

- [19] E. Windberg, F. Hudecz, A. Marquardt, F. Sebestyen, A. Kiss, S. Bosze, H. Medzihradzky-Schweiger, M. Przybylski, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 834–839.
- [20] K. Uray, M. R. Price, F. Hudecz, *J. Pept. Sci.* **1998**, *4*, 319–326.
- [21] A. Marquardt, E. Windberg, X. Tian, M. Kohlmann, F. Hudecz, M. Przybylski in *Proceedings of the 18th Symposium on Combinatorial Chemistry* (Hrsg.: R. Epton), Mayflower, Kingswinford, **2002**, im Druck.
- [22] a) M. L. Billingsley, R. L. Kincaid, *Biochem. J.* **1997**, *323*, 577–591; b) K. C. Wilhelmsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7120–7121.

Biomineralisation



Morphosynthese sternförmiger Titandioxid/Siliciumdioxid-Schalen**

Dirk Volkmer,* Stefano Tugulu, Matthias Fricke und Tim Nielsen

Biomineralisierende Organismen, z. B. Diatomeen (Kieselalgen) oder Radiolarien („Strahlentierchen“), bilden kompliziert geformte anorganische Gehäuse, die hauptsächlich aus glasartigem Siliciumdioxid bestehen.^[1] Die morphogenetischen Grundlagen der Zellentwicklung dieser Organismen, die zu einem arttypischen Design der Schalen führt, sind weitgehend unbekannt. Erst in jüngerer Zeit wurden überraschende Details des Siliciumdioxid-Stoffwechsels in Diatomeen und anderen verkieselnden Organismen entdeckt, u. a. auch bisher unbekannte Enzymklassen (Silicateine^[2]) und Peptide (Silaffine,^[3] Frustuline,^[4] Pleuraline (früher als HEP bezeichnet),^[5] SP41^[6]). Diese sind entweder an der Kondensation und Präzipitation der Kieselsäure oder der Schalenbildung beteiligt.

Die einzelligen Diatomeen sind besonders interessante Modelloorganismen, die als Vorbild für die Entwicklung neuartiger biomimetischer Strategien zur Herstellung komplexer, hierarchisch strukturierter Materialien dienen können.^[7] Die Schalenbildung vollzieht sich hier in einem hochspezialiserten Membrankompartiment, dem „silica deposition vesicle“ (SDV).^[8] Es herrscht noch immer Uneinigkeit über die Prozesse, durch welche das SDV in seine endgültige Form gebracht wird.^[9] SDVs kommen in einer ganzen Reihe einzelliger Lebewesen vor (Schalen-Amöben, Sonnentierchen und Radiolarien), was auf einen einheitlichen Sekretionsmechanismus bei der Herstellung verkieselter Zellstrukturen hinweist.^[10] An der Bildung der hierarchisch strukturierten, verkieselten Diatomeenzellwände sind verschiedene Differenzierungs- und Wachstumsschritte auf charakteristischen Größenebenen beteiligt, die sowohl nanoskopische als auch mikroskopische Strukturen umfassen. Daher wurde vorgeschlagen, zwischen Mikro- und Makromorphogenese klar zu trennen.^[11]

Wir berichten hier über erste Versuche zur Entwicklung eines biomimetischen Modellsystems zur Schalenbildung einzelliger Organismen wie Diatomeen oder Radiolarien. Das Modellsystem besteht aus einem tensidstabilisierten Öltropfen, der durch Mikroinjektion in eine wässrige Lösung eingebracht wird. Er enthält geringe Mengen einer monomeren Metalloxid-Vorstufe, die sich in der wässrigen Lösung hydrolytisch zersetzt und schließlich zur Bildung einer mineralisierten Schale an der Öl/Wasser-Grenzfläche führt. Das Fortschreiten der Mineralisation wurde *in situ* mittels Videomikroskopie verfolgt. Dieses einfache Modellsystem wurde gewählt, weil es entscheidende charakteristische Merkmale biologischer Systeme zeigt: Es hat einen primitiven „Silicium-Metabolismus“, der monomere Kieselsäure aus einer maskierten Speicherform freisetzt. Die Freisetzung der hydrolytisch instabilen Metalloxid-Vorstufe findet an einer membranartigen Oberfläche statt. Die Abmessungen des Öltropfens (10–100 µm) sind mit der typischen Größe vieler verkieselnder, einzelliger Organismen vergleichbar. Da der Öltropfen nur eine begrenzte Menge der Metalloxid-Vorstufe enthält, ist der Schalenbildungsprozess intrinsisch selbstterminierend. Was noch wichtiger ist: Durch Einsatz sorgfältig ausgewählter organischer Additive, die in der Öl- bzw. in der wässrigen Phase gelöst werden, lassen sich dynamische Selbstorganisationsprozesse induzieren, die schließlich zur Bildung diskreter, komplex geformter Hohl schalen führen.

