

Induktion und Kontrolle hierarchischer Ordnung durch selbstorganisierte, funktionale Polymer-Peptid-Nanostrukturen

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen
Bedingungen 2.0 Deutschland

Um die Lizenz anzusehen, gehen Sie bitte zu:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/de/>

Elektronisch veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/1983/>

urn:nbn:de:kobv:517-opus-19835

[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-19835>]

Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung

**Induktion und Kontrolle hierarchischer Ordnung
durch selbstorganisierte, funktionale
Polymer-Peptid-Nanostrukturen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Kolloidchemie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Stefanie Kessel
geboren am 27.01.81 in Schlema/Aue

Potsdam, im April 2008

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 2005 bis März 2008 am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Golm bei Potsdam.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Antonietti
2. Gutachter: Prof. Dr. P. Strauch
3. Gutachter: Prof. Dr. A. Greiner

Tag der mündlichen Disputation: 30. 06. 2008

Für meine Schwester und meine Oma

„Die Wissenschaft ist nichts Abstraktes,
sondern als Produkt menschlicher Arbeit
auch in ihrem Werdegang eng verknüpft mit der Eigenart
und dem Schicksal der Menschen, die sich ihr widmen.“

Emil Fischer

1. Einleitung und Motivation	1
2. Grundlagen	4
2.1. Hierarchischer Aufbau natürlicher Kompositmaterialien	4
2.1.1. Zusammensetzung, Aufbau und Materialeigenschaften von Knochen	4
2.1.2. Silikaskellette von Meeresorganismen	7
2.2. Silikamaterialien	9
2.3. Biologische Makromoleküle	14
2.3.1. Peptidsekundärstruktur – das β -Faltblattmotiv	14
2.3.2. Peptidsynthese	17
2.4. Polymer-Peptid-Konjugate	22
2.5. Synthese und Strukturbildung vororganisierter PEO-Peptid(VT)-Konjugate	26
3. Relevante Charakterisierungsmethoden	31
3.1. Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM)	31
3.2. Elektronenmikroskopie	32
3.2.1. Rasterelektronenmikroskopie (scanning electron microscopy, SEM)	33
3.2.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	34
3.2.3. Elektronenbeugung (selected area electron diffraction, SAED)	34
4. Gerichtete Organisation von PEO-Peptid-Nanobändern durch Silika	35
4.1. Peptidgelenkte Synthese hierarchisch aufgebauter Kompositfasern	35
4.1.1. Synthese makroskopischer anorganisch-bioorganischer Kompositfasern	36
4.1.2. Charakterisierung der Kompositfasern	38
4.1.3. Innere Strukturanalyse poröser Silikafasern	41
4.1.4. Systematische Variationen der Reaktionsbedingungen	45
4.1.5. Mechanismus der Kompositfaserbildung	50
4.2. Isolierung und Charakterisierung der Nanokompositbänder	52
4.2.1. Synthese und Charakterisierung der Nanokompositbänder	53
4.2.2. Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Nanokompositbänder	57
4.3. Plotten makroskopischer Kompositobjekte	59
4.3.1. Entwicklung des Plotprozesses – Aufbau des Setup	62
4.3.2. Charakterisierung der geplotteten Kompositfasernetzwerke	64
4.3.3. Mesoporöse Silikanetzwerkstrukturen	68
4.4. Materialeigenschaften der Kompositfasern	70

5. Hierarchische Strukturen durch gezielte Funktionalisierung von PEO-Peptid-Nanobändern	72
5.1. Imidazolfunktionalisierte PEO-Peptid-Nanobänder	73
5.1.1. Synthese imidazolfunktionalisierter PEO-Peptid-Konjugate	73
5.1.2. Aggregationsverhalten der PEO-Peptid-Konjugate VH1 und VH2	76
5.1.3. Charakterisierung der VH1 und VH2 PEO-Peptid-Nanobänder	79
5.1.4. Koordination von Nickelionen durch VH1- und VH2-Nanobänder	83
5.1.5. Komplexierung der VH1 und VH2 PEO-Peptid-Nanobänder mit hyperverzweigten Polyglycerolen	88
5.1.6. Analyse der VH1 und VH2 PEO-Peptid-Nanobandoberflächen	91
5.2. PEO-Peptid-Nanobänder mit photoschaltbaren Spiropyranseinheiten	94
5.2.1. Synthese spiropyranfunktionalisierter PEO-Peptid-Konjugate	96
5.2.2. Charakterisierung der spiropyranfunktionalisierten Konjugate	98
6. Zusammenfassung und Ausblick	108
7. Anhang	114
7.1. Experimenteller Teil	114
7.1.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften	114
7.1.2. Synthesen der PEO-Peptid-Konjugate	117
7.1.3. Synthesen der anorganisch-bioorganischen Kompositfasern	122
7.2. Methoden	125
7.3. Abkürzungsverzeichnis	129
8. Literatur	131

