

PACK.<sup>[20]</sup> Als Startmodell wurden die Koordinaten der mit Cyanocobalamin rekonstituierten Glutamatmutase (PDB-Code 1CCW)<sup>[9]</sup> nach vorhergehender Entfernung der Lösungsmittel-, Cofaktor- und Substratome gewählt. Nach einer Rigid-body-Verfeinerung wurde eine stark ausgeprägte Differenzelektronendichte für den Cofaktor (inklusive dem Ado-Liganden) sowie für das Substrat erhalten. Das nach Modellierung von Cofaktor und Substrat vervollständigte Modell wurde mit dem Programm SHELXL-97<sup>[21]</sup> weiter verfeinert.<sup>[9]</sup> Details der Strukturaufklärung sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Koordinaten wurden in der Protein Data Bank unter dem Eintrag 1I9C hinterlegt.

Tabelle 1. Kristallstrukturdaten.

Raumgruppe	$P2_1$
Zellkonstanten	$a = 64.3 \text{ \AA}$ $b = 113.1 \text{ \AA}$ $c = 108.4 \text{ \AA}$ $\beta = 96.0^\circ$ $-170^\circ \text{C}$
$T$	$30-1.9 \text{ \AA}$
Auflösung	555 148 (30 037)
Zahl gemessener Reflexe <sup>[a]</sup>	121 680 (8102)
Zahl unabhängiger Reflexe <sup>[a]</sup>	99.9 % (100 %)
Anteil der von den theoretisch möglichen Reflexen erhaltenen <sup>[a]</sup>	18.4 (5.0)
mittlerer $I/\sigma_I$ -Wert <sup>[a]</sup>	0.073 (0.281)
$R_{\text{sym}}$ <sup>[a]</sup>	92.1 % (91.4 %)
Anteil der Reflexe mit $I > 2\sigma_I$ <sup>[a]</sup>	9738
Zahl der Proteinatome	1258
Zahl der Lösungsmittelmoleküle (H <sub>2</sub> O)	294
Zahl der B <sub>12</sub> -Cofaktor- und Substratome	0.168 (0.157)
$R_{\text{cryst}}$ <sup>[b]</sup>	0.221 (0.201)
$R_{\text{free}}$ <sup>[b,c]</sup>	
mittlere $B$ -Werte:	
Protein	12 $\text{\AA}^2$
Lösungsmittel	24 $\text{\AA}^2$
B <sub>12</sub> -Cofaktor, Substrat	9 $\text{\AA}^2$

[a] Der Wert in Klammern bezieht sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung (1.94–1.90  $\text{\AA}$ ). [b] Der Wert in Klammern bezieht sich auf Reflexe mit  $I > 2\sigma_I$ . [c] Berechnet für 5 % zufällig ausgewählte Reflexe.<sup>[22]</sup>

Eingegangen am 25. Januar,  
veränderte Fassung am 22. Juni 2001 [Z 16510]

- [1] J. Stubbe, W. A. van der Donk, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 705–762.
- [2] J. Rétey, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 373–379; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 355–361.
- [3] *Vitamin B<sub>12</sub> and B<sub>12</sub>-Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [4] J. Halpern, *Science* **1985**, 227, 869–875.
- [5] S. Licht, G. J. Gerfen, J. Stubbe, *Science* **1996**, 271, 477–481.
- [6] B. T. Golding, R. J. Anderson, S. Ashwell, C. H. Edwards, I. Garnett, F. Kroll, W. Buckel in *Vitamin B<sub>12</sub> and B<sub>12</sub>-Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 201–216.
- [7] F. Mancia, N. H. Keep, A. Nakagawa, P. F. Leadlay, S. McSweeney, B. Rasmussen, P. Bosecke, O. Diat, P. R. Evans, *Structure* **1996**, 4, 339–350.
- [8] F. Mancia, P. R. Evans, *Structure* **1998**, 6, 711–720.
- [9] R. Reitzer, K. Gruber, G. Jögl, U. G. Wagner, H. Bothe, W. Buckel, C. Kratky, *Structure* **1999**, 7, 891–902.
- [10] N. Shibata, J. Masuda, T. Tobimatsu, T. Toraya, K. Suto, Y. Morimoto, N. Yasuoka, *Structure* **1999**, 7, 997–1008.
- [11] H. Bothe, D. J. Darley, S. P. J. Albracht, G. J. Gerfen, B. T. Golding, W. Buckel, *Biochemistry* **1998**, 37, 4105–4113.
- [12] G. J. Gerfen in *Chemistry and Biochemistry of B<sub>12</sub>* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 165–195.
- [13] G. J. Gerfen, S. Licht, J. P. Willems, B. M. Hoffman, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8192–8197.
- [14] E. N. G. Marsh, D. P. Ballou, *Biochemistry* **1998**, 37, 11864–11872.