Wir haben unsere Aufmerksamkeit besonders auf ein System konzentriert, das zur Morphosynthese diskreter, sternförmiger Schalen mit frappierender Ähnlichkeit zu verkieselten Skeletten von Radiolarien führt. Das Basisreaktionssystem besteht aus einem Chlorcyclohexan-Tropfen, der Arachidinsäure enthält ($c = 42.4 \text{ mM}$),^[12] während die stark verdünnte, wässrige Phase Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, $c = 55.6 \mu\text{M}$) enthält. Einige Minuten nach erfolgter Mikroinjektion erscheinen wellenförmige Erhebungen an der Oberfläche des Öltropfens (Abbildung 1). Man kann das Wachstum kleiner Stacheln beobachten, die von der Oberfläche des Öltropfens in die wässrige Phase hineinwachsen und mit Flüssigkeit gefüllt sind. Die Stacheln erreichen

[*] Dr. D. Volkmer, S. Tugulu
Universität Bielefeld
Fakultät für Chemie, A11
33501 Bielefeld (Deutschland)
Fax: (+49) 521-106-6003
E-mail: dirk.volkmmer@uni-bielefeld.de

M. Fricke, Dr. T. Nielsen
Universität Bielefeld
Fakultät für Physik, D3
33501 Bielefeld (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (Schwerpunktprogramm 1117 „Prinzipien der Biomineralisierung“; Förderungs-Nr. Vo 829/2-1). D.V. dankt der DFG für ein Habilitationsstipendium (Förderungs-Nr. Vo 829/1-1).

 Hintergrundinformationen (Instrumentelles und Synthesevorschriften) zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.anwendunge.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

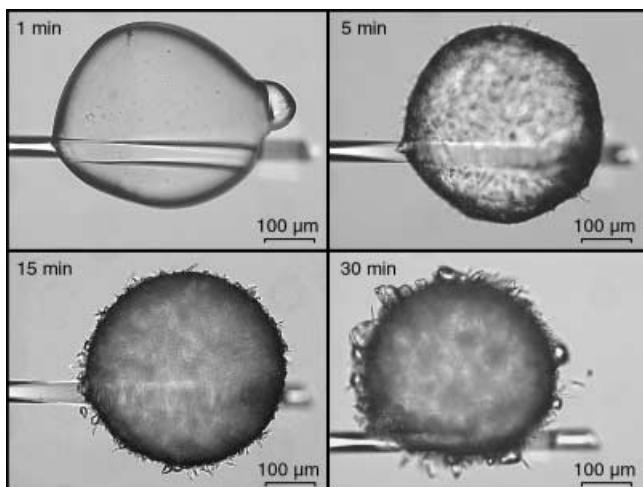


Abbildung 1. Zeitserie der spontanen Emulgierung eines Tropfens Chlorycyclohexan, der Arachidinsäure ($c=42.4 \text{ mM}$) enthält, nach Mikroinjektion in eine wässrige Lösung von CTAB ($c=55.6 \mu\text{M}$); Hellfeld-Mikroskopieaufnahmen.

zeitweise eine Länge von bis zu $90 \mu\text{m}$, während ihr typischer Durchmesser im Bereich von $3\text{--}15 \mu\text{m}$ liegt.

Nach Erreichen einer kritischen Größe findet eine Einschnürung der Stacheln statt, und es bildet sich eine Korona aus submikroskopischen Öltröpfchen um den ursprünglichen Öltropfen. Der Dissipationsprozess schreitet kontinuierlich fort, bis der Großteil des ursprünglichen Öltropfens in kleinere Mikroemulsionströpfchen zerfallen ist, die sich anschließend in der wässrigen Lösung verteilen. Ähnliche dynamische Selbstorganisationsprozesse wurden unter der Bezeichnung „spontane Emulgierung“ bereits beschrieben.^[13] Bemerkenswerterweise findet die Emulsionsbildung unter den gewählten experimentellen Bedingungen nur dann statt, wenn in den beiden verschiedenen flüssigen Phasen Tenside mit gegensinniger Ladung vorliegen. Wird z.B. die Arachidinsäure durch Arachinalkohol ersetzt oder eines der Tenside einfach fortgelassen, so tritt keine Emulsionsbildung auf. Wir nehmen daher an, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den geladenen Tensiden einen maßgeblichen Anteil an der Triebkraft des Vorgangs haben.^[14]