1. Einleitung und Motivation

Interaktionen von Molekülen über reversible Wechselwirkungen stehen im Mittelpunkt des Lebens. Sie ermöglichen die exakte Replikation der DNS, die Faltung von Proteinen in dreidimensionale Strukturen, die spezifische Erkennung von Substraten durch Enzyme und die Bindung von Botenstoffen^[1]. Hierfür dienen vor allem elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte sowie entropiegetriebene, hydrophobe Wechselwirkungen. Größere Molekülensembles werden durch Kombination dieser nichtkovalenten, schwachen Wechselwirkungen modular aus Untereinheiten zusammen gesetzt. So können hochdefinierte, perfekt auf die jeweilige Funktion angepasste Strukturen aus einem beschränkten Bausatz an Einzelmolekülen aufgebaut werden.

Eine wichtige Stoffklasse sind Proteine und Peptide, die unter anderem einen wesentlichen Einfluss auf die Strukturbildung in vielen biologischen Materialien ausüben. Es entstehen sowohl Konstruktionsmaterialien aus reinen Proteinstrukturen^[2] aber auch Komposite in Verbindung mit anorganischen Stoffen, deren außergewöhnlichen Materialeigenschaften Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Biomaterialien und synthetischen Materialien besteht dabei in der Art der Konstruktionsprinzipien. Synthetische Kompositmaterialien werden bisher meist in top-down-Ansätzen hergestellt^[3], die auf der stufenweisen Miniaturisierung größerer Strukturen beruhen. Konträr dazu folgt der Aufbau der Naturkomposite Selbstorganisationsprinzipien^[4]. Diese Strategie wird als bottom-up-Ansatz bezeichnet. In den supramolekularen Verbänden verleihen die genutzten schwachen Wechselwirkungen dem Ensemble einen hohen Grad an Flexibilität und Stabilität. Zielstrukturen können so bei Vorhandensein von kooperativen Effekten mit einer hohen Präzision entstehen. Die Materialeigenschaften stehen aufgrund dessen im direkten Zusammenhang mit dem inneren Aufbau der Strukturen. In den kommenden Jahren könnten neue Technologien, die molekulare Selbstorganisation als wesentlichen Konstruktionsprozess einsetzen (bottom-up-Strategien), enorm wichtig werden^[5].

Viele grundlegende Organisationsprinzipien wurden schon erfolgreich von der Natur abgeschaut^[6]. Weitere Forschungsbemühungen gehen in die Richtung auch die komplexen Struktur-Funktions-Beziehungen hinter höheren hierarchischen Ordnungen zu entschlüsseln und zu nutzen. In diesen Kontext ist die vorliegende Arbeit einzuordnen.

Ein vielversprechendes Forschungsgebiet befasst sich mit der Anwendung der in der Natur geltenden Aggregationsprinzipien in der Polymerchemie. Mit der Synthese von makromolekularen Chimären, die auf der Verknüpfung von Peptid- mit Polymersträngen beruhen, gelingt es die Strukturbildungsfähigkeiten der Peptide auf synthetische Polymere zu übertragen^[7]. Ein Konzept basiert auf der Verknüpfung von Polymeren mit Peptidsequenzen, die eine hohe Tendenz zur Ausbildung einer β -Faltblatt Sekundärstruktur haben^[8]. β -Faltblattmotive haben einige Vorzüge gegenüber anderen Sekundärstrukturen, so gelingt es z.B. schon mit kurzen Peptidsträngen stabile Aggregate zu bilden. Des Weiteren ordnen sich natürliche und synthetische Peptidketten, die β -Faltblattstrukturen einnehmen, oft in fibrillären Systemen mit Dimensionen im μm - bis nm-Bereich an^[9].

