

Abbildung 1. Teilchenverteilung (Anteile x [%]) für eine Komplexlösung ($[Fe]_t = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $[L]_t = 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (8/2)). Es sind nur die Fe-haltigen Spezies gezeigt. Zur Berechnung verwendet man die Bildungskonstanten und die pK_s -Werte aus Tabelle 1.

- Auswertung mit Kleinstfehlerquadrat-Verfahren (R. A. Binstead, A. D. Zuberbühler, SPECFIT Version 2.10, Spectrum Software Associates, Chapel Hill, NC 27515-4494 (USA); siehe auch H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, 32, 257–264).
- [15] Die Messungen wurden auf einem DX17MV-Gerät der Firma Applied Photophysics bei 25°C durchgeführt.
 - [16] Die mittlere Verweilzeit eines Wasserliganden in $[\text{Al}(\text{OH}_3)_6]^{3+}$ ist etwa 150mal größer als bei $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ (D. T. Richens, *The Chemistry of Aqua Ions*, Wiley, Chichester, **1997**).
 - [17] In Analogie zu den von Ryabukhin beschriebenen Verbindungen^[4] handelt es sich vermutlich um polymere Komplexe. Die C,H,N-Analyse des Cu-Komplexes stimmt mit der Formulierung $\text{Cu}(\text{HL}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ überein. Um die Bildung fester Phasen zu vermeiden, wurden Austauschtitrationen durchgeführt, in welchen das Metallkation M^{2+} als Nitrilotriacetato(NTA)- oder Iminodiacetato(IDA)-Komplex vorgelegt und in Gegenwart des Liganden H_3L durch Zugabe von KOH in den 1:2-Komplex $[\text{ML}]^{4-}$ überführt wurde. Alle benötigten pK_s -Werte und Stabilitätskonstanten von H_3NTA und H_2IDA wurden für das $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ -System vorab bestimmt.
 - [18] R. D. Hancock, *J. Chem. Educ.* **1992**, 69, 615–621.
 - [19] M. Ghisletta, L. Hausherr-Primo, K. Gajda-Schrantz, G. Machula, L. Nagy, H. W. Schmalle, G. Rihs, F. Endres, K. Hegetschweiler, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 997–1008.

Kryo-TEM-Schnappschüsse von auf kleinen Zeolithkristallen adsorbiertem Ferritin**

Daniel Klint, Gunnar Karlsson und Jan-Olov Bovin*

Die Entwicklung von Kryo-Methoden für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) hat die Zahl untersuchbarer biologischer Systeme anwachsen lassen.^[1] Die Kryo-TEM hat sich zu einem Standardwerkzeug für die Untersuchung von Wasser/Detergens-Systemen^[2] und der Keim-

[*] Prof. J.-O. Bovin, Dr. D. Klint
National Center for HREM, Inorganic Chemistry 2
Center for Chemistry and Chemical Engineering
Lund University
P.O. Box 124, S-22100 Lund (Schweden)
Fax: (+46) 46-222-40-12
E-mail: jan-olov.bovin@org2.lth.se
G. Karlsson
The Biomicroscopy Unit, Chemical Center, Lund University (Schweden)

[**] Diese Arbeit wurde vom schwedischen National Science Research Council gefördert. Die Biomikroskopieeinheit wurde von der Knut- und Alice-Wallenberg-Stiftung finanziert.

bildung von Kristallen anorganischer Verbindungen in Wasser entwickelt.^[3, 4] Wir stellen im folgenden erstmals Aufnahmen vor, die die Wechselwirkungen von gelösten Proteinen mit Kristallen von Zeolith Y deutlich machen. Es ließ sich zeigen, daß eine ausgeprägte Adsorption von Ferritin auf ultrastabilem Zeolith Y die Proteinaggregation beeinflußt. Die Adsorption von Ferritinmolekülen auf Kristallen von Low- und High-silica-Zeolith Y führt zu unterschiedlichen Anordnungen der Proteinmoleküle. Auch ließ sich zeigen, daß Strukturinformationen wie Elementarzellenparameter der anorganischen Materialien in eingefrorener Lösung bestimmt werden können.