Die Herausforderung bestand nun darin, den Mineralisierungsprozess mit der spontanen Dissipation des Öltropfens zu koppeln und dabei die zwischenzeitlich auftretende, metastabile sternförmige Morphologie aufrechtzuerhalten. Dies ließ sich durch eine gezielte Wahl der in der Ölphase gelösten Metalloxid-Vorstufe und durch sorgfältiges Einstellen der Tensidkonzentration erreichen. Wir konnten zunächst leider kein einfaches Modellsystem auf der Basis von Siliciumdioxid etablieren, das in einem passenden Zeitraum und unter Umgebungsbedingungen (d.h. Raumtemperatur, wässrige Lösung bei $\text{pH} \approx 7$) zu robusten verkieselten Schalen geführt hätte.^[15] Eine wesentliche Verbesserung wurde schließlich durch Einsatz von Titandioxid- oder gemischten Titandioxid-/Siliciumdioxid-Vorstufen erreicht, die eine wesentlich geringere Hydrolysestabilität aufweisen als die ursprünglich verwendeten, typischen Siliciumdioxid-Vorstufen (Tetramethoxysilan (TMOS), Tetraethoxysilan (TEOS); siehe Hinter-

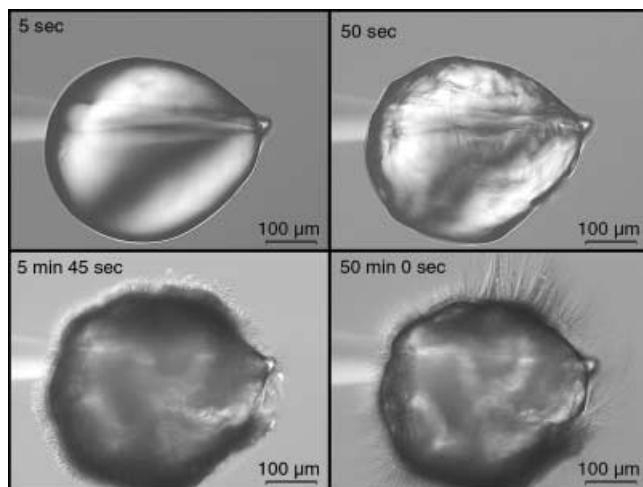


Abbildung 2. Zeitserie der Stachelbildung an einem Chlorcyclohexan-Tropfen, der Arachidinsäure ($c=42.4 \text{ mM}$) und TBOT (4 Gew.-%) enthält, nach Mikroinjektion in eine wässrige Lösung von CTAB ($c=0.556 \text{ mM}$); Mikroskopieaufnahmen mit Differential-Interferenzkontrast.

grundinformationen).^[16] Durch Zusatz von Tetra-*tert*-butyl-orthotitanat (TBOT) waren wir in der Lage, in der Öl/Wasser-Grenzschicht, innerhalb weniger Minuten bis Stunden (in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen), robuste, mineralisierte Schalen herzustellen.

Abbildung 2 zeigt eine Zeitserie mikroskopischer Aufnahmen ähnlich zu derjenigen in Abbildung 1. Der Öltropfen enthält nun eine kleine Menge der Titandioxid-Vorstufe (TBOT). Die sternförmige Morphologie wird wiederum gebildet, aber anders als beim vorstufenfreien System beobachtet man nach wenigen Minuten ein Einfrieren des Dissipationsprozesses in einen intermediären Entwicklungszustand. Eine genauere Untersuchung der so hergestellten Partikel zeigt, dass die mineralisierte Oberfläche aus sehr dünnen Hohlstacheln besteht (durchschnittlicher Durchmesser $1 \mu\text{m}$), die eine maximale Länge von einigen $100 \mu\text{m}$ erreichen können. Die sternförmigen Titandioxid-Partikel sind in der wässrigen Lösung stabil, zersetzen sich jedoch beim Eintrocknen an der Luft relativ schnell. Alle Versuche, die Morphologie mittels Gefriertrocknung aufrechtzuerhalten, waren bisher leider erfolglos. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen an gefriergetrockneten Proben lassen mineralisierte Hohlschalen erkennen (durchschnittliche Wandstärke $\approx 1 \mu\text{m}$), während die charakteristischen Stacheln vollständig verschwunden sind. Wie aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen hervorgeht, besteht die zurückbleibende Mineralschale aus einem mesoporösen Netzwerk von teilweise miteinander vereinigten Titandioxid-Kolloiden, die einen typischen Durchmesser von 40 bis 70 nm haben. Dass die Stacheln beim Trocknungsvorgang vollständig verloren gehen, lässt auf einen sehr geringen Mineralanteil in diesen Strukturelementen schließen.