In vorangestellten Arbeiten konnte demonstriert werden, dass Polymer-Peptid-Konjugate, deren Peptidstränge durch Anbindung an ein Templatmolekül vororganisiert werden, definierte, stäbchenförmiger Aggregate mit einheitlichen Höhen und Breiten ausbilden^[10, 11]. Diese Polyethylenoxid(PEO)-Peptid-Nanobänder zeichnen sich durch die Existenz eines β -Faltblatt Peptidkerns und einer PEO-Hülle aus. Entlang des Peptidkerns entstehen funktionale Oberflächen, die die Seitenkettenfunktionalitäten der eingebauten Aminosäuren präsentieren.

Das Ziel dieser Arbeit sollte sein, solche Bandstrukturen gezielt zu verknüpfen und in hierarchisch organisierten, supramolekularen Strukturen anzuordnen. Hierfür können die Bandbreite der Funktionalitäten, mit denen die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren ausgestattet sind, genutzt oder andere gewünschte Funktionen über synthetische Aminosäuren in die Nanofasern eingebaut werden.

Eine Strategie zur Verknüpfung der PEO-Peptid-Nanobänder bestand in der Verwendung dieser als Analoga zu Silika Morphogeneseproteinen in einer bioinspirierten Silifizierungsreaktion. Die Biosilifizierungsstrategien von Meeresorganismen wurden als Möglichkeit zur Synthese komplexer Kompositsysteme auf Silikabasis erkannt. In der Natur kontrollieren und leiten fibrilläre Proteine oder andere Biomakromoleküle (Peptide, Polysaccharide) die Kondensationsreaktion der Silikavorläufermoleküle in hierarchisch organisierte Strukturen. Silikatische Kompositfasern auf nanoskopischer Ebene könnten z.B. mit ihren anisotropen Dimensionen und gerichteten Eigenschaften sehr interessant für bottom-up-Ansätze sein.

Die von den Nanobändern zur Verfügung gestellten Oberflächenfunktionen sind nachweislich wichtig für die Wechselwirkung mit Kieselsäuremolekülen^[12, 13]. Auch die stäbchenartige Struktur, ein Resultat der Abschirmung des planaren Peptidkerns durch die PEO-Ketten, unterstützt in Analogie zu biologischen Proteinfilamenten die Bildung anisotroper Silikastrukturen.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die PEO-Peptid-Nanobänder die Fähigkeit zur Anreicherung von Kieselsäure besitzen, in wie weit eine Vernetzung der Nanobänder stattfindet und ob die Synthese eines bioorganisch-anorganischen Kompositmaterials möglich ist, welches den Silikanadeln von Kieselschwämmen nachempfunden ist.

Neben der Verwendung von anorganischen Matrixmaterialien als Verbindungskomponente zwischen den Nanobändern sollten auch organische oder metallorganische Kompositmaterialien dargestellt werden. Hierfür bieten sich u.a. ionische Wechselwirkungen oder koordinative, metallorganische Bindungen an. Durch Änderungen in der Aminosäuresequenz der vororganisierten PEO-Peptid-Konjugate können präzise funktionalisierte Peptidkerne erzeugt werden. Interessant dabei ist, welche Kriterien bei der Wahl der Aminosäuresequenz eingehalten werden müssen, um weiterhin die Aggregation zu Nanobandstrukturen zu gewährleisten. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war demnach die Synthese von imidazol- und spiropyranfunktionalisierten PEO-Peptid-Konjugaten, sowie die Untersuchung ihres Aggregations- und Komplexierungsverhaltens. Als Vorbild aus der Natur dienen im ersten Fall metallkoordinierende Aminosäuren aus den katalytisch aktiven Zentren von Enzymen^[14], z.B. Zinkfingerproteinen, Hämoglobin oder Superoxid-Dismutasen. Im zweiten Fall sollte die Dimerisierungstendenz photochromer Moleküle genutzt werden.

PEO-Peptid-Nanobandstrukturen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit als funktionale Gerüststrukturen für Kompositmaterialien eingesetzt werden. Induzierte Sekundärwechselwirkungen zwischen den Nanobändern oder mit Co-Materialien sollten zur Organisation der Nanostrukturen und zum Aufbau hierarchischer Ensembles führen. Die gezielte Variation der Nanobandoberflächenfunktionen erlaubt dabei eine genaue Analyse der Struktur-Wechselwirkungs-Beziehungen.