- [15] R. Padmakumar, R. Padmakumar, R. Banerjee, *Biochemistry* **1997**, 36, 3713–3718.
- [16] a) Es ist bekannt, dass die Glutamatmutase in Gegenwart von Substrat ihre Aktivität innerhalb einiger Stunden unter gleichzeitiger Bildung von proteingebundenem Cob(II)alamin einbüßt.<sup>[16b]</sup> Allerdings ist nicht klar, ob diese Inaktivierung auch unter den Kristallisationsbedingungen auftritt (siehe *Experimentelles*). Es besteht jedenfalls kein Zweifel, dass die beiden kristallographisch beobachteten Spezies A und B mit den Zwischenprodukten in Schema 2 b und c strukturell verwandt sind. b) O. Zelder, B. Beatrix, U. Leutbecher, W. Buckel, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 226, 577–585.
- [17] a) M. Levitt, A. Warshel, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 2607–2613; b) K. A. Brameld, W. A. Goddard III, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 985–993.
- [18] F. Mancia, G. A. Smith, P. R. Evans, *Biochemistry* **1999**, 38, 7999–8005.
- [19] a) EPR-Messungen an Coenzym-B<sub>12</sub>-abhängigen Ribonucleotid-Reduktasen<sup>[13]</sup> ergaben einen Abstand zwischen dem Cobaltatom und dem Radikalvermittler von ungefähr 8  $\text{\AA}$ , der damit dem Cobalt-Substrat-Abstand in Glutamatmutase ähnelt. In der Dioldehydratase nimmt das Substrat hingegen eine andere Position relativ zum Cofaktor ein.<sup>[10]</sup> Hier wurde eine Rotation um die glycosidische Bindung als Mechanismus für den Radikaltransport vorgeschlagen.<sup>[19b]</sup> b) J. Masuda, N. Shibata, Y. Morimoto, T. Toraya, N. Yasuoka, *Structure* **2000**, 8, 775–788.
- [20] Z. Otwinowski, W. Minor, *Methods Enzymol.* **1997**, 276, 307–326.
- [21] G. M. Sheldrick, SHELXL-97, Program for the refinement of crystal structures from diffraction data, Universität Göttingen, Göttingen, **1997**.
- [22] G. J. Kleywegt, A. T. Brunger, *Structure* **1996**, 4, 897–904.
- [23] P. J. Kraulis, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, 24, 946–950.
- [24] E. A. Merritt, D. J. Bacon, *Methods Enzymol.* **1997**, 277, 505–524.

## Ortsspezifische Auflösung von Calciumphosphat mit Polymeren: „Schnitzen auf der Nanoskala“\*\*

Anna Peytcheva und Markus Antonietti\*

In biologischen mineralisierten Systemen führt das Zusammenwirken einer anorganischen Kristallphase und einer organischen Matrix zu außergewöhnlichen neuen Materialien, und zwar sowohl was das Aussehen als auch was die Materialeigenschaften betrifft.<sup>[1,2]</sup> Es sind 60 Mineralien bekannt, die von lebenden Organismen „verarbeitet“ werden, am häufigsten kommen Calciumcarbonat, Calciumphosphat und wasserhaltiges, amorphes Siliciumdioxid vor. Daraus bilden sich z. B. Schuppen, Stacheln, Muschelschalen oder das Skelett. Die Mineralien kristallisieren gewöhnlich in einer Matrix aus Proteinen oder Polysacchariden, die gleichzeitig verschiedene Funktionen wahrnimmt: So werden Form und

[\*] Prof. Dr. M. Antonietti, Dr. A. Peytcheva  
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung  
Am Mühlenberg 1, 14476 Golm (Deutschland)  
Fax: (+49) 331-567-9502  
E-mail: pape@mpikg-golm.mpg.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Max-Planck-Gesellschaft unterstützt. Wir danken Dr. Helmut Cölfen, MPI Golm, und Dr. Heimo Schnablegger, Universität Hamburg, für hilfreiche Diskussionen.

Ausrichtung der strukturbildenden Einkristalle kontrolliert, und das Gesamtsystem wird verformbar, sodass mechanischen Spitzenlasten abgefangen werden können.<sup>[3, 4]</sup> Derartige nanostrukturierte Verbundmaterialien wie Knochen und Zähne sind den meisten synthetischen Keramiken durch die Kombination ihrer Eigenschaften klar überlegen.

Ein immer wiederkehrendes Motiv der Biomineralisierung ist, dass ein mit dem Polymer gegebenes funktionelles Muster die Kristallstruktur oder die äußere Kristallform bestimmt, indem die Kristallfläche durch die entgegengesetzte, komplementäre Form des Polymers stabilisiert wird, was zu einer Gesamtstruktur minimaler Energie führt.<sup>[5, 6]</sup> Dieser Ansatz hat seinen Ursprung in der Festkörperphysik („Finden von epitaktischen Beziehungen“), berücksichtigt aber nicht die Fähigkeit des im Regelfall flexiblen Polymers, sich anzupassen. Der Einfachheit halber wird dieses Modell das „energetische“ genannt.