Systematische Variationen der Tensid- und Vorstufenkonzentrationen lassen erkennen, dass der Bildungsprozess der sternförmigen Titandioxidpartikel stark konzentrations-abhängig ist. Einheitliche Partikel werden vorzugsweise bei einer TBOT-Startkonzentration von ca. 4 Gew.-% erhalten.

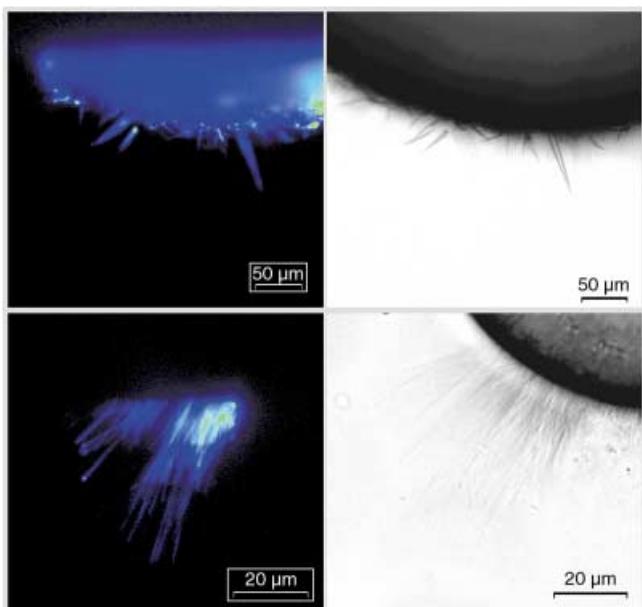


Abbildung 3. Fluoreszenzaufnahmen (linke Seite) und Hellfeld-Mikroskopieaufnahmen (rechte Seite) vom Randbereich des Öltropfens während der Stachelbildung. Die Abbildungen der Tropfen in der oberen Reihe gehören zum vorstufenfreien System, während der Tropfen in der unteren Reihe eine Titandioxid-Vorstufe enthält. Die Stacheln und der vom Laserstrahl erfasste Bereich des Öltropfens erscheinen in blauer oder grüner Farbe vor schwarzem (nichtfluoreszierendem) Hintergrund.

Bei einem TBOT-Gehalt von weniger als 3 Gew.-% verlangsamt sich zwar der Dissipationsprozess im Vergleich zum vorstufenfreien System, es werden aber letztlich doch Mikromulsionströpfchen gebildet. Dagegen werden bei einem TBOT-Gehalt von mehr als 5 Gew.-% massiv mineralisierte Schalen um den Öltropfen herum gebildet, die allerdings keine radialen Erhebungen aufweisen.

Durch Fluoreszenzmikroskopie klärten wir die Zusammensetzung der Stacheln auf, die bei der Emulsionsbildung heranwachsen. Dadurch wollten wir untersuchen, ob die Stacheln mit dem organischen Lösungsmittel der Ölphase gefüllt sind. Durch Zusatz eines hydrophoben Fluoreszenzfarbstoffes (Cumarin 153) zur Chlorycyclohexanlösung konnten wir die zeitabhängige räumliche Verteilung der nichtmischbaren flüssigen Phasen durch Rasterlasmikroskopie in Echtzeit verfolgen. Für die Registrierung optischer Schnittebenen durch den Öltropfen und die Stacheln verwendeten wir ein neuartiges Multistahl-2-Photonen-Mikroskop mit brechungslimitierter, dreidimensionaler räumlicher Auflösung und hoher Rastergeschwindigkeit (Bildwiederholrate bis zu 60 Hz).^[17] Die gemessene Fluoreszenzintensität dient dabei als Maß für die Cumarinkonzentration; auf diese Weise lässt sich außerdem die räumliche Verteilung des organischen Lösungsmittels direkt visualisieren.