2. Grundlagen

2.1. *Hierarchischer Aufbau natürlicher Kompositmaterialien*

In der Natur vorkommende biologische Stoffe übernehmen eine Vielzahl an Funktionen, u.a. kommen Materialien zum Einsatz, die den Körper stabilisieren und vor äußeren Einflüssen schützen. Viele dieser Konstruktionsmaterialien sind faserverstärkte oder fasergeleitete Komposite mit einer hierarchischen Struktur, die sich durch exzellente Materialeigenschaften auszeichnen^[15]. Dabei besteht ein direkter Zusammenhang zwischen den benötigten Materialeigenschaften und dem Aufbau der Strukturen in allen Hierarchieebenen. Die meisten natürlichen Konstruktionsmaterialien bestehen aus organischen (Polymer-Polymer) oder organisch-anorganischen (Polymer-Keramik) Kompositen.

Das Verständnis über die Struktur-Eigenschaftsbeziehungen dieser Materialien könnte zur Entwicklung neuer synthetischer Konstruktionsmaterialien führen^[16]. Daher soll im Folgenden der Aufbau solch komplexer Materialien anhand zweier ausgewählter Beispiele verdeutlicht werden. Zum einen wird das Zusammenspiel der Einzelkomponenten im Knochen erläutert. Dieses Kompositmaterial besteht je rund zur Hälfte aus organischem Polymer und anorganischen Mineralpartikeln^[17]. Zum anderen wird die Gerüststruktur eines Glasschwamms erklärt, die zum großen Teil aus Silikapartikeln besteht^[18].

2.1.1. **Zusammensetzung, Aufbau und Materialeigenschaften von Knochen**

Anhand ihrer Eigenschaften lassen sich zwei Hauptarten von Knochentypen im Skelett unterscheiden. Kompakte Knochen zeichnen sich durch eine geringe Porosität (~10%) und eine große Härte aus. Diese Knochenart wird in den äußeren Schichten der Knochen oder in den Gelenkansätzen gefunden und erzeugt die hohe Stabilität. Trabekuläre Knochen sind dagegen weniger fest, besitzen eine hohe Porosität (50-90%) und eine geringe Dichte. Daher kommt dieser Typ z.B. im Inneren von langen Knochen oder in den Wirbelkörpern vor. Arterien und Venen verlaufen ebenfalls durch diesen Knochentyp. Trabekuläre Knochen sind schwammartig aufgebaut und weisen Verstrebungen (Trabekeln) in unterschiedlichen Größenordnungen auf. Die Übertragung dieser charakteristischen Eigenschaften auf synthetische Werkstoffe wäre für die Materialwissenschaft hochinteressant^[19]. Es könnten auf spezifische Anforderungen angepasst Materialien gestaltet werden, die sehr leicht an mechanisch unbedeutenden Stellen sowie steif und fest an hoch belasteten Stellen sind.

Knochengewebe kann durch gezielten Knochenabbau (durch die Osteoklasten) und Knochenaufbau (durch die Osteoplasten) auf mechanische Belastungen reagieren und die Knochenstruktur an stark beanspruchten Stellen verstärken (Wolff-Roux-Gesetz). Dies würde bei synthetischen Konstruktionsmaterialien eine dynamische Anpassung der Struktur auf die mechanische Belastung bedeuten. Die Knochenmatrix besteht bei allen Knochentypen zu 65-70% aus carbonathaltigem Hydroxyapatit, dem mineralischen Anteil. Der organische Anteil setzt sich aus spezialisierten Proteinen sowie Glykoproteinen zusammen, welche 30-35% ausmachen. Während die Glykoproteine für die Komplexierung von Calciumionen verantwortlich sind und die Nukleation des Hydroxyapatits kontrollieren, üben die Proteinfasern in Form von Collagen (Typ I) die Funktion der strukturgebenden Komponente aus.

Collagen existiert in Form von drei Peptidketten, die sich zu einer rechtsgängigen Triplehelix verdrillen (Abb. 2.1 a). In der Primärstruktur tritt als häufig wiederholtes Motiv eine Sequenz X-Y-Glycin, mit X und Y gleich Prolin und Hydroxyprolin, auf^[20].