In den letzten Jahren hat sich die Verwendung von Zeolithen (kristallinen Alumosilikaten) als Alternative oder Ergänzung für die herkömmlichen zur Reinigung von Proteinen entwickelten biochemischen Methoden etabliert.^[5, 6] Frühere Untersuchungen der Adsorption von Proteinen auf ultrastabilem Zeolith Y (USY) hatten ergeben, daß die Proteinadsorption vom pH-Wert und von der Ionenstärke abhängt.^[5] Es wird angenommen, daß der Vorgang vorwiegend über Proteinaggregate vermittelt abläuft, die mit der Zeolithoberfläche wechselwirken.

Ferritin ist ein in Tieren und Pflanzen vorkommendes, kugelförmiges Eisenspeicherprotein, dessen Durchmesser etwa 12 nm beträgt. Der Eisenkern kann aus bis zu 4500 Eisenionen bestehen, was bei der mikroskopischen Untersuchung zu guten Kontrasten führt. In TEM-Aufnahmen sind Ferritinmoleküle als schwarze Punkte zu sehen; der Durchmesser des Eisenkerns beträgt etwa 5 nm. Der durch den Eisenkern bedingte hohe Kontrast erschwert es, die Proteinschale zu erkennen. Apoferritin (Ferritin ohne den Eisenkern) ist ein Doughnut-förmiges Molekül mit einem Durchmesser von 12 nm. Im allgemeinen ist die Löslichkeit eines Proteins in der Nähe des isoelektrischen Punktes (IEP) am geringsten (der IEP ist der pH-Wert, bei dem die Summe aller Ladungen des Proteins null ist). Bei Ferritin liegt der IEP bei pH = 4.5, und in Lösungen mit pH-Werten um den IEP liegen demnach Proteinaggregate vor. Die Adsorbensmatrix ist USY, das aus der Stammverbindung NaY durch eine Desaluminierung nach der Synthese erhalten wurde.^[7] Beide Zeolithe weisen die Faujasit(FAU)-Struktur auf, unterscheiden sich aber im Si/Al-Verhältnis und in der Oberflächentextur. Das Si/Al-Verhältnis beträgt bei NaY 2.6 und bei USY 230, was auf den großen Unterschied der Gerüstladungsdichten und demzufolge auch der Oberflächenladungsdichten hinweist. Die Texturen unterscheiden sich durch die bei USY vorhandenen Mesoporen, die bei der Desaluminierung entstehen,^[8] was zu weniger definierten Kristallformen bei USY führt.

Ferritin konnte aus Acetatlösung (20 mmol L^{-1}) bei pH = 3.6 (geringe Ionenstärke) und ebenso aus NaCl-haltiger (150 mmol L^{-1} ; große Ionenstärke) 20 mmol L^{-1} Acetatlösung bei pH = 5.2 teilweise ausgefällt werden. Aus Glycinlösungen (20 mmol L^{-1}) bei pH = 3.0 mit oder ohne NaCl (150 mmol L^{-1}) gelang dies ebensowenig wie aus Acetatlösung (20 mmol L^{-1}) bei pH = 5.2. In Lösungen mit geringer Ionenstärke lagen bei pH = 3.0 viele verschiedene Proteinaggregate mittlerer Größe vor, die aus weniger als 15–20 Ferritinmolekülen bestanden. Kryo-TEM-Aufnahmen derar-

tiger Lösungen, die zudem USY enthielten, zeigen, daß die Aggregate hauptsächlich auf den Zeolithkristallen adsorbiert waren (Abbildung 1 a). Die die Kristallite umgebende Lösung war dabei frei von Ferritinmolekülen. Es gibt keine Hinweise für die Bildung einer Monoschicht, vielmehr sind die Proteinaggregate ungleichmäßig verteilt; nur ein Bruchteil der adsorbierten Moleküle wechselwirkt direkt mit der Oberfläche des Adsorbens. Gab man bei $\text{pH} = 3.0$ 150 mmol L^{-1} NaCl hinzu, so erhöhte sich die Löslichkeit von Ferritin, einhergehend mit kleineren durchschnittlichen Aggregatgrößen. Mit der Zunahme der Proteinmonomerkonzentration nahm die Menge an adsorbiertem Ferritin ab (Abbildung 1 b). Die Aggregatverteilung bei $\text{pH} = 5.2$ (geringe Ionenstärke) ähnelte der bei $\text{pH} = 3.0$ und großer Ionenstärke (Abbildung 1 b). In diesem Fall lagen auch in hohem Maße Monomere und kleine Aggregate vor (3–10 Moleküle), und es gab nur wenige Wechselwirkungen mit den Zeolithkristallen. Um die Lösung mit $\text{pH} = 5.2$, die 150 mmol L^{-1} NaCl enthielt, von großen Partikeln zu befreien, wurde sie zentri-