Andererseits ist sowohl aus der Biomedizin als auch aus der Kolloidchemie bekannt, dass Kristalle im Gleichgewicht mit einer wässrigen Umgebungsphase keine statischen Objekte sind, sondern dauernd auf- und abgebaut werden. Damit wird die Kristallform zum Ergebnis eines dynamischen Prozesses, d.h., die Kristallgeometrie, die am schnellsten aufgebaut werden kann und am langsamsten aufgelöst wird, ist die bleibende. Nancollas und Wu<sup>[7]</sup> haben ein Modell auf der Basis von Betrachtungen der Grenzflächenenergie und -kinetik am Beispiel von Calciumphosphat eingeführt und im Laufe der Jahre weiterentwickelt. Hier ist der Einfluss des Polymers oder der Biomatrix rein kinetisch, die strukturkontrollierenden Moleküle sind nicht notwendigerweise an die Oberfläche gebunden, sondern wirken über die Verringerung einer zeitlich gemittelten Oberflächenenergie. Eine epitaktische Beziehung zwischen Polymer und Kristall ist hier nicht notwendig. Diesen Modus operandi möchten wir „kinetisch“ nennen.

Obwohl von hoher Bedeutung sowohl für die Biomedizin als auch für die kontrollierte Synthese von Nanopartikeln, gibt es über die Gültigkeit beider Mechanismen kontroverse Ansichten. Die Weiterentwicklung der Rasterkraftmikroskopie erlaubt die zeitaufgelöste Abbildung von Auflösungs- und Wachstumsprozessen in Wasser.<sup>[8, 9]</sup> In ersten Experimenten wurde der Einfluss von niedermolekularen Komponenten wie Asparginsäure<sup>[10]</sup> oder Magnesiumionen<sup>[11]</sup> auf das Wachstum von Calciumcarbonat untersucht. Auch Proteinfragmente, die aus Muscheln<sup>[12]</sup> oder aus Algen<sup>[13]</sup> isoliert wurden, wurden wachsenden Calcitkristallen hinzugefügt, um diese molekularen „Kontrolleinheiten“ in Lösung bei der Arbeit zu beobachten.

Im Folgenden möchten wir uns auf das biomedizinisch relevante Calciumphosphat (Knochen und Zähne) beschränken und beschreiben die kontrollierte Wiederauflösung von Modellkristallen. Diese Kristalle wurden mit der Double-Jet-Technik<sup>[14]</sup> hergestellt, die eine sehr hohe Einheitlichkeit hinsichtlich Form und Größe ermöglicht.<sup>[15, 16]</sup> Der Auflösungsvorgang kann experimentell einfacher und auch reproduzierbarer verfolgt als das Kristallwachstum. Die Befunde können im Sinne einer „strukturellen Inversion der Kinetik“ interpretiert werden: Die Flächen und Strukturen, die sich am schnellsten auflösen, werden im Kristallisationsexperiment

nicht auftreten, während die verbleibenden Flächen bevorzugt sind und den Habitus eines unter ähnlichen Bedingungen gebildeten Kristalls dominieren werden. Die plättchenförmigen Kristalle aus Brushit wurden als geeignetes Modellsystem gewählt, weil sie sich als ausreichend stabil gegenüber sonstigen Faktoren (Strukturumlagerungen) erwiesen haben, ausreichend dick sind, um nicht zu schnell aufgelöst zu werden, und eine glatte und ebene (010)-Fläche von 1–2 mm<sup>2</sup> Größe exponieren, die als Substrat für die Rasterkraftmikroskopie (AFM) geeignet ist. Die in dieser Arbeit für Brushit gefundenen Erkenntnisse sollten allerdings auch auf andere polymorphe Formen von Calciumphosphat übertragen werden können.

Einige Tropfen der kristallhaltigen Mutterlauge wurden auf einer frisch gespalteten Glimmroboberfläche getrocknet. Auf den Glimmer wurde eine Flüssigzelle für die AFM platziert. Die verschiedenen Polymerlösungen wurden mit einer Kapillare in die Zelle injiziert, sodass sie die ganze Kristalloberfläche benetzten. Der Auflösungsprozess wurde dann mit einer Geschwindigkeit von 0.5 Bildzeilen pro Sekunde verfolgt. Die digitale Auflösung aller Bilder beträgt 256 × 256 Punkte.

Diese Experimente wurden mit verschiedenen Kristallen einer Probe sowie mit verschiedenen Proben wiederholt, um zu zeigen, dass die dargestellten Einzelergebnisse auch das Verhalten des Ensembles repräsentieren. Hierbei stellte sich heraus, dass die beobachteten Vorgänge bereits genügend „gemittelt“ sind, um reproduzierbar dasselbe kinetisch-thermodynamische Ergebnis zu liefern. Dies ist bei mechanischen AFM-Experimenten an Einzelmolekülen anders.