Abbildung 3 zeigt repräsentative Fluoreszenzbilder (linke Seite) und optische Hellfeld-Mikroskopieaufnahmen (rechte Seite), die im Randbereich des Öltropfens während der Stachelbildung aufgenommen wurden. Die Abbildungen in der oberen Reihe sind dem vorstufenfreien System zuzuordnen. Die Stacheln und der vom Laserstrahl erfasste Bereich des Öltropfens erscheinen in blauer oder grüner

Farbe gegenüber dem schwarzen (nichtfluoreszierenden) Hintergrund. (Verschiedene Farben repräsentieren hier unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten.) Es ist klar zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität im Hauptteil des Tropfens *und* in den Stacheln sehr gleichförmig ist, was auf eine homogene Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes und des organischen Lösungsmittels schließen lässt. Somit besteht zwischen Öltropfen und Stacheln ein kontinuierlicher Übergang. Fluoreszenzaufnahmen am vorstufenhaltigen System ergeben ein ähnliches Bild (Abbildung 3, untere Reihe): Stacheln, die von der Oberfläche des Öltropfens ausstrahlen, zeigen eine zum vorstufenfreien System vergleichbare, gleichförmige Fluoreszenz. Die Stachelbildung wird in beiden Systemen durch ähnliche Selbstorganisationsprozesse bewirkt, die eine tensidvermittelte Krümmung der Grenzfläche zwischen den nichtmischbaren Flüssigphasen einschließt.

Auf der Grundlage dieser Experimente schließen wir zurzeit aus, dass komplexe Tensidaggregate, beispielsweise multilamellare Stäbchenstrukturen, die u.a. aus hydratisierten Lecithinschichten („Myelinfiguren“) hervorgehen,^[18] am Aufbau der Stacheln beteiligt sind. Durch Mikroinjektion von Einzeltropfen konnten wir den optimalen Konzentrationsbereich der chemischen Komponenten systematisch eingrenzen. Schließlich haben wir mit den Erkenntnissen der videomikroskopischen Voruntersuchungen eine technisch einfache Synthesestrategie ausgearbeitet, mit der größere Mengen sternförmiger Partikel hergestellt werden können. Dies lässt sich durch eine Siliciumdioxid-Vorstufe (TMOS) erreichen, die der Ölphase oder der wässrigen Lösung zugesetzt wird. Mechanisch robuste, mineralisierte sternförmige Partikel werden erhalten, wenn eine geringe Menge Chlorycyclohexan, die eine TBOT/TMOS-Mischvorstufe enthält, zu einer vorhydrolysierten wässrigen Lösung von TMOS gegeben wird. Die Suspension wird einige Male im verschlossenen Probegefäß geschüttelt und danach zur Vervollständigung der Sedimentation einige Tage an einem ruhigen Ort aufbewahrt. Lichtmikroskopische Untersuchungen der Partikel, die sich am Gefäßboden abgesetzt haben, zeigen, dass Partikel mit sternförmiger Morphologie und mit enger Größenverteilung (Durchmesser 10–100 µm) in hoher Ausbeute erhalten werden. Speziell die Partikel mit einem kleinen Durchmesser (10–20 µm) erweisen sich als sehr robust, was die Probenvorbereitung für elektronenmikroskopische Untersuchungen sehr vereinfacht. Tatsächlich bleibt die Morphologie nach dem Trocknen an der Luft vollständig erhalten, eine Veränderung der Partikel ist auch nach Goldbedampfung im Argonplasma und bei verminderter Druck nicht feststellbar.

In Abbildung 4 (oben) ist die typische Morphologie der Partikel wiedergegeben, die aus den Mengenansätzen erhalten werden. Wie klar zu erkennen ist, sind die Stacheln, die von der Schalenoberfläche ausgehen, vollständig stabil. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen bei hoher Vergrößerung (Abbildung 4, unten) zeigen ferner, dass die mineralisierten Hohlstacheln einen durchschnittlichen Durchmesser von ca. 400 bis 600 nm haben, während die durchschnittliche Wandstärke ca. 60 nm beträgt. Die Elementarzusammensetzung der Partikel wurde an ausgewähl-

