

Nanometalle auf Biomolekülen

S. Behrens, W. Habicht, ITC; E. Unger, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena

Einleitung

Im Grenzgebiet zwischen Materialforschung, Nanowissenschaft und molekularer Biotechnologie stellt die Verwendung bioorganischer und biomakromolekularer Komponenten zur Synthese und Organisation nanostrukturierter Materialien eine vielversprechende Alternative zu konventionellen Synthesetechniken dar. Nanostrukturierte Materialien erschließen neue Eigenschaften u.a. im Bereich der Elektronik, Katalyse und medizinischen Diagnostik.

Biotechnologie und Materialwissenschaften bewegen sich auf derselben Längenskala. Typische Dimensionen biomolekularer Komponenten reichen vom unteren Nanometer-Bereich bis in den Mikrometer-Bereich. Beispielsweise besitzen Biomoleküle wie DNA Durchmesser im Bereich von 2-3 nm und variable Längen im Mikrometerbereich (zum Vergleich: Die Größenordnung ganzer Zellen liegt, je nach Zellart, zwischen ca. 5 und 100 μm). Ein Problem jedoch ist, dass biologische Makromoleküle gewöhnlich die Eigenschaften aufweisen, die für ihren Funktionsbereich phylogenetisch optimiert sind (z.B. hinsichtlich Arbeitstemperatur oder Reaktionsspezifität), den physikalischen Erfordernissen zur Nutzung z.B. im Bereich der klassischen Materialwissenschaft aber nicht entsprechen. Typische Eigenschaften anorganischer Komponenten sind beispielsweise elektrische Leitfähigkeit oder Magnetismus. Deshalb versucht man Eigenschaften von Biomolekülen wie die hochspezifische molekulare

Erkennung zu nutzen und mit den Eigenschaften anorganischer Komponenten zu verbinden.

Die Verwendung von Biomolekülen zur Synthese von Nanostrukturen konzentriert sich auf folgende Aspekte:

- Biotemplat-Methoden nutzen die nanoskaligen Dimensionen und die definierte Form biologischer Komponenten. Ein Templat ist ein strukturelles „Gerüst“ mit funktionellen Gruppen zur kontrollierten Abscheidung der anorganischen Materialien, und es bestimmt daher die Morphologie dieser Materialien. Auch lebende Organismen, z.B. Diatomeen und Muscheln, können durch Biomineralisation hochorganisierte, anorganische Materialien mit besonderen Eigenschaften herstellen.
- Geometrisch regelmäßig angeordnete funktionelle Gruppen, z.B. Aminosäurereste oder die DNA-Basen an der Oberfläche bioorganischer Strukturen, können Nanopartikel über elektrostatische Wechselwirkungen oder Metallionen über die Ausbildung von Metall-Ligand-Komplexen binden und somit als Nukleationszentren zur oberflächenkontrollierten Bildung von anorganischen Nanostrukturen dienen.
- Die natürliche Evolution hat hochfunktionale Molekülverbände aus Proteinen, Nucleinsäuren und anderen Makromolekülen hervorgebracht, die äußerst komplexe Funktionen z.B. aufgrund der hochspezifischen Erkennungseigenschaf-

ten ihrer Konstituenten ausführen. Diese molekulare Erkennung biologischer Makromoleküle kann gepaart mit anorganischen Komponenten zur spontanen Selbstorganisation, der sogenannten Selbstassemblierung, in komplexe Hybrid-Architekturen genutzt werden.

Eine ganze Reihe biologischer Strukturen, u.a. Viren, DNA, oder Proteine und Antikörper, ist bisher erfolgreich zur Synthese und Selbstassemblierung von nanostrukturierten, anorganischen Materialien verwendet worden [1, 2, 3]. Zur Vertiefung des nachfolgend beschriebenen Sachverhaltes siehe u.a. auch folgende Arbeiten [4, 5].

