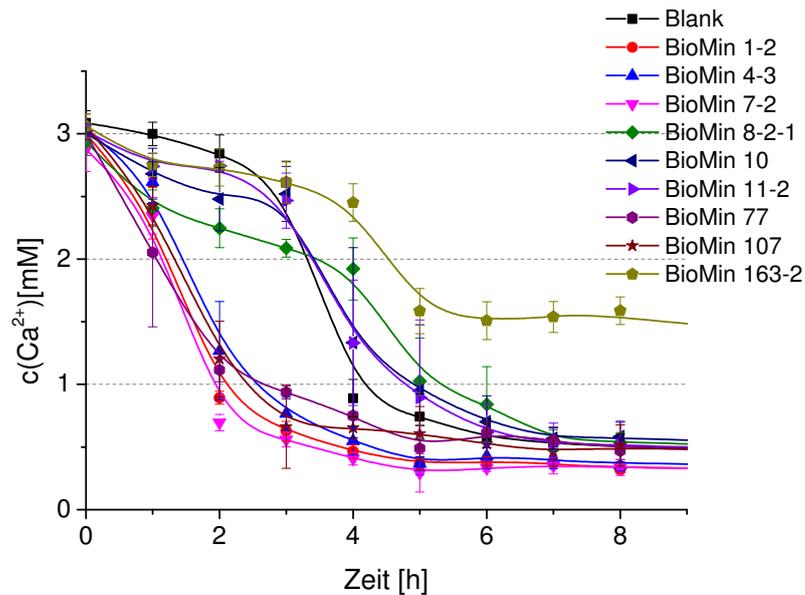
**Abbildung 7.6:** Abbildung eines menschlichen Zahnschnittes nach Bindung von BioMin 144 in 50% igem Mundwasser B. (a) zeigt das Durchlichtbild, (b) das entsprechende Fluoreszenzbild. Die unterschiedlichen Kompartimente Dentin (D) und Enamel (E) sind durch die weißen Buchstaben gekennzeichnet.



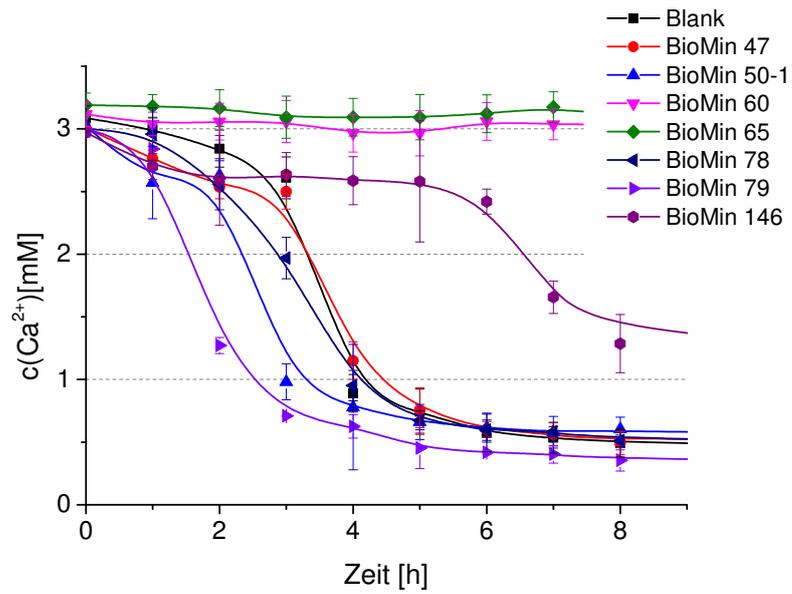
**Abbildung 7.7:** Abbildung eines menschlichen Zahnschnittes nach Bindung von BioMin 146 in 50% igem Mundwasser B. (a) zeigt das Durchlichtbild, (b) das entsprechende Fluoreszenzbild. Die unterschiedlichen Kompartimente Dentin (D) und Enamel (E) sind durch die weißen Buchstaben gekennzeichnet.