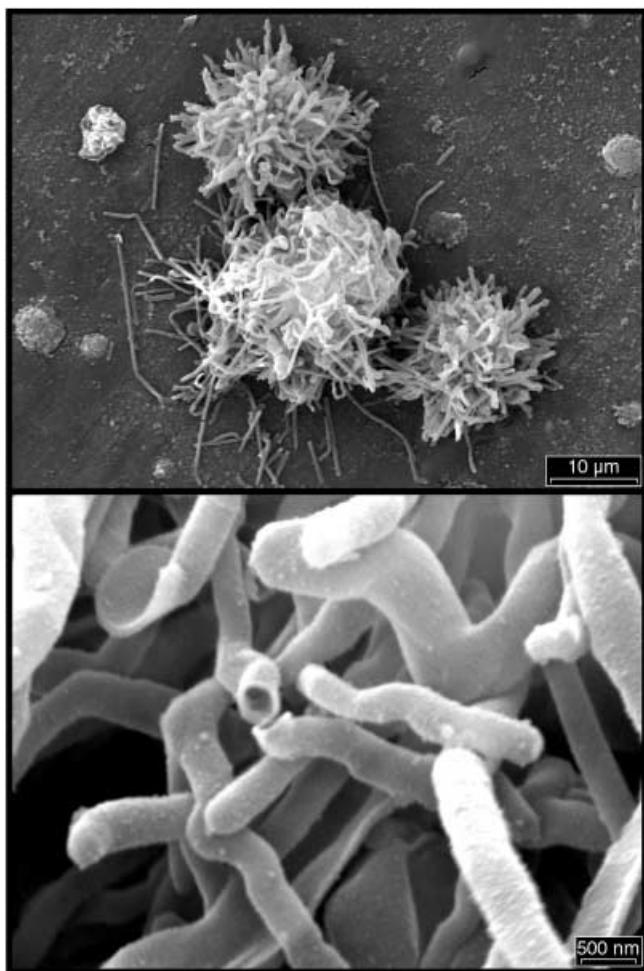


Abbildung 4. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von sternförmigen Titandioxid/Siliciumdioxid-Schalen aus einem Mengenansatz. Oben: typische Morphologie einer luftgetrockneten Probe robuster mineralisierter Schalen. Unten: Bruchstellen in der Probe lassen erkennen, dass mineralisierte, röhrenförmige Stacheln vorliegen.

ten Stellen durch energiedispersive Röntgenfluoreszenzanalyse (EDX) bestimmt. Die im Innenbereich der Schalenoberfläche sowie an der Oberfläche einzelner, diskreter Stacheln gemessenen EDX-Spektren bestätigen das Vorliegen von Si und Ti.

Der Einsatz organischer Template zur Herstellung anorganischer (Kieselgel-)Materialien mit eng verteilten Porengrößen wurde schon beschrieben (z.B. flüssigkristalline Mesophasen,^[19] Vesikel,^[20] Polymer-Latexkugeln,^[21] Makromoleküle^[22] oder Öl/Wasser-Mikroemulsionen^[23]). Von den genannten Systemen unterscheidet sich unser Ansatz grundlegend darin, dass ein dynamischer Dissipationsprozess (d.h. die spontane Emulgierung eines Öltropfens) zur Formung der anorganischen Matrix genutzt wird.^[24] In dieser Hinsicht imitiert der von uns gewählte Ansatz sicherlich Aspekte natürlicher Biomineralisationsprozesse, wenn es auch vermutlich nur einen entfernten Bezug zu den biologischen Organismen gibt, die für die Verkieselung vielfältige, hochspezialisierte (makro-)molekulare Komponenten einsetzen. Sobald genauere Erkenntnisse über die funktionalen Eigenschaften dieser Makromoleküle vorliegen, können sicherlich

auch verbesserte Modellsysteme konzipiert werden, die einen engeren biomimetischen Bezug zu den biologischen Systemen haben. Zukünftige Untersuchungen werden sich auf die Aufklärung der Mechanismen konzentrieren, die an der Bildung der sternförmigen Morphologie beteiligt sind.

Eingegangen am 17. Mai 2002,
veränderte Fassung am 23. September 2002 [Z19325]