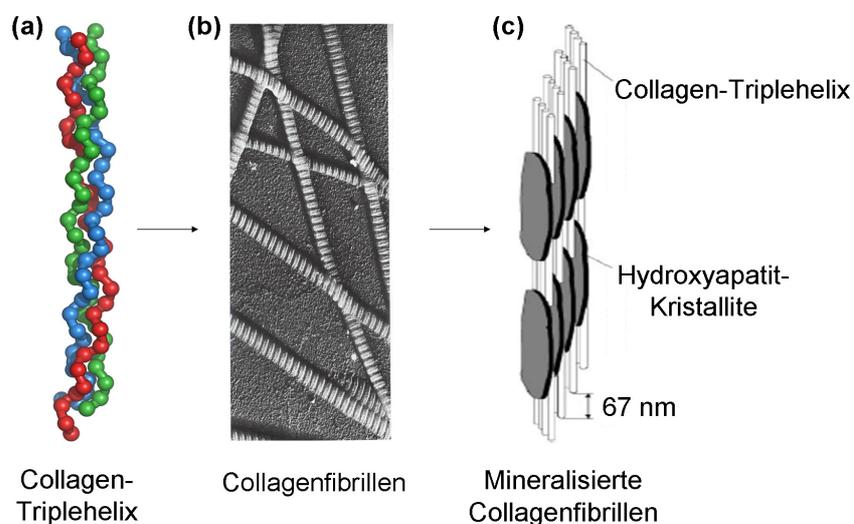


Abb. 2.1. Bauelemente der Knochenstruktur, schematische Darstellung der Collagen-Triplehelix mit einer Länge von ~ 300 nm (a); SEM-Aufnahme von Collagenfibrillen (b); schematische Darstellung der mineralisierten Collagenmoleküle (c); entnommen aus Lit.^[21].

Das dicht gepackte Ensemble der Triplehelix wird durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Zusätzlich ist jede dritte Aminosäure in der Sequenz ein Glycin, deren sterisch unanspruchsvolle Seitenkette (Wasserstoffatom) sich im Inneren der Helix befindet.

Diese helikalen Collagenmoleküle mit einer Länge von ~ 300 nm lagern sich weiter zu Collagenfibrillen (Abb. 2.1 b) zusammen, in denen sie parallel entlang der Fibrillenachse ausgerichtet sind und Abstände von 67 nm einnehmen. Die Vernetzung der Collagenmoleküle wird durch Reaktionen von Lysin- mit Histidinseitenketten bewirkt, ausgelöst durch eine enzymatische, oxidative Deaminierung einer Lysinaminogruppe^[21]. Die starre Triplehelix-Struktur ist verantwortlich für die sehr hohe Zugfestigkeit der Collagenfibrillen. Diese eignen sich deshalb hervorragend als strukturgebende Elemente in Knocheninneren. Die Mineralisierung der Collagenfibrillen (Abb. 2.1 c) führt zu Objekten mit Durchmessern von ~ 100 nm, die als Grundbausteine des Knochenaufbaus angesehen werden^[21]. Primär gebildete Hydroxyapatitpartikel sind mit einer Höhe von 2-4 nm sehr dünne Objekte (Abb. 2.1 c). Es gibt Hinweise darauf, dass die Kristallisation bevorzugt in den Lücken zwischen den Collagenfibrillen beginnt. Die Wachstumsrichtung der Mineralpartikel wird dabei von den organischen Fasern vorgegeben und verläuft parallel zur Längsachse der Fibrille. Diese Orientierung und die Ausrichtung der Kristalle bedingen primär die anisotropen Eigenschaften der Knochenstruktur. Das gut angepasste Hochleistungsmaterial Knochen ist allerdings weit komplexer, da die mechanischen Eigenschaften aus einer hierarchischen Anordnung der Protoelemente resultieren. Die Komplexität des Knochenaufbaus ist schematisch in Abbildung 2.2. dargestellt.