Das benutzte Rasterkraftmikroskop ist ein handelsübliches Nanoscope-IIIa-Gerät (Digital Instruments, Santa Barbara, USA), welches in Luft im Kontakt-Modus und in Wasser im Tapping-Modus betrieben wird. Verwendet wurden weiterhin ein 100-µm × 100-µm-J-Scanner und kommerzielle Silicium-Blattfedern (NT-MDT, Moskau, Russland) mit Krümmungsradien von maximal 10 nm und Resonanzfrequenzen von 5–40 kHz.

Als Polymere mit spezifischen Wechselwirkungen zu Mineralien (im Unterschied zu den bisher untersuchten Bioextrakten molekular einheitlicher Spezies) wurden sowohl zwei thermisch polymerisierte Poly(natriumaspartat)-Materialien (Rohm & Haas) unterschiedlichen Molekulargewichts eingesetzt, die für die Verhinderung von Kalkabscheidungen<sup>[17]</sup> entwickelt worden sind, als auch Poly(L-(+)-lysin) und Rinderserumalbumin (bovin serum albumin, BSA; Sigma) verwendet.

Als Referenzexperiment wurde zunächst die unspezifische Auflösung der (010)-Ebene von Brushit in deionisiertem Wasser untersucht. Die AFM-Aufnahmen in Abbildung 1 zeigen die Bildung charakteristischer Muster, welche die Auflösung des Kristalls begleiten. Es entstehen dreieckige Ätzgräben, deren Kanten parallel zu den Kristallflächen (201), (001) und (101) sind.<sup>[18]</sup> Diese Richtungen entsprechen den Reihen teilweise oder vollständig doppelt gebundenen Ionen innerhalb des Kristallgitters<sup>[19]</sup> (siehe auch Abbildung 5), die offensichtlich eine hohe Stabilität aufweisen. Bei genauerer Analyse des AFM-Höhenbildes ist zu erkennen, dass die (010)-Ebene in Form 7 Å hoher Terrassen aufgelöst

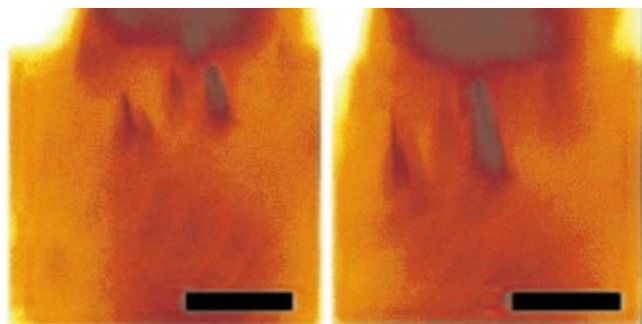


Abbildung 1. AFM-Höhenbilder der (010)-Ebene von Bruchit in deionisiertem Wasser, aufgenommen im Abstand von 2048 s. Die Länge des eingezeichneten Balkens entspricht 2  $\mu\text{m}$ .

wird, was mit einer Einzellage oder einer Elementarzelle des Bruchitkristalls übereinstimmt. Dieses Auflösungsverhalten entspricht sehr schön den Befunden anderer Autoren.<sup>[9]</sup> Die sukzessiv aufgenommenen Bilder können zu einem „Film“ der zeitabhängigen Auflösung.<sup>[24]</sup> Aus der Bildabfolge kann die Geschwindigkeit der Auflösung berechnet werden. Für die (201)-Stufe ergibt sich hier z.B. eine konstante Auflösungs geschwindigkeit von  $0.16 \text{ nm s}^{-1}$ .

Das gleiche Experiment wurde in Gegenwart einer verdünnten wässrigen Lösung ( $0.63 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) von Poly(natrium-aspartat) mit einem Molekulargewicht von  $18000 \text{ g mol}^{-1}$  bei einem pH von 8.1 wiederholt. Die drei in Abbildung 2 gezeigten AFM-Bilder sind Teil einer Serie von 24 Einzelaufnahmen.<sup>[24]</sup> Auf der Kristalloberfläche findet man kein Polymer, d.h., das Polymer wird nicht permanent adsorbiert. Das bestätigt die von Nancollas und Tsortos bestimmte Gleichgewichts-Bindungskonstante eines ähnlichen Polyaspartats auf Hydroxyapatit.<sup>[20]</sup> Alle Wechselwirkungen des Polymers mit der (010)-Ebene sind also temporär und kinetischer Art.