Hochgeordnete Biopolymere als Templat

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena wird am ITC-CPV der Einsatz von bioorganischen Templaten zur kontrollierten Herstellung von anorganischen Nanostrukturen untersucht. Dabei werden hochgeordnete Proteinassemblate wie z.B. Mikrotubuli verwendet.

Mikrotubuli sind Bestandteil des Cytoskelets in eukaryotischen Zellen und bilden die Grundlage für zahlreiche zelluläre Bewegungsformen [6]. Ein Mikrotubulus ist ein Polymer aus Proteinuntereinheiten, die zu einem Zylinder von 25 nm Durchmesser und Längen im Bereich von einem bis mehreren Mikrometern angeordnet sind (Abb. 1). Diese Proteine, Tubuline, bestehen aus $\alpha\beta$ -Dimeren und sind im Mikrotubulus helikal ange-

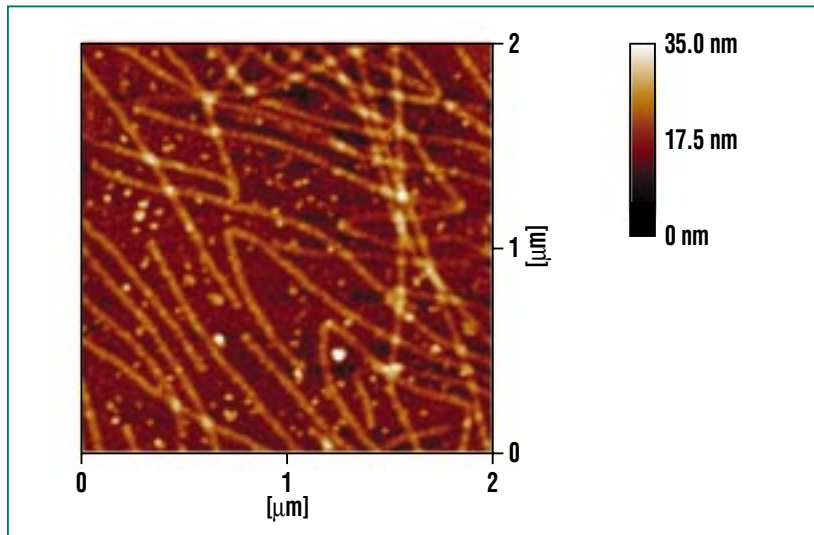


Abb. 1: Mikrotubuli sind röhrenförmige Strukturen (Aufnahme mit dem Rasterkraftmikroskop). *In vitro* entstehen Mikrotubuli durch einen Selbst-Assemblierungsprozess aus Proteinbausteinen, den Tubulindimeren, die aus Schweinehirn isoliert werden können.

ordnet. *In vitro* werden Mikrotubuli aus Tubulindimeren durch einen Selbstassemblierungsprozess gebildet, der durch die Hydrolyse von Guanosin-5'-Triphosphat (GTP) angetrieben wird.

Die Mikrotubuli-Oberfläche besteht aus repetitiven Mustern bestimmter Aminosäurereste, die eine Vielzahl von Nukleationsstellen für eine oberflächenkontrollierte Abscheidung z.B. von Metallen bilden. Mit einem Durchmesser von 25 nm und einer Länge im Bereich von einigen Mikrometern besitzen sie ein großes geometrisches Aspekt-Verhältnis. Darüber hinaus ist es durch gezieltes Anpassen der Assemblierungsbedingungen möglich, verschiedene polymorphe Tubulinassemblate wie Ringe, „Sheets“ oder Makrotubuli zu bilden [7]. Findet die Assemblierung beispielsweise in Gegenwart einer bestimmten Konzentration an Ca^{2+} -Ionen statt, so entstehen keine Mikrotubuli, sondern ausschließlich Ringstrukturen (äußerer Durchmesser ca. 55 nm und innerer Durchmesser ca. 27 nm, Abb. 2).

Synthese von metallischen Nanostrukturen mit Biomolekülen

Lineare Nanopartikelstrukturen

Auf der Oberfläche solcher hochgeordneter Proteinassemblate können bei geeigneten Reaktionsbedingungen *in situ* Metallnanopartikel gebildet werden.