## 7.2 Nukleation in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5

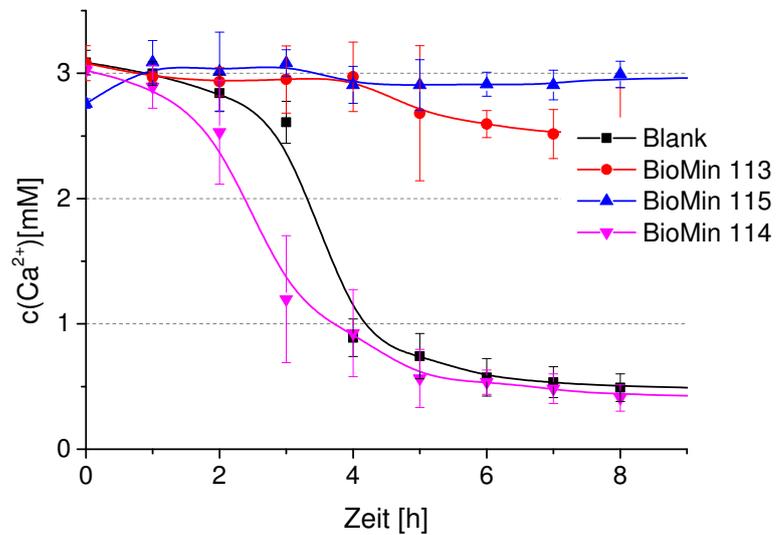
Für die Bewertung der Nukleationseigenschaften der 24 unterschiedlichen Proteine wurde die Abnahme der Calciumkonzentration in einer Lösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 verfolgt (siehe 2.14.3 und 3.1.2.1.2). Im Folgenden sind die Nukleationsverläufe der unterschiedlichen Proteine aufgeführt.



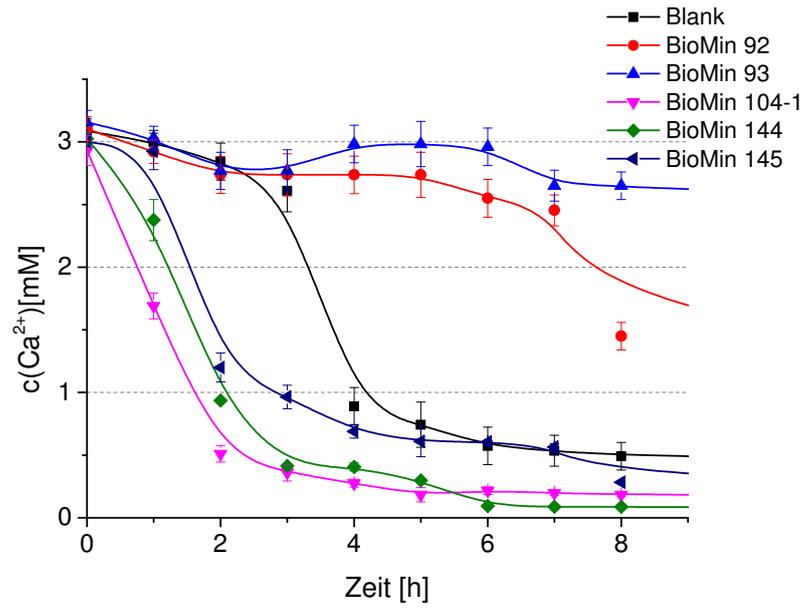
**Diagramm 7.1:** Übersicht über die Nukleation der Ameelgeninderivate in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 mit 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .



**Diagramm 7.2:** Übersicht über die Nukleation der Kontrollen und weiterer Proteine in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 mit 3,0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.