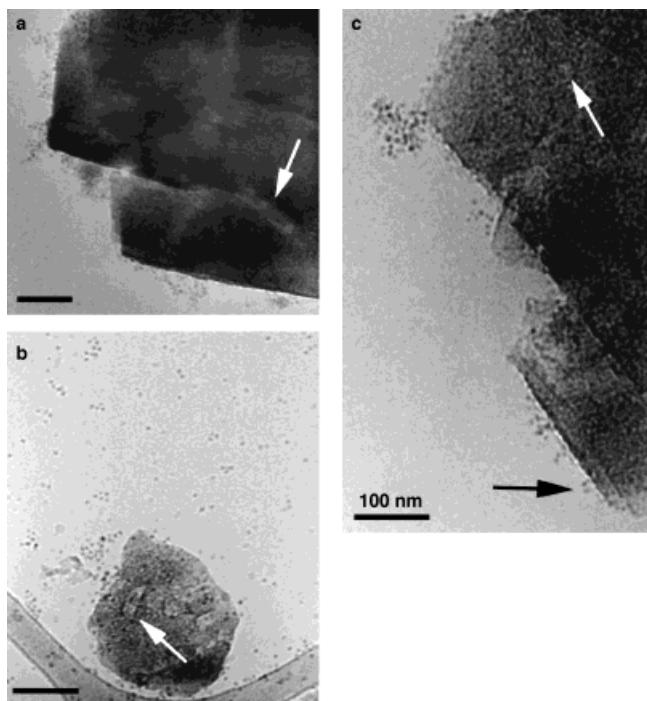


Abbildung 1. TEM-Aufnahmen gefrorener wässriger Lösungen, die Pferdemilzferritin sowie USY-Kristalle enthalten. Die helleren Gebiete mit verschiedenartigen Formen auf den Kristalliten sind während der Desaluminierung des Zeoliths gebildete Mesoporen; einige sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Ferritinmoleküle sind als schwarze Punkte von etwa 5 nm Durchmesser zu erkennen. a) Adsorption von Ferritin auf USY in einer Glycinlösung (20 mmol L^{-1}) bei $\text{pH} = 3.0$. Ferritinaggregate verschiedener Größen sind an manchen Stellen der {111}-Oberfläche des Zwillingskristalls adsorbiert. Von diesem Bild wurde der Hintergrund abgezogen, um den Kontrast zu erhöhen (DigitalMicrograph-Software). b) Adsorption von Ferritin auf USY in einer Glycinlösung (20 mmol L^{-1}) bei $\text{pH} = 3.0$ mit 150 mmol L^{-1} NaCl. Die Ferritinmoleküle liegen hauptsächlich monomer sowie in Form von vielen kleinen, aus fünf oder weniger Molekülen bestehenden Aggregaten vor. Nur wenige Ferritinmoleküle sind auf dem Zeolith adsorbiert. Wahrscheinlich sind die Kristallitoberflächen wegen der Desaluminierung schlecht geformt. c) Auf einem USY-Kristall adsorbierte, verschiedene große Ferritinaggregate (Pufferlösung 20 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 5.2$, 150 mmol L^{-1} NaCl). Verschieden große Aggregate wurden auf Kristallen adsorbiert. Der schwarze Pfeil weist auf ein Dimer auf der {100}-Oberfläche des Kristalls (Näheres siehe Text).