Bei der Auflösung der (010)-Ebene werden dreieckige Muster gebildet, ähnlich denen im Referenzexperiment in deionisiertem Wasser. Zwar darf davon ausgegangen werden, dass das Polyaspartat  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen komplexiert, zu einer Ausflockung des Polymers kommt es aber nicht. Allerdings können auch einige größere Unterschiede zwischen der Auflösung der (010)-Ebene von Bruchit in Gegenwart von Poly(natrium-aspartat) und der in deionisiertem Wasser festgestellt werden:

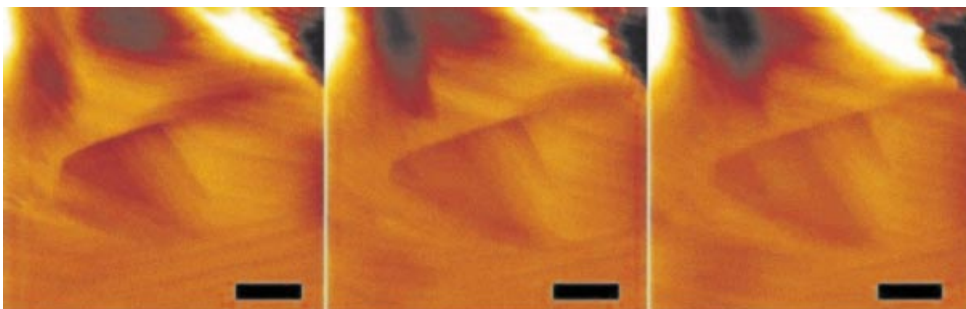


Abbildung 2. Serie von AFM-Höhenbildern, die die Auflösung der (010)-Ebene von Bruchit in  $0.63 \mu\text{mol L}^{-1}$  Polyaspartat-Lösung zeigt (ausgewählt aus einer Serie von 24, im Zeitabstand von 512 s aufgenommenen Bildern). Die Länge des eingezeichneten Balkens entspricht 1  $\mu\text{m}$ .

- Die Geschwindigkeit der Auflösung entlang der (201)-Stufe erreicht einen Wert von  $0.45 \text{ nm s}^{-1}$ , die komplexbildenden Carboxylateinheiten fördern die Auflösung (das erwartete Ergebnis).
- Es tritt auch Auflösung senkrecht zur (010)-Ebene auf, d.h., das Polymer arbeitet sich selbst in die Beobachtungsebene hinein. In reinem Wasser lösen sich diese Ebenen nur Schicht für Schicht von der Seite ab, während das Polymer auch die nackte und ansonsten intakte Kristallfläche angreift.
- Die Umwandlung von Bruchit in Hydroxyapatit wird vollständig unterdrückt (dies konnte nicht durch AFM, wohl aber in den makroskopischen Kristallisationsexperimenten nachgewiesen werden).

Der Angriff des Polymers auf die unbedeckte Kristallebene ist nach längerer Kontaktzeit auch schön unter dem Lichtmikroskop zu beobachten (Abbildung 3). Die durch AFM nachgewiesenen „molekularen Gräben“ sind dann zu einer ganz ähnlichen charakteristischen makroskopischen Oberflächentextur des Kristalls ausgewachsen.

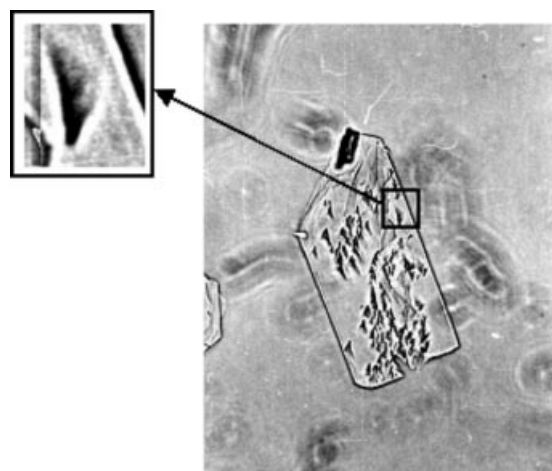


Abbildung 3. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Bruchitkristalls (Länge ca. 0.5 mm) nach Kontakt mit einer Lösung von Polyaspartat mit einem Molekulargewicht von  $18000 \text{ g mol}^{-1}$ .

Die offenkundige Frage ist nun, ob sowohl der Anstieg der Auflösungs geschwindigkeit als auch die Fähigkeit des Polymers, auch Elementarzellen in Kristallflächen zu attackieren, wirklich durch das hinzugegebene Polymer und nicht eventuell durch einen veränderten lokalen pH-Wert verursacht werden. Experimente mit niedermolekularen Säuren oder mit Poly(natrium-aspartat) niedrigeren Molekulargewichts ( $10000 \text{ g mol}^{-1}$ ) ergaben bei gleicher Konzentration eine langsamere Auflösung (fast genauso langsam wie in reinem Wasser und keine merkliche Auflösung senkrecht zur (010)-Ebene). Wir werten dies als einen klaren Beweis dafür, dass die Veränderungen an der Kristalloberfläche durch das oben

genannte Polymer mit dem höheren Molekulargewicht hervorgerufen werden und von einer kritischen mesoskopischen Größe und einem bestimmten Muster funktioneller Gruppen abhängen. Dies wird auch dadurch verständlich, dass die relative Anreicherung der Makromoleküle an anziehenden Oberflächen mit dem Molekulargewicht und der Größe des Polymers zunimmt und damit auch die Wahrscheinlichkeit eines direkten Kontaktes. Die Befunde stützen also das kinetische Modell.