Inkubiert man beispielsweise Mikrotubuli mit einem Metallsalz wie beispielsweise Na_2PdCl_4 und reduziert dann mit einem entsprechenden Reduktionsmittel *in situ*, so entstehen Metallpartikel im unteren Nanometerbereich auf der Oberfläche des Biotemplats [8]. In Abhängigkeit von der Art des verwendeten Reduktionsmittels entstehen so Nanopartikel unterschiedlicher Größe. Durch Reduktion mit dem Trinatriumsalz der Zitronensäure bei erhöhter Temperatur erhält man z.B. Palladium-Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 1.9 nm. Hingegen führt die Reduktion bei Raumtemperatur mittels eines Reduktionsbades, das als Reduktionsmittel Dimethylamin-Boran (DMAB) enthält, zu größeren Nanopartikeln mit einem mittleren Durchmesser von 3.1 nm (Abb. 3). Die Partikel sind bevorzugt an die Oberfläche des Assemblats gebunden. Die Abstände benachbarter Partikel liegen im Bereich von 5 nm.

Die Anordnung der Partikel auf dem Templat zeigt dabei eine große Ähnlichkeit zur helikalen Anordnung der Tubulinmoleküle im Mikrotubulus. Diese bevor-

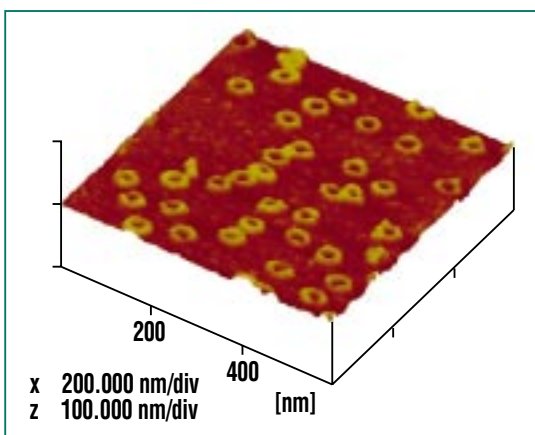


Abb. 2: Je nach Assemblierungsbedingungen bildet Tubulin nicht Mikrotubuli, sondern eine Reihe anderer polymorpher Strukturen aus. In Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen entstehen ringförmige Tubulinstrukturen (Aufnahme mit dem Rasterkraftmikroskop).

zugte Nukleation der Partikel auf dem Templat legt nahe, dass molekulare Wechselwirkungen zwischen den Palladiumionen in Lösung und den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Templats sowie bei der Bildung der Partikel auf dem Templat eine Rolle spielen.

Die Oberfläche eines Mikrotubulus besitzt eine ganze Reihe von definiert angeordneten Aminosäure-Resten, die potentielle Zentren zur Bindung der Palladiumionen und bei der Partikelbildung darstellen. Nach dem „Hard and Soft Acid and Bases Principle“ (HSAB) nach Parr und Pearson [9] würde man erwarten, dass Palladiumionen eine bevorzugte Bindungstendenz zu weichen stickstoff- oder schwefelhaltigen Liganden in den Seitenketten von Aminosäuren auf der Mikrotubuli-Außenwand besitzen, das wären Tryptophan, Histidin, Cystein oder Methionin (Abb. 4). Nach der Polymerisation der Tubulinheterodimere in Mikrotubuli sind die Aminosäurereste in der Peripherie des Moleküls durch benachbarte Heterodimere verdeckt. Ein weiterer Teil der Aminosäuren liegt in „Taschen“ und ist somit vermutlich nur noch in begrenztem Maße frei zugänglich. Als potentielle Bindungspartner für die Palladiumionen in Lösung und die anschließende Partikelbildung sollten daher besonders die vier Histidine auf der äußeren Oberfläche des Biotemplates in Frage kommen. Konsistent hiermit sind Ergebnisse theoretischer Berechnungen [10]. Eine helikale Anordnung der Partikel auf dem Templat wird auch bei der Reduktion einer Reihe weiterer Metall-

salze z.B. bei der Reduktion von HAuCl_4 mit NaBH_4 oder der Reduktion von H_2PtCl_6 und FeSO_4 mit NaBH_4 in Gegenwart von Mikrotubuli beobachtet.