- [1] a) C. C. Perry, T. Keeling-Tucker, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 537–550; b) *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems* (Hrsg.: T. L. Simpson, B. E. Volcani), Springer, New York, **1981**.
- [2] a) J. N. Cha, K. Shimizu, Y. Zhou, S. C. Christiansen, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, D. E. Morse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 361–365; b) K. Shimizu, J. Cha, G. D. Stucky, D. E. Morse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6234–6238.
- [3] a) N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26066–26070; b) N. Kröger, R. Deutzmann, C. Bergsdorf, M. Sumper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14133–14138; c) N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, *Science* **1999**, *286*, 1129–1132.
- [4] N. Kröger, C. Bergsdorf, M. Sumper, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *239*, 259–264.
- [5] a) N. Kröger, R. Wetherbee, *Protist* **2000**, *151*, 263–273; b) N. Kröger, G. Lehmann, R. Rachel, M. Sumper, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 99–105.
- [6] T. F. Schultz, L. Egerton-Warburton, S. A. Crawford, R. Wetherbee, *Protist* **2001**, *152*, 315–327.
- [7] E. G. Vrieling, T. P. M. Beelen, R. A. van Santen, W. W. C. Gieskes, *J. Biotechnol.* **1999**, *70*, 39–51.
- [8] a) D. Volkmer, *Chem. Unserer Zeit* **1999**, *33*, 6–19; b) E. G. Vrieling, W. W. C. Gieskes, T. P. M. Beelen, *J. Phycol.* **1999**, *35*, 548–559.
- [9] Für unterschiedliche Arbeitshypothesen zum Mechanismus der Form- und Musterbildung in verkieselnden Diatomeen siehe: a) R. Gordon, R. W. Drum, *Int. Rev. Cytol.* **1994**, *150*, 243–372; b) A. M. M. Schmid, R. K. Eberwein, M. Hesse, *Protoplasma* **1996**, *193*, 144–173; c) E. G. Vrieling, T. P. M. Beelen, R. A. van Santen, W. W. C. Gieskes, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1613–1616; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1543–1546; d) M. Sumper, *Science* **2002**, *295*, 2430–2433.
- [10] O. R. Anderson, *Protoplasma* **1994**, *181*, 61–77.
- [11] R. Wetherbee, S. Crawford, P. Mulvaney, *The Nanostructure and Development of Diatom Biosilica* in: *Biomineralization* (Hrsg.: E. Bäuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 189–205.
- [12] Chloryclohexan wurde wegen seiner spezifischen Dichte von 1.0 g cm^{-3} ausgewählt, die den Tropfenauftrieb in wässriger Lösung verhindert.
- [13] Ausgewählte Literaturstellen: a) N. Shahidzadeh, D. Bonn, J. Meunier, M. Nabavi, M. Airiau, M. Morvan, *Langmuir* **2000**, *16*, 9703–9708; b) T. Nishimi, C. A. Miller, *Langmuir* **2000**, *16*, 9233–9241; c) C. A. Miller, *Colloids Surf.* **1988**, *29*, 89–102; d) O. Theissen, G. Gompper, *Eur. Phys. J. B* **1999**, *11*, 91–100; e) M. J. Rang, C. A. Miller, *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *209*, 179–192; f) R. Granek, R. C. Ball, M. E. Cates, *J. Phys. II* **1993**, *3*, 829–849; g) W. J. Benton, C. A. Miller, T. Fort, *J. Dispersion Sci. Technol.* **1982**, *3*, 1–44.
- [14] Mischungen aus kationischen und anionischen Tensiden führen häufig spontan zur Bildung (thermodynamisch stabiler) Vesikel: a) E. W. Kaler, A. K. Murthy, B. E. Rodriguez, J. A. N. Zasadzinski, *Science* **1989**, *245*, 1371–1374; b) S. A. Safran, P. Pincus, D. Andelman, *Science* **1990**, *248*, 354–355; c) C. Tondre, C. Caillet, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, *93*, 115–134.

- [15] Die Bildung von Siliciumdioxid-Hohlschalen mit Öl/Wasser-Mikroemulsionstemplaten wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben. Die Kondensation der Kieselsäure erfolgt dabei allerdings stets unter stark sauren oder basischen Reaktionsbedingungen: a) S. Schacht, Q. Huo, I. G. Voigt-Martin, G. D. Stucky, F. Schüth, *Science* **1996**, 273, 768–771; b) C. E. Fowler, D. Khushalani, S. Mann, *Chem. Commun.* **2001**, 2028–2029.
- [16] R. J. Davis, Z. Liu, *Chem. Mater.* **1997**, 9, 2311–2324.
- [17] T. Nielsen, M. Fricke, D. Hellweg, P. Andresen, *J. Microsc.* **2001**, 201, 368–376.
- [18] J. H. Fuhrhop, W. Helfrich, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1565–1582.
- [19] a) C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, *Nature* **1992**, 359, 710–712; b) G. S. Attard, J. C. Glyde, C. G. Göltner, *Nature* **1995**, 378, 366–368.
- [20] a) S. S. Kim, W. Z. Zhang, T. J. Pinnavaia, *Science* **1998**, 282, 1302–1305; b) P. T. Taney, T. J. Pinnavaia, *Science* **1996**, 271, 1267–1269.
- [21] a) F. Caruso, R. A. Caruso, H. Möhwald, *Science* **1998**, 282, 1111–1114; b) B. T. Holland, C. F. Blanford, T. Do, A. Stein, *Chem. Mater.* **1999**, 11, 795–805.
- [22] a) C. Göltner, S. Henke, M. C. Weißenberger, M. Antonietti, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 633–636; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 613–616; b) J. N. Cha, G. D. Stucky, D. E. Morse, T. J. Deming, *Nature* **2000**, 403, 289–292; c) D. Y. Zhao, J. L. Feng, Q. S. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Science* **1998**, 279, 548–552; d) M. Templin, A. Franck, A. DuChesne, H. Leist, Y. M. Zhang, R. Ulrich, V. Schadler, U. Wiesner, *Science* **1997**, 278, 1795–1798.
- [23] a) S. Schacht, Q. Huo, I. G. Voigt-Martin, G. D. Stucky, F. Schüth, *Science* **1996**, 273, 768–771; b) P. Schmidt-Winkel, W. W. Lukens Jr., P. Yang, D. I. Margolese, J. S. Lettow, J. Y. Ying, G. D. Stucky, *Chem. Mater.* **2000**, 12, 686–696.
- [24] Dynamische Umwandlungsprozesse, die zu komplexen Morphologien führen, sind bekannt, die genaue Funktion der organischen Template ist dabei weitgehend aber unbekannt. Ausgewählte Übersichtsartikel zu diesem Thema: a) S. Mann, G. A. Ozin, *Nature* **1996**, 382, 313–318; b) G. A. Ozin, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 17–27; c) S. Mann, S. L. Burkett, S. A. Davis, C. E. Fowler, N. H. Mendelson, S. D. Sims, D. Walsh, N. T. Whilton, *Chem. Mater.* **1997**, 9, 2300–2310; d) S. Mann, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 3532–3548; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3392–3406; e) L. A. Estroff, A. D. Hamilton, *Chem. Mater.* **2001**, 13, 3227–3235.