Außer dem technisch relevanten Poly(natriumaspartat) ist es auch interessant, die Wirkung von Polypeptiden auf Mineralisations- und Demineralisationsprozesse zu studieren. Im Unterschied zu früheren Arbeiten wollen wir uns hierbei auf sehr einfache und gut zugängliche Modellpeptide konzentrieren. Es wurde gezeigt, dass einfache Albumine in biologische Mineralisierungskaskaden (z. B. im Knochen<sup>[21]</sup>) eingreifen. Die potentielle Fähigkeit zur Wechselwirkung mit Mineralien wird offensichtlich, wenn man sich vergegenwärtigt, dass von den 582 Aminosäuren des wohl bekannten und gut charakterisierten BSA 41 Asparginsäure-, 59 Glutaminsäure- und 59 Lysin-Einheiten sind.<sup>[22]</sup>

Eine Lösung von BSA in einer Konzentration von  $0.63 \mu\text{mol L}^{-1}$  und mit einem pH-Wert von 5.5 wurde in ähnlicher Weise mit der (010)-Fläche von Brushit in Kontakt gebracht. Das Ergebnis dieses Auflösungs-experiments zeigen die drei AFM-Amplitudenbilder in Abbildung 4, welche in Abständen von 512 s aufgenommen wurden. Auch hier kam es zu keiner Proteinadsorption auf der Kristalloberfläche; das Protein bleibt im Wesentlichen gelöst. Die dreieckigen Ätzmuster, die schon bei Verwendung von Poly(natriumaspartat) gefunden wurden, bestätigen, dass Kanten entlang der gleichen Reihen fest gebundener Ionen gebildet werden, wie auch schon in Abbildung 1 gezeigt. Weiterhin kommt es in kleinerem Umfang zur Auflösung der Fläche des Kristalls, was wir dem hohen Gehalt an Carboxylatgruppen und dem ausreichend hohen Molekulargewicht von BSA zuschreiben. Darüber hinaus tritt mit der Zeit ein Satz neuer charakteristischer Stufen auf, wie in Abbildung 4 durch den Pfeil angedeutet, die in den vorangegangenen Auflösungs-experimenten nicht sichtbar waren. Mit der Kenntnis der Kristallstruktur und der Orientierung des Brushitkristalls (vorgegeben durch die Richtung der dreieckigen Ätzgruben und den sie begrenzenden Ca-reichen [201]- und [101]-Kanten), ist es einfach, diese neuartig auftretenden stabilen Kanten zu indizieren: Abbildung 5 zeigt, dass sie ungewöhnlicherweise entlang Richtungen

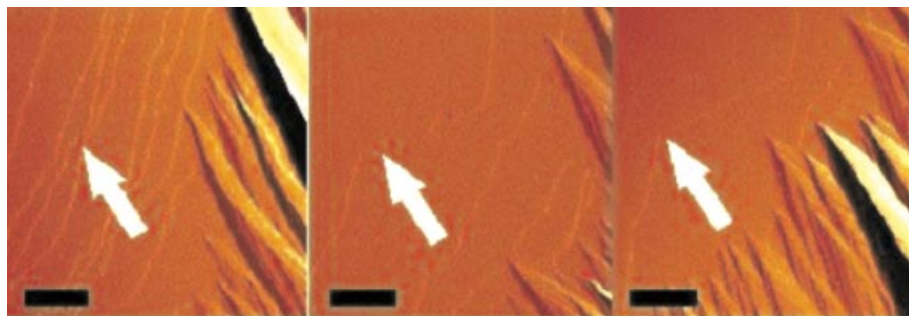


Abbildung 4. AFM-Amplitudenbilder der (010)-Ebene von Brushit in  $0.63 \mu\text{mol L}^{-1}$  BSA-Lösung. Die Länge des eingezeichneten Balkens entspricht 1  $\mu\text{m}$ .

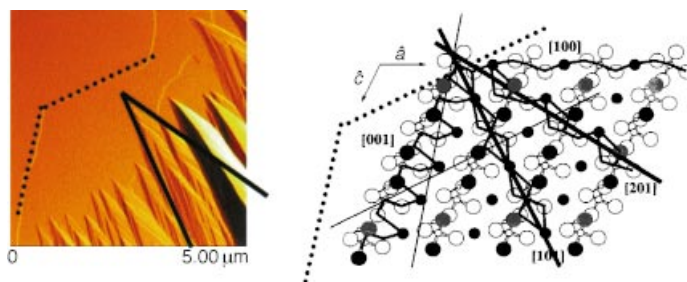


Abbildung 5. Zuordnung des AFM-Bildes aus Abbildung 4 zu den kristallographischen Richtungen von Brushit. Die neu exponierten Stufen entsprechen phosphatreichen Schnitten durch die Elementarzelle.

gebildet werden, in denen keine doppelt gebundene Calciumionen im Kristallgitter freigelegt werden. Offensichtlich kann also die Bindung zwischen Oberflächen-Calciumatomen und den Carboxylatgruppen der Aminosäuren nicht zur Erklärung der Stabilisierung dieser Stufen bemüht werden.