Nanodrähte

Ein weiteres Beispiel für die Herstellung anorganisch-biologischer Hybridstrukturen ist die Reduktion von AgNO_3 in Gegenwart von Mikrotubuli-Templaten. Auch hier ist die Morphologie des Produktes stark von den Reaktionsbedingungen abhängig. Erfolgt die Reduktion mit Hilfe von NaBH_4 , einem starken Reduktionsmittel, in Gegenwart des Bio-

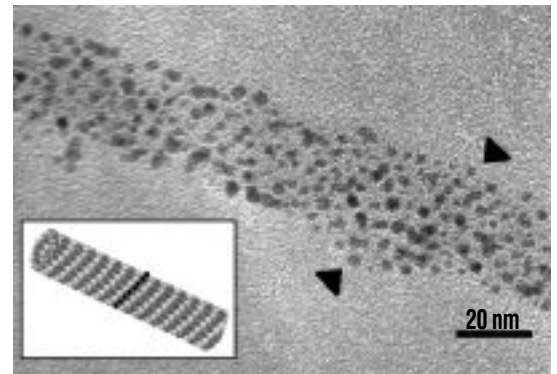


Abb. 3: Aufnahme mit dem Transmissionselektronenmikroskop, die Palladiumnanopartikel (mittlerer Durchmesser 3.1 nm) auf einem Mikrotubulus zeigt (Skala 20 nm). Die Anordnung der Partikel reflektiert die helikale Anordnung der Tubulinbausteine im Mikrotubulus [8].