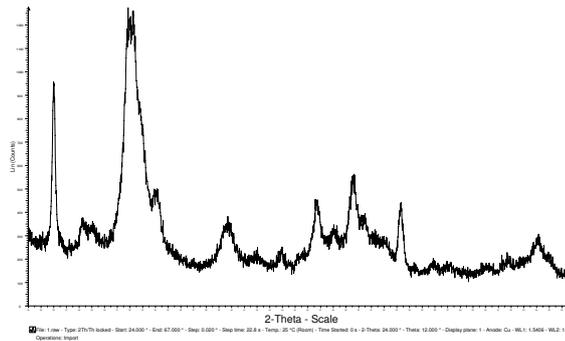
**Diagramm 7.3:** Übersicht über die Nukleation der Statherinderivate in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 mit 3,0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.



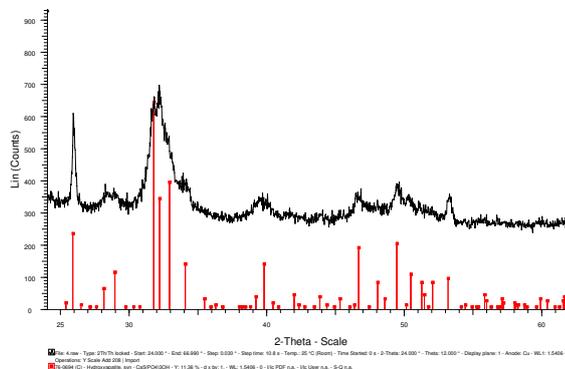
**Diagramm 7.4:** Übersicht über die Nukleation der Hydrophobinderivate in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 mit 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

### 7.2.1 Charakterisierung über X-ray Pulverdiffraktometrie

Für ausgewählte Proteine wurde der während der Nukleation (3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5) gebildete Niederschlag über Pulverdiffraktometrie charakterisiert. In allen Fällen konnte Hydroxylapatit als entstandene Phase identifiziert werden.

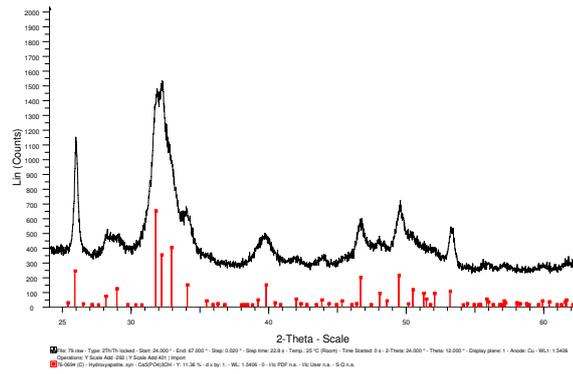


**Abbildung 7.8:** Pulverdiffraktogramm des Präzipitates gebildet in der Nukleationslösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 in der Gegenwart von BioMin 1-2.

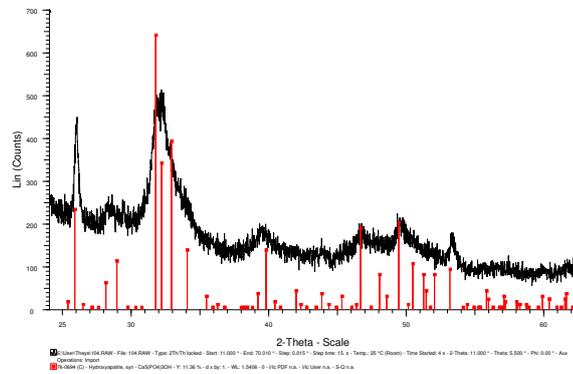


**Abbildung 7.9:** Pulverdiffraktogramm des Präzipitates gebildet in der Nukleationslösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 in der Gegenwart von BioMin 4-3.