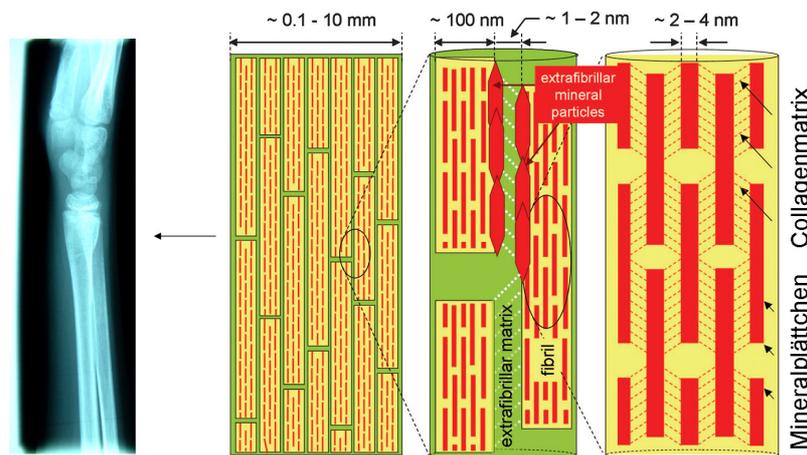


Abb. 2.2. Vereinfachte schematische Darstellung des modularen Knochenaufbaus, Fibrillen mit in die Collagenmatrix eingelagerten Mineralplättchen ordnen sich parallel ausgerichtet in einer extrafibrillären Matrix an; entnommen aus Lit.^[22].

Mineralisierte Collagenfibrillen ordnen sich ausgerichtet innerhalb einer extrafibrillären Matrix an, die als elastischer Kleber zwischen den Kompositstrukturen wirkt. Die Grenzflächen werden durch extrafibrilläre Mineralpartikel zusätzlich optimiert. Auftretende Zugbelastungen werden durch diesen Aufbau gut kompensiert, indem die Belastung auf die einzelnen Hierarchieebenen übertragen wird. So leiten die starren Mineralpartikel Zugbelastung über Scherkräfte auf die Collagenmatrix weiter^[22].

In Hinblick auf medizinische oder materialwissenschaftliche Anwendungen wäre die Möglichkeit der Synthese von künstlichem Knochengewebe oder analogen Hydroxyapatit-Kompositen wünschenswert. Hier gibt es Ansätze unter Verwendung biologisch aktiver Glasarten. Dieses sogenannte Bioglas besteht aus SiO_2 , Na_2O , CaO und P_2O_5 , besitzt ein amorphes 2D-Netzwerk, ein ähnliches Elastizitätsmodul im Vergleich zu kortikalen Knochen und fördert die Mineralisation von Hydroxyapatit^[23]. Des Weiteren wurde die Mineralisation von Hydroxyapatit auf elektrogewebenen Poly(L-Milchsäure)-Nanofasern^[24] und amphiphilen Peptidnanofasern^[25] untersucht. Zwar können die primären Strukturelemente (Faser-Kristall-Komposite) erzeugt werden, allerdings ist die Bildung von hierarchischen Strukturen weiterhin problematisch.

2.1.2. Silikaskellette von Meeresorganismen

Ein sehr elegantes Beispiel für natürliche, faserverstärkte Komposite sind die Käfigstrukturen von Meeresorganismen (Glasschwämme und Kieselalgen (Diatomeen)). Das Hauptkonstruktionsmaterial dieser Strukturen ist Glas, wobei die Organismen evolutionär effektive Wege entwickelten, die Sprödigkeit des Materials durch strukturierte Kompositmaterialien zu überwinden. Es konnte gezeigt werden, dass Bioglasfasern im Vergleich zu technischen Glasfasern gleicher Dimension sehr flexibel und zäh sind^[26]. Diese Silikanadeln sind das Grundstrukturelement im Aufbau des Skeletts der Glasschwämme^[27]. Alle zusätzlich auftretenden Hierarchieebenen sollen exemplarisch für den Schwamm *Euplectella sp.*^[18] anhand von Abbildung 2.3. erläutert werden.

Der Aufbau der Käfigstruktur beginnt mit einem zentralen Proteinfilament (Silikateine), welches konzentrisch mit verfestigten, hydratisierten Silikananopartikeln (50-200 nm) umgeben ist (Abb. 2.3 A). Silikapartikel und Proteine werden anschließend schichtweise um die primär silifizierten Proteinfilamente herum aufgebaut. Die entstehenden Silikanadeln können deswegen als Schichtkomposite betrachtet werden (Abb. 2.3 B).