Abstandsbestimmung durch EPR

Messung eines Cu-Cu-Abstands von 26 Å mit einer gepulsten EPR-Methode**

Irene M. C. van Amsterdam, Marcellus Ubbink, Gerard W. Canters und Martina Huber*

Methoden zur Bestimmung von Abständen in biologischen und chemischen Systemen werden zunehmend wichtig. Sie können auch dann Strukturinformationen liefern, wenn traditionelle Methoden der Strukturuntersuchung versagen, z.B. bei nicht kristallisierbaren Verbindungen. Insbesondere werden derzeit ergänzend solche Methoden benötigt, mit denen große Abstände gemessen werden können. Die elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie (EPR) ist hierbei von besonderem Interesse, da sie die Messung großer Abstände mit hoher Spezifität ermöglicht.^[1,2] Hier zeigen wir, dass mit einer gepulsten Elektronen-Elektronen-Doppelresonanz(DEER)-Methode^[3] große Abstände zwischen Kupferionen in biologischen Systemen gemessen werden können. Wir haben kovalent verknüpfte Dimere eines Elektronen-transferproteins, des Kupferproteins Azurin, untersucht – diese Dimere sind Modellverbindungen für den Elektronen-transfer (ET).^[4,5] Zur Verknüpfung der Dimere wurde durch selektive Mutagenese ein Cystein an Position N42 eingeführt (N42C-Mutant), wobei eines der Dimere (az-1) direkt durch eine Cystin-Bindung verknüpft ist (Abbildung 1) und das andere (az-2) über einen flexiblen Linker (1,1'-[Oxydi(methylen)]bis(maleimid)).^[4,5]

Die DEER-Pulsequenz besteht aus vier Mikrowellenpulsen (Abbildung 2), wobei drei Pulse bei der Beobachtungsfrequenz ν_{beob} und ein Puls bei der Pumpfrequenz ν_{pump} eingestrahlt werden. DEER-Experimente an biologischen Systemen wurden bisher mit Ausnahme eines (nicht erfolgreichen) Versuchs zur Bestimmung von Abständen zwischen zwei Metallzentren in einem Protein^[6] ausschließlich zur Abstandsbestimmung zwischen Nitroxid-Spin-Sonden als paramagnetische Zentren beschrieben. Hierbei wurden Abstände von etwa 30 Å gemessen.^[3]

Die Bedeutung von Metallzentren in biologischen Reaktionen unterstreicht die Notwendigkeit, auch paramagneti-

[*] Dr. M. Huber, I. M. C. van Amsterdam
Department of Molecular Physics
Leiden University
P.O. Box 9504, 2300 RA Leiden (Niederlande)
Fax: (+31) 71-527-5819
E-mail: mhuber@molphys.leidenuniv.nl

Dr. M. Ubbink, Prof. Dr. G. W. Canters
Leiden Institute of Chemistry
Gorlaeus Laboratories
Leiden University
P.O. Box 9504, 2300 RA Leiden (Niederlande)

[**] Wir danken E. J. J. Groenen und J. Schmidt für hilfreiche Diskussionen und die materielle Unterstützung dieser Arbeit. S. S. Eaton, G. R. Eaton und G. Jeschke wird ebenfalls herzlich für ihre Beiträge gedankt. Diese Arbeit wurde im Rahmen der BIOMAC Research School der Universitäten Leiden und Delft durchgeführt.