fugiert und erst dann mit USY umgesetzt. Die meisten der in breiter Größenverteilung vorliegenden Proteinaggregate, die in Lösung verblieben, bestanden aus weniger als 30 Ferritinmolekülen. In Gegenwart dieser Aggregate war die Adsorption auf den USY-Kristallen wieder ausgeprägter (Abbildung 1 c). Wie in dem in Abbildung 1 a gezeigten Fall werden auch hier verschiedene große Aggregate adsorbiert, wobei die die Kristallite umgebende Lösung frei von Ferritin ist. In den Abbildungen 1 a–c sind Mesoporen in den USY-Kristallen als hellere, unterschiedlich geformte Bereiche zu erkennen, von denen einige mit weißen Pfeilen gekennzeichnet sind.

Auch bei der Adsorption von Ferritinmolekülen auf NaY- und USY-Kristallen in Acetatlösungen (20 mmol L^{-1}) bei $\text{pH} = 3.6$ lag in der Lösung eine breite Verteilung von hauptsächlich großen Proteinaggregaten vor, von denen einige 50–100 Moleküle enthielten. Nichtsdestoweniger führte die Adsorption von Ferritin auf den NaY-Kristallen zu einer anderen Proteinanordnung verglichen mit der auf den USY-Kristallen. In Abbildung 2a ist ein NaY-Kristall ungefähr entlang der [110]-Richtung gezeigt, so daß die {111}- und {100}-Flächen zu sehen sind. Die reziproken Abstände zu den {111}-Reflexen entsprechen 1.42 nm im realen Raum, was

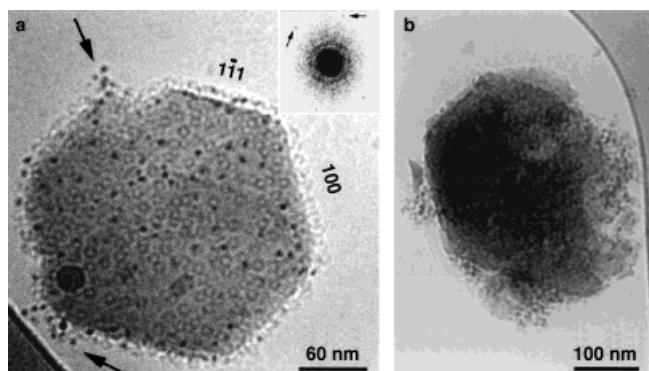


Abbildung 2. TEM-Aufnahmen von auf NaY- und USY-Kristallen adsorbierten Ferritinmolekülen in einer Acetatpufferlösung (20 mmol L^{-1}) bei $\text{pH} = 3.6$. a) Der NaY-Kristall ist ungefähr entlang der [110]-Richtung gezeigt, wie anhand des Leistungsspektrums im Einschub zu erkennen ist; die Pfeile im Einschub kennzeichnen die reziproken Abstände zu den {111}-Reflexen. Da das Ferritin teilweise ausgefallen war, enthielt die Lösung eine breite Verteilung von hauptsächlich großen Aggregaten (50–100 Moleküle). Dennoch sind die Ferritinmoleküle nahezu gleichmäßig auf dem NaY-Kristall verteilt, sieht man von den wenigen, durch Pfeile gekennzeichneten Aggregaten ab. Der Durchmesser der Doughnutförmigen Moleküle beträgt 12 nm , was der Größe von Apoferritin entspricht. b) Auf USY werden die Ferritinmoleküle andersartig adsorbiert. Große Aggregate sind an manchen Stellen adsorbiert und bedecken nur Teile des Kristalliten. Der gezeigte Kristallit weist etwa dieselbe Orientierung auf wie der in a).