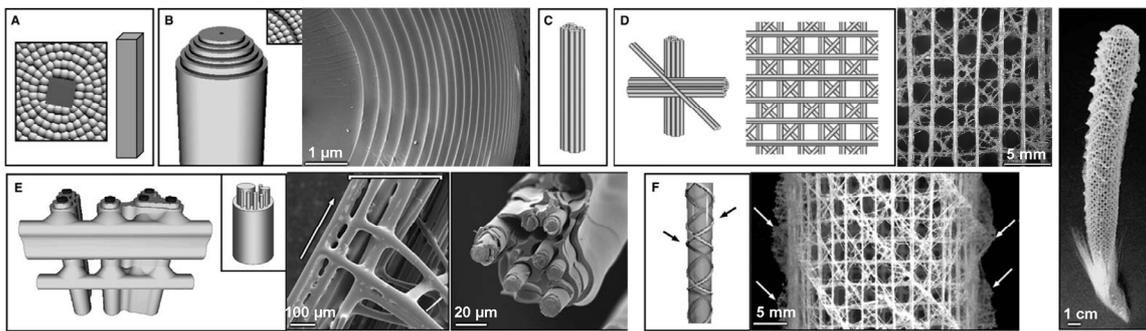


Abb. 2.3. Käfigstruktur des Glasschwammes *Euplectella sp.*, schematische Zeichnungen und SEM-Aufnahmen verdeutlichen den hierarchischen Aufbau; entnommen aus Lit.^[18, 27].

Die organische Komponente verhindert aufgrund ihrer Elastizität, dass Risse und Brüche sich von einer Silikaschicht auf andere fortsetzen, was essenziell zur Stabilität der Glasfasern beiträgt. Dickere innere Schichten verbessern die mechanische Steifigkeit, während die äußeren dünnen Schichten effektiv das Ausbreiten von tiefen Brüchen verhindern. Daher wird eine Abnahme der Silikaschichtdicke von innen nach außen beobachtet. Die Silikanadeln haben Durchmesser von 5-50 µm. Die nächste Hierarchieebene entsteht durch eine parallele Bündelung der Glasnadeln (Abb. 2.3 C). Diese Faserbündel organisieren sich horizontal und vertikal in einer quadratischen Gitterstruktur, die durch diagonale Faserbündel verstärkt wird (Abb. 2.3 D). Zusätzliche Verstärkung erfährt die Käfigstruktur durch zwei weitere Hierarchieebenen. Alle Silikafaserbündel werden in eine Matrix aus hydratisiertem, wenig vernetztem und daher elastischem Silika gebettet (Abb. 2.3 E). Besonders die Knotenpunkte der individuellen Bündel werden verstärkt. Abschließend wird der Käfig von helikalen Silikafasern umgeben, die mit der Silikamatrix verbunden sind und eine ovale Verformung der Struktur verhindern (Abb. 2.3 F).

Neben den Glasschwämmen produzieren auch Diatomeen und Protozoen komplexe Exoskelette zum Schutz ihrer Körper. Die *Acanthoecaceae* aus der Familie der Protozoen^[28] bildet z.B. innerhalb weniger Minuten eine komplexe, käfigartige Struktur aus hohlen Silikastäbchen. Diatomeen silifizieren ihre Zellwände, indem sie spezialisierte intrazelluläre Regionen (silica deposition vesicle, SDV) nutzen^[29]. Dort wird die Silikakondensation, sowie die Bildung einer hexagonalen Anordnung der entstehenden Silikastrukturen kontrolliert. Die spezielle Struktur ermöglicht den Diatomeen einer mechanischen Kraft von 100-700 t/m² zu widerstehen^[30].

2.2. Silikamaterialien

Der beschriebene komplexe Aufbau der Kieselskelette von Diatomeen und Meeresschwämmen stellt die Bedeutung selbstorganisierter Prozesse zur Darstellung hochgeordneter Materialien heraus. Auf dem Gebiet technischer Silikamaterialien liegt der Fokus seit einigen Jahren auf der Synthese funktionaler Silikate. Hierfür ist die Kontrolle über den hierarchischen Aufbau der Nano- und Mikrostrukturen, die Porosität, Chiralität oder Oberflächenfunktionen unbedingt notwendig.

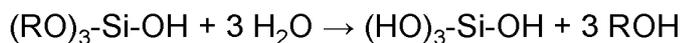
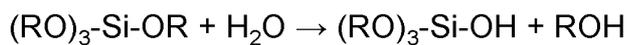
Zeolithe^[31] zeichnen sich durch eine geordnete Struktur aus