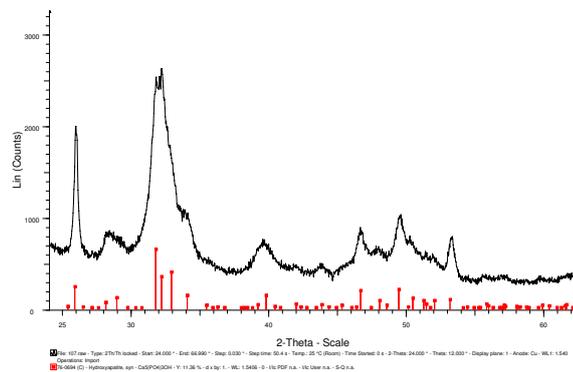
## 7 Anhang



**Abbildung 7.10:** Pulverdiffraktogramm des Präzipitates gebildet in der Nukleationslösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 in der Gegenwart von BioMin 79.

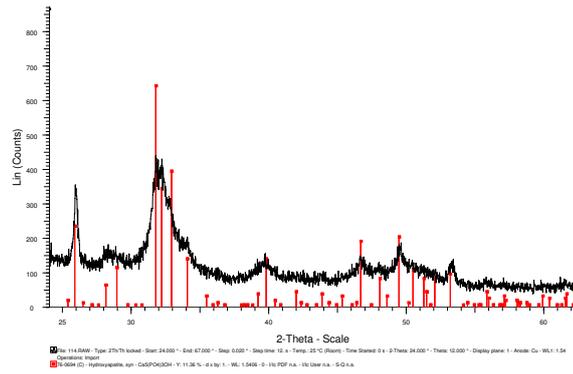


**Abbildung 7.11:** Pulverdiffraktogramm des Präzipitates gebildet in der Nukleationslösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 in der Gegenwart von BioMin 104-1.

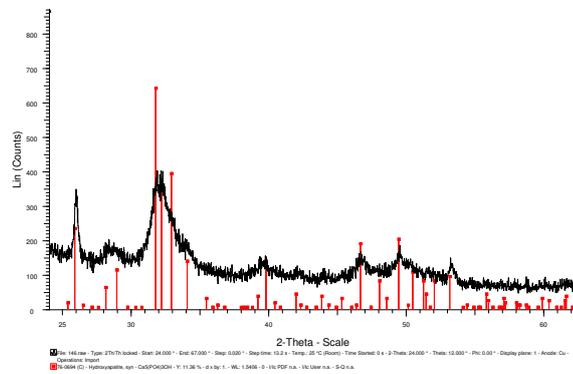


**Abbildung 7.12:** Pulverdiffraktogramm des Präzipitates gebildet in der Nukleationslösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 in der Gegenwart von BioMin 107.

## 7 Anhang



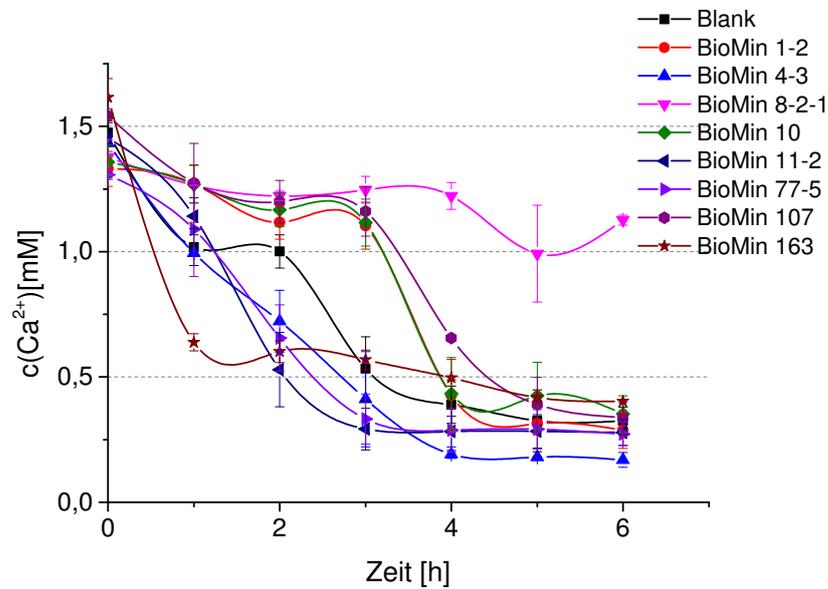
**Abbildung 7.13:** Pulverdiffraktogramm des Präzipitates gebildet in der Nukleationslösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 in der Gegenwart von BioMin 114.