Vermutlich wechselwirken hier die kationischen Gruppen von BSA, im Wesentlichen die der 59 Lysin-Reste, selektiv mit Phosphationen an der Oberfläche des Kristalls. Um diese These zu überprüfen, wurde Poly(L-(+)-lysin) mit einem Molekulargewicht von  $27000 \text{ g mol}^{-1}$  als Kristallisationsmodifikator eingesetzt. Da der verwendete AFM-Aufbau Bilder mit molekularer Auflösung bei Verwendung kationischer Polyelektrolyte nicht zulässt (diese haften an der Spitze und an den meisten anderen Oberflächen), wurden nur lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Abbildung 6 zeigt einen Brushitkristall nach zwei Tagen in einer Poly(L-(+)-lysin)-Lösung.

Die sich entwickelnden Oberflächenstrukturen werden nicht durch mechanische Belastung hervorgerufen, da sich die gleichen Struktur motive ebenso ausgehend von ganzen Kristallen in der temperaturkontrollierten, verschlossenen Flüssigzelle bilden. Diese Muster haben auch nichts gemein mit den dreieckigen Ätzgruben, die von den anionischen Polypeptiden verursacht wurden, sondern spiegeln nur den offensichtlichen Tatbestand wider, dass ein kationisches Polymer mit einer ganzen Reihe von Flächen oder Kanten wechselwirken kann, nicht aber mit denen, die Ca-Ionen



Abbildung 6. Lichtmikroskopische Aufnahme der (010)-Ebene von Brushit in einer Poly(L-(+)-lysin)-Lösung. Die Länge des eingezeichneten Balkens entspricht 200  $\mu\text{m}$ .



aufweisen. Die Auflösung findet nur an den Außenkanten, nicht aber an den Flächen statt. D.h., der Angriff auf eine intakte Fläche ist tatsächlich spezifisch für Polycarbonsäuren. Die gemessenen Winkel an den neu entstandenen Außenkanten dieser Kristalle (Abbildung 5, Kreis) stimmen mit denen überein, die für die zusätzlichen Kanten auf dem mit BSA-Lösung in Kontakt gebrachten Kristall erhalten wurden. Dies stützt die Vorstellung, dass diese Oberflächen und Kanten tatsächlich durch die Wechselwirkungen mit den Lysin-Einheiten von BSA gebildet wurden.

Bei den niedrigen Konzentrationen unserer Experimente wurde in keinem Fall die Adsorption von Polymeren auf der Bruschi-(010)-Oberfläche durch permanente Wechselwirkung ihrer funktionellen Gruppen mit den Gitterionen beobachtet. Stattdessen findet eine hochspezifische Auflösung der Kristalloberfläche statt, und zwar nicht infolge einer Änderung des lokalen pH-Werts oder örtlicher Muster funktioneller Gruppen, wie mit den polymeren unterschiedlichen Molekulargewichts gezeigt werden konnte. Vermutlich reichert sich der polymere Modifikator durch vorübergehende Bindungen dicht am Kristall an und kontrolliert so die Form der Oberfläche, indem er die Auflösung an verschiedenen Stellen mit unterschiedlicher Selektivität unterstützt. Schon die bloße Nähe eines Polymers erniedrigt die Oberflächenenergie der verschiedenen Kristallflächen in unterschiedlichem Ausmaß, was zu verändertem Auflösungs- und Wachstumsverhalten führt. Unsere Experimente stimmen mit den Untersuchungen von Nancollas et al. überein, die fanden, dass das Kristallwachstum von Calciumphosphatoctahydrat mit Polyasparginsäure schon bei scheinbaren Oberflächenbelegungen von 1 % der gesamten Kristalloberfläche wirkungsvoll blockiert wird,<sup>[23]</sup> was keinen Platz lässt für rein statische Erklärungskonzepte.

Die Möglichkeit, selbst die intakte (010)-Ebene anzugreifen, ist offensichtlich eine Funktion des Molekulargewichts des Carboxylatgruppen-haltigen Polymers, und verschiedene funktionelle Polypeptide fungieren als „Schnitzwerkzeuge“, die unterschiedliche Kristallflächen herausarbeiten. Interessanterweise wechselwirkt und modifiziert schon das einfache und wohlbekannte BSA Calciumphosphat auf zwei verschiedene Weisen, indem es entweder über die sauren oder die basischen Aminosäurereste mit der Kristalloberfläche wechselwirkt.

Offensichtlich sind in den vorliegenden Experimenten kinetische Betrachtungen wichtiger als eine potentielle epitaktische Beziehung zwischen der Kristalloberfläche und dem Polymer. Dies macht deutlich, dass ein flexiblerer Ansatz zur kontrollierten Kristallisation oder Biomineralisierung unter Berücksichtigung von Grenzflächenenergien und dynamischen Kristallisations-/Auflösungs-Gleichgewichten vonnöten ist.