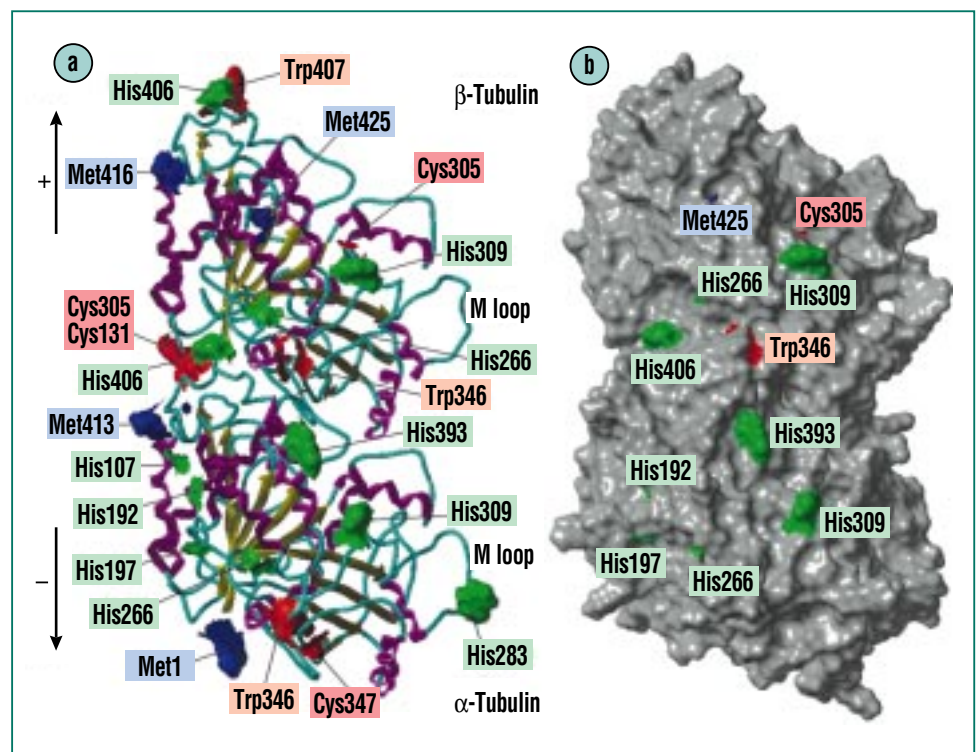


Abb. 4: (a) Bändermodell eines $\alpha\beta$ -Tubulinheterodimers mit Ansicht von der Außenseite der Mikrotubulus-Wand. Gezeigt sind die schwefel- und stickstoffhaltigen Aminosäuren Cystein, Methionin, Tryptophan und Histidin. (b) Nach der Polymerisation der Heterodimere in Mikrotubuli sind die Aminosäuren in der Peripherie des Heterodimers durch benachbarte Aminosäuren verdeckt. Nur vier Histidine liegen frei zugänglich im Zentrum auf der äußeren Oberfläche des Moleküls [8].

polymers, so entstehen 5.2 nm große Silbernanopartikel auf dem Templat [11]. Unter den eingesetzten Bedingungen wurde keine eindeutig helikale Anordnung der Partikel auf dem Mikrotubulus beobachtet. Daraus resultiert die Vermutung, dass zumindest ein Teil der Partikel homogen in Lösung entsteht und anschließend an die Oberflächenfunktionalitäten des Biopolymers bindet.

Um Nanodrähte zu erzeugen, kann man eine Methode aus der Photographie nutzen. Man entwickelt die nukleierten Silberkeime mit Hydrochinon in Gegenwart weiterer Silberionen. Dabei wachsen die Silber-Nanopartikel bis zu einem Größenbereich von 10 bis 30 nm. Die Bedeckung des Templates ist jedoch nicht kontinuierlich. Eine Veränderung der Reaktionsbedingungen, die eine Inkubation mit Silbersalzen und die direkte *In-situ*-Reduktion mit Hydrochinon einschließt, führt zu einer kontinuierlichen Silberbedeckung des Templates (Abb. 5).

Der Reduktionsprozess kann jederzeit durch Zusatz von $S_2O_3^{2-}$ gestoppt werden. In Abhängigkeit von der Reduktionszeit lassen sich so verschiedene Silberschichtdicken auf dem Biopolymer einstellen. Mit Hilfe von EDX-Analysen und HRTEM kann gezeigt werden, dass auf dem Polymer metallisches, polykristallines Silber abgeschieden wird. Nach einigen Minuten Reaktionszeit präzipitieren die gebildeten Silberstrukturen aus der Reaktionslösung und bilden ein dichtes Netzwerk.

Mikrotubuli in ihrem nativen Zustand sind lineare Strukturen. Die nach der Metallisierung resultierenden Metall-/Biopolymer-Hybridstrukturen sind im allgemeinen jedoch gekrümmt. Es stellt sich dabei die Frage, ob durch die Hydrochinon-Reduktion hohle Silberrohre entstehen oder ob das Templat bei der Metallisierung total zerstört wird und sich Silbernanodrähte ausbilden. Dazu wurden die gebildeten Struk-

turen in ein Polymer eingebettet und Schnitte quer zur Längsachse des Tubulus angefertigt. Diese Schnitte zeigen, dass in den entstandenen Silberstrukturen die Röhrenstruktur des mikrotubulären Templates erhalten geblieben ist. Der innere Durchmesser der Silberrohre beträgt 25 nm und entspricht dabei genau den äußeren Abmessungen des als Templat gewählten Biopolymers, dem Mikrotubulus (Abb. 6). Aufnahmen mit dem Transmissionselektronenmikroskop zeigen, dass nach Zugabe des Reduktionsmittels zunächst kleine Silbernukleationskeime auf dem Biopolymer gebildet werden, die dessen Oberfläche aktivieren. Das weitere Wachstum der Silberschicht erfolgt dann initiiert an einzelnen Stellen auf dem Biopolymer heterogen entlang der Templat-Oberfläche. Erfolgt die Zugabe des Reduktionsmittels vor dem Metallsalz, so bilden sich keine Metallnanodrähte.