sehr gut mit dem berechneten Abstand von 1.42 nm für NaY übereinstimmt ($Fd\bar{3}m$, $a_0 = 2.47 \text{ nm}$). Es scheint keine für die Adsorption bevorzugten Kristallflächen zu geben. Die Ferritinmoleküle sind gleichmäßig über den NaY-Kristall verteilt. Die an den Oberflächen adsorbierten Moleküle sind einzeln entlang der Projektion senkrecht zur Blickrichtung hexagonal dicht gepackt. Recht viele Moleküle weisen ein Doughnut-ähnliches Aussehen auf. Da viele dieser Moleküle so wie die dunklen Punkte fokussiert sind, läßt sich ausschließen, daß die Doughnut-Form ein Artefakt der Fokus-

sierung ist. Demzufolge ist der NaY-Kristall sowohl von Ferritin- als auch von Apoferritinmolekülen bedeckt. Auf USY wird Ferritin nur an manchen Stellen, dann aber in Form von Aggregaten adsorbiert, und nur einige Moleküle wechselwirken direkt mit der Oberfläche (Abbildung 2b). Der in Abbildung 2b gezeigte Kristall weist ebenfalls ausgeprägte Kristallflächen auf, die allerdings teilweise durch die ausgiebige Desaluminierung beschädigt sind.

Ferritinmoleküle tragen bei pH-Werten unterhalb des IEP eine positive Nettoladung. Es besteht demzufolge eine elektrostatische Anziehung zwischen den infolge der Deprotonierung terminaler Hydroxygruppen negativ geladenen USY-Oberflächen und den Ferritinmolekülen. Diese elektrostatischen Wechselwirkungen spielen möglicherweise bei der Adsorption der Ferritinaggregate bei Ionenstärken unterhalb von $\text{pH} = 4.5$ eine Rolle. Die Zugabe von NaCl unterdrückt allerdings die Protein-Protein-Wechselwirkungen und führt zu einer Abschirmung (Verringerung der Debye-Länge), so daß der Einfluß der elektrostatischen Kräfte abnimmt. Das Ausmaß der Adsorption von Ferritin war demzufolge in der NaCl-haltigen Lösung (150 mmol L^{-1}) bei $\text{pH} = 3.0$ gering (Abbildung 1b). Bei Erhöhung des pH-Werts wurden die USY-Kristalloberflächen zunehmend deprotoniert, so daß die negative Ladung größer wurde. Die verminderte Adsorption in 20 mmol L^{-1} Pufferlösung bei $\text{pH} = 5.2$ (geringe Ionenstärke) erinnert an die in der NaCl-haltigen Lösung (150 mmol L^{-1}) bei $\text{pH} = 3.0$ (Abbildung 1b) und wird durch zwei zusammenwirkende Einflüsse erklärt: 1) Die negative Nettoladung der Ferritinmoleküle ist groß genug, um den Aggregationsgrad niedrig halten zu können, und 2) da das Protein und die USY-Oberflächen Ladungen gleichen Vorzeichens aufweisen, sind die Wechselwirkungen wegen der Abstoßungskräfte verringert. Die Zugabe von NaCl führt zu einer Abschirmung der Abstoßungskräfte zwischen den USY-Oberflächen und den Ferritinmolekülen, so daß sich die Proteinaggregate bilden und adsorbiert werden können (Abbildung 1c).

Das unterschiedliche Adsorptionsverhalten von Ferritin auf NaY und USY (Abbildung 2) konnte anhand des großen Unterschieds der chemischen Zusammensetzungen erklärt werden. Ungefähr jedes dritte Tetraeder der NaY-Oberfläche enthält Aluminium, was zu einem höheren negativen elektrischen Potential führt. Die festgestellte Adsorption in einer Lösung mit geringer Ionenstärke und bei einem pH-Wert unterhalb des IEP von Ferritin verdeutlicht, daß die Wechselwirkungen an der NaY-Kristalloberfläche viel stärkeren ionischen Charakter aufweisen als die an den USY-Oberflächen.