Eingegangen am 22. Februar,  
veränderte Fassung am 28. Juni 2001 [Z16668]

- [1] S. Mann in *Biomimetic Materials Chemistry* (Hrsg.: S. Mann), VCH, Weinheim, **1996**, S. 1.
- [2] S. Mann in *Inorganic Materials*, 2. Aufl. (Hrsg.: D. W. Bruce, D. O'Hare), Wiley, New York, **1996**, S. 255.
- [3] S. Weiner, L. Addadi, *J. Mater. Chem.* **1997**, 7, 689.
- [4] E. Beniash, L. Addadi, S. Weiner, *J. Struct. Biol.* **1999**, 125, 50.

- [5] S. Mann, B. R. Heywood, S. Rajam, J. D. Birchall, *Nature* **1998**, 334, 692.
- [6] B. R. Heywood, S. Mann, *Adv. Mater.* **1994**, 6, 9.
- [7] G. H. Nancollas, W. J. Wu, *J. Cryst. Growth* **2000**, 11, 137.
- [8] P. E. Hillner, A. J. Gratz, S. Manne, P. K. Hansma, *Geology* **1992**, 20, 359.
- [9] P. E. Hillner, S. Manne, A. J. Gratz, P. K. Hansma, *Ultramicroscopy* **1992**, 42, 1387.
- [10] H. H. Teng, P. M. Dove, C. A. Orme, J. J. De Yoreo, *Science* **1998**, 282, 724.
- [11] K. J. Davis, P. M. Dove, J. J. De Yoreo, *Science* **2000**, 290, 1134.
- [12] D. A. Walters, B. L. Smith, A. M. Belcher, G. T. Palocz, G. D. Stucky, D. E. Morse, P. K. Hansma, *Biophys. J.* **1997**, 72, 1425.
- [13] B. L. Smith, G. T. Palocz, P. K. Hansma, R. P. Levine, *J. Cryst. Growth* **2000**, 211, 116.
- [14] M. Sedlak, M. Antonietti, H. Cölfen, *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, 199, 247.
- [15] J. Stavek, M. Sipek, I. Hirasawa, K. Toyokura, *Chem. Mater.* **1996**, 4, 545.
- [16] E. Matijevic, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, 1, 176.
- [17] S. K. Wolk, G. Swift, Y. H. Paik, K. M. Yocom, R. L. Smith, E. S. Simon, *Macromolecules* **1994**, 27, 7613.
- [18] L. Scudiero, S. C. Langford, J. T. Dickinson, *Tribol. Lett.* **1999**, 6, 41.
- [19] C. A. Beevers, *Acta Crystalllogr.* **1958**, 11, 273.
- [20] A. Tsortos, G. H. Nancollas, *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, 209, 109.
- [21] M. Owen, J. T. Triffitt, R. A. Melick in *Hard Tissue Growth, Repair and Remineralization* (Hrsg.: K. Elliott, D. W. Fitzsimons), Elsevier, Amsterdam, **1973**, S. 263.
- [22] T. Peters in *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 37 (Hrsg.: C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, F. M. Richards), Academic Press, San Diego, **1985**, S. 161.
- [23] E. M. Burke, Y. Guo, L. Colon, M. Rahima, A. Veis, G. H. Nancollas, *Colloids Surf. B* **2000**, 17, 49.
- [24] Diese „Filme“ können im Internet angesehen werden: <http://www.mpikg-golm.mpg.de/kc/anna/>.

## Ein großes, neuartiges Polyoxowolframat: [As<sup>III</sup>W<sub>65</sub>O<sub>217</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>7</sub>]<sup>26-</sup> \*\*

Ulrich Kortz,\* Masha G. Savelieff, Bassem S. Bassil  
und Michael H. Dickman

Polyoxoanionen sind angesichts ihrer Strukturvielfalt und ihrer interessanten Eigenschaften in den Bereichen Katalyse, Materialwissenschaften und Medizin einzigartige Metall-Sauerstoff-Cluster.<sup>[1-4]</sup> Polyoxometallate wurden erstmals vor mehr als 100 Jahren erwähnt, aber die Strukturen vieler Verbindungen wurden erst in letzter Zeit durch Einkristall-

[\*] Prof. U. Kortz, M. G. Savelieff, B. S. Bassil  
Department of Chemistry  
American University of Beirut  
P.O. Box 11-0236, Riad El Solh Beirut 1107 2020 (Libanon)  
Fax: (+961) 1-744461  
E-mail: [ulrich.kortz@aub.edu.lb](mailto:ulrich.kortz@aub.edu.lb)  
Dr. M. H. Dickman  
Department of Chemistry  
Georgetown University, Box 571227  
Washington, DC 20057-1227 (USA)

[\*\*] U.K. dankt der American University of Beirut für die Unterstützung seiner Forschung durch einen URB-Grant. Wir danken Nebebech Belai für die Messung des NMR-Spektrums. Die Abbildungen 1–4 wurden mit dem Programm Diamond Version 2.1b (Crystal Impact GbR) angefertigt.