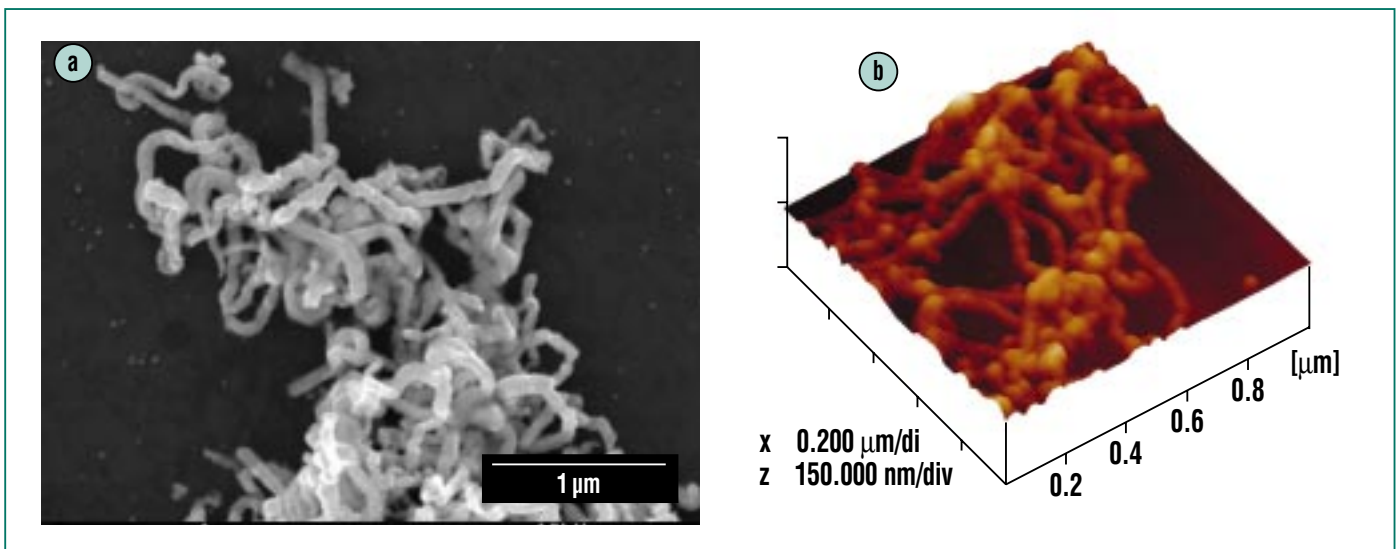


Abb. 5: Silbernanoröhren, die durch die Reduktion von Silbersalzen in Gegenwart von Mikrotubuli entstehen. Aufnahme mit dem Rasterelektronenmikroskop (a) und mit dem Rasterkraftmikroskop (b).