Experimentelles

Suspensionen aus USY-Partikeln (USY-HSZ-390HOA, Tosoh Co., Japan) in Pufferlösung (20 mmol L^{-1}) mit oder ohne NaCl (150 mmol L^{-1}) wurden entgast und vor der Sedimentierung mit Ultraschall beschallt. Überstände mit geeigneten Partikelgrößen wurden durch 5 min Zentrifugieren bei $1000-1500 \text{ g}$ erhalten. Die Durchmesser der so erhaltenen Zeolithkristalle lagen zwischen 150 und 1000 nm, wie anhand von Kryo-TEM-Aufnahmen mit geringer Vergrößerung geschätzt wurde. Zur Adsorption wurde Pferdemilzferritin 1 h mit den Überständen der Zeolithsuspensionen bei Raumtemperatur geschüttelt (Schütteltisch; die Ferritinkonzentration betrug ungefähr 0.02 mg mL^{-1}). Die Proben wurden folgendermaßen hergestellt: Ein Tropfen der Lösung ($8 \mu\text{L}$) wurde auf ein filigranes, mit

einem Kohlenstofffilm überzogenes TEM-Kupfernernetz gegeben, wobei die Temperatur und Luftfeuchtigkeit kontrolliert wurden (controlled environment vitrification system, CEVS).^[9] Die überschüssige Lösung wurde abgetupft, und der verbleibende flüssige Film wurde in flüssiges Ethan getautcht (-183°C). Die so vorbereitete Probe wurde mit einem Oxford-CT3500-Kryohalter in ein Philips-CM120-BioTwin-Kryo-Mikroskop überführt; es wurde darauf geachtet, daß die Temperatur zu keinem Zeitpunkt über -160°C stieg. Die Aufnahmen wurde unter Bedingungen geringer Dosierung mit Elektronen von 117 kV auf einer gekühlten Gatan-791-Multiscan-CCD-Kamera gemacht.

Eingegangen am 1. März 1999 [Z 13094]
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2560–2562

Stichwörter: Elektronenmikroskopie • Proteine • Zeolithe

- [1] J. Dubochet, M. Adrian, J.-J. Chang, J.-C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowall, P. Schultz, *Q. Rev. Biophys.* **1988**, *21*, 129–228.
- [2] P. K. Vinson, J. R. Bellare, H. T. Davis, W. G. Miller, L. E. Scriven, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 74–91.
- [3] O. Regev, *Langmuir* **1996**, *12*, 4940–4944.
- [4] M. T. Kennedy, B. A. Korgel, H. G. Monbouquette, J. A. Zasadzinski, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 2116–2119.
- [5] D. Klint, H. Eriksson, *Protein Expression Purif.* **1997**, *10*, 247–255.
- [6] Y. C. Yu, Y. C. Huang, T. Y. Lee, *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14*, 332–337.
- [7] J. Scherzer, *ACS Symp. Ser.* **1984**, *248*, 157–200.
- [8] J. Lynch, F. Raatz, P. Dufresne, *Zeolites* **1987**, *7*, 333–340.
- [9] J. R. Bellare, H. T. Davis, L. E. Scriven, Y. Talmon, *J. Electron Microsc. Tech.* **1988**, *10*, 87–111.

Supramolekulare metallorganische Polymerchemie: Selbstorganisation des neuartigen Dreiblockcopolymers Poly(ferrocen)-*b*-polysiloxan-*b*-poly(ferrocen) in Lösung**

Rui Resendes, Jason A. Massey, Hendrik Dorn, K. Nicole Power, Mitchell A. Winnik* und Ian Manners*

Die nicht mischbaren Segmente von Zweiblockcopolymern erleichtern die Selbstorganisation zu verschiedenen Morphologien im festen Zustand.^[1, 2] In Lösung bilden sich kugelförmige Micellen, wenn ein für einen Block selektives

[*] Prof. M. A. Winnik, Prof. I. Manners, R. Resendes, J. A. Massey, Dr. H. Dorn, K. N. Power
Department of Chemistry
University of Toronto
80 St. George Street
Toronto, ON, M5S 3H6 (Kanada)
Fax: (+1) 416-978-6157
E-mail: imanners@alchemy.chem.utoronto.ca

[**] Diese Arbeit wurde vom Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) unterstützt. R.R. dankt für ein Ontario Graduate Scholarship, H.D. für ein DFG-Postdoc-Stipendium und K.N.P. für ein NSERC Postgraduate Scholarship. I.M. dankt der Alfred P. Sloan Foundation für ein Forschungsstipendium (1994–1998), dem NSERC für ein Steacie Fellowship (1997–1999) und der University of Toronto für ein McLean Fellowship (1997–2003).