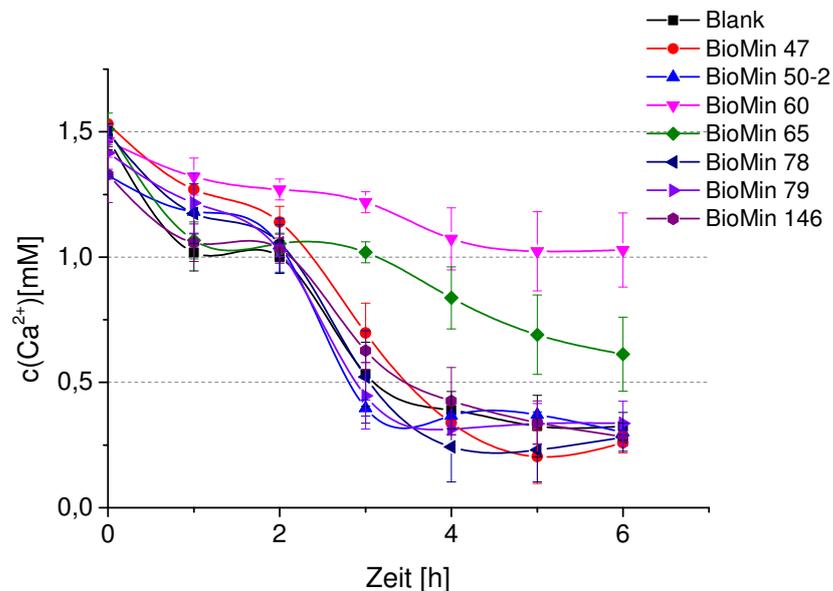
**Abbildung 7.14:** Pulverdiffraktogramm des Präzipitates gebildet in der Nukleationslösung aus 3,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 10 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 in der Gegenwart von BioMin 146.

### 7.3 Nukleation in artifiziellem Speichel

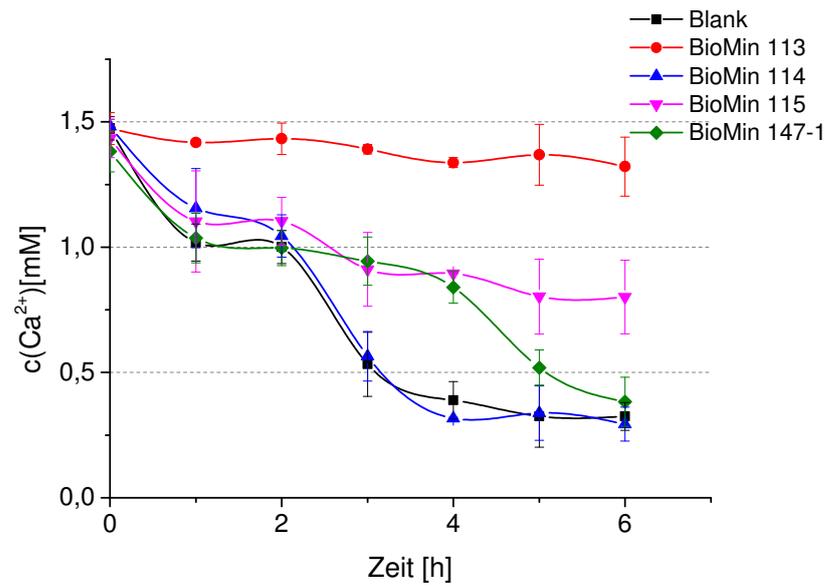
Im Folgenden sind die Nukleationsverläufe der unterschiedlichen Proteine in artifiziellem Speichel aufgeführt.