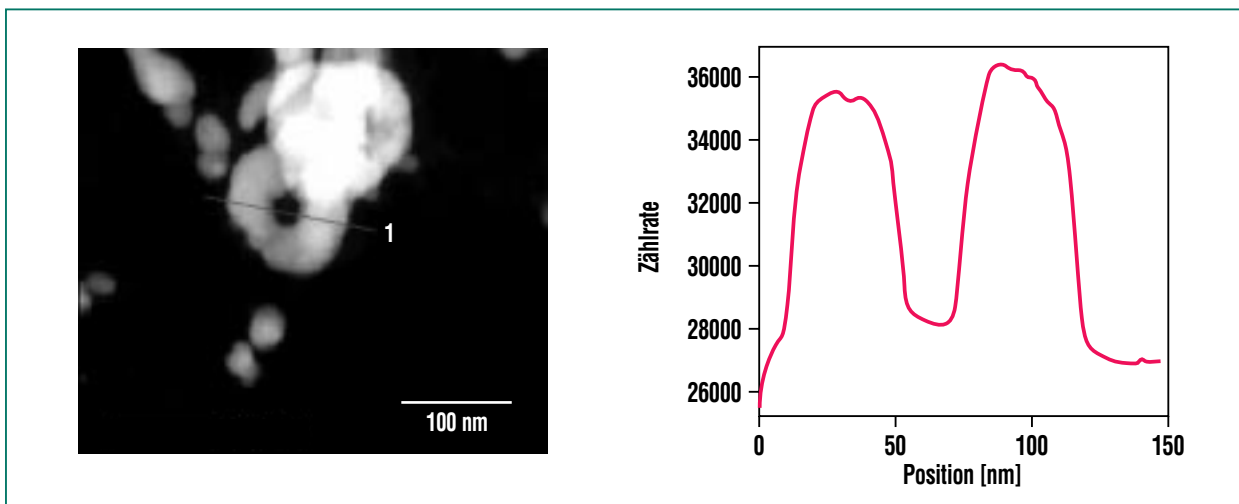


Abb. 6: Schnitt eines silberbedeckten Mikrotubulus senkrecht zur Röhrenachse. Die entstandenen Silberstrukturen besitzen einen Hohlraum, dessen Durchmesser genau den äußeren Abmessungen des verwendeten Mikrotubulus entsprechen [11].

Zusammenfassung und Ausblick

Unsere Experimente zeigen, dass die Form, die spezifischen Funktionalitäten an der Oberfläche sowie die elektrostatischen Eigenschaften eines biologischen Templates genutzt werden können, um die Anordnung Mikrometerdimensionierter Überstrukturen anorganischer Nanopartikel zu kontrollieren und die so entstandenen Nanopartikel darüber hinaus

auf dem Templat zu stabilisieren. Je nach Reaktionsbedingungen reichen die Möglichkeiten von der Synthese geordneter Nanopartikelstrukturen über Nanodrähte bis hin zu Nanoring-Systemen. Ein Problem bleibt jedoch, diese Strukturen kontrolliert auf einem Trägermaterial anzuordnen. Zukünftige Arbeiten werden sich dieser Frage widmen und sich darüber hinaus mit anderen polymorphen Tubulinassemblaten zur Herstellung maßgeschneiderter

Nanostrukturen sowie der Funktionalisierung von Nanopartikeln beschäftigen, die hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften optimiert sind. Mit den Arbeiten soll das durch interdisziplinäre Forschungsarbeiten bestehende Potenzial für die Herstellung neuartiger Materialien genutzt werden, z.B. als Voraussetzung für Anwendungen im Bereich der medizinischen Diagnostik.

Literatur

- [1] C.M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 4129, E. Dujardin, S. Mann, *Adv. Mater.* 2002, 14, 775
- [2] J. Richter, *Physica E* 2003, 16, 157
- [3] J. Storhoff, C. Mirkin, *Chem. Rev.* 1999, 99, 1849
- [4] S. Behrens, E. Dinjus, E. Unger, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Eds.: H. S. Nalwa, American Scientific Publishers, Los Angeles, 2004, 10, 381
- [5] S. Behrens, E. Unger, *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Eds.: J. Schwarz, C. Contescu, K. Putyera, Marcel Dekker, New York, 2004, 2563
- [6] E. Nogales, *Annu. Rev. Biochem.* 2000, 69, 277
- [7] E. Unger, W. Vater, K.-J. Böhm, *Electron Microsc. Rev.* 1990, 3, 355
- [8] S. Behrens, K. Rahn, W. Habicht, K.J. Böhm, H. Rösner, E. Dinjus, E. Unger, *Adv. Mater.* 2002, 22, 1621
- [9] R. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 106, 1, R. Parr, R. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* 1983, 105, 7512
- [10] L.C. Ciacchi, M. Mertig, R. Seidel, W. Pompe, A. De Vita, *Nanotechnology* 2003, 14, 840
- [11] S. Behrens, J. Wu, W. Habicht, E. Unger, *Chem. Mater.* 2004, 16, 3085