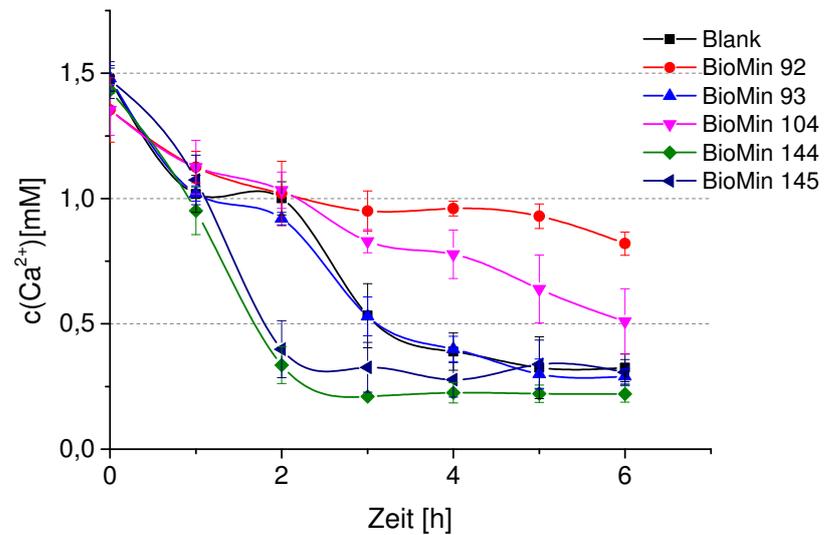
**Diagramm 7.5:** Übersicht über die Nukleation der Amelogeninderivate in artifiziellem Speichel.



**Diagramm 7.6:** Übersicht über die Nukleation der Kontrollen und weiterer Proteine in artifiziellem Speichel.



**Diagramm 7.7:** Übersicht über die Nukleation der Statherinderivate in artifiziellem Speichel.



**Diagramm 7.8:** Übersicht über die Nukleation der Hydrophobinderivate in artifiziellem Speichel.

# LEBENS LAUF

---

## PERSÖNLICHE DATEN

### **Melanie Melcher**

Adlerstr. 2/9  
71409 Schwaikheim  
E-Mail: melanie\_melcher@gmx.de

## GEBURTSDATEN

18.07.1984, Waiblingen

## AUSBILDUNG

- |                   |   |
|-------------------|---|
| seit 2010 - 2014  | <b>Promotion</b> , Universität Stuttgart<br><br>Institut für Technische Biochemie, Arbeitsgruppe Funktionelle Biomaterialien bei Prof. Dr. Bernhard Hauer<br>„Charakterisierung von Proteinen für die Biomineralisation von Hydroxylapatit“ |
| 2004 – 2010       | Beginn – Ende <b>Diplomstudium Chemie</b> , Universität Stuttgart   |
| 11/2009 – 05/2010 | <b>Diplomarbeit</b> , Universität Stuttgart, Institut für Technische Biochemie<br>„Identifikation von Erregern bei Harnwegsinfektionen mittels DNA-Mikroarray“  |
| 04/2008-09/2008   | Erasmus- <b>Auslandsaufenthalt</b> , Universität von Zaragoza, Spanien<br>„Thioharnstoff-katalysierte Reaktionen“   |
| 1995 – 2004       | Abitur, Albertus-Magnus-Gymnasium, Sommerrain   |
| 1991 – 1995       | Kepler-Grundschule, Korb  |

## PUBLIKATIONEN

Rothenstein, D., Facey, S.J., Ploss, M., Hans, P., **Melcher, M.**, Srot, V., van Aken, P.A., Hauer, B., Bill, J., 2013. Mineralisation of gold nanoparticles using tailored M13 phages. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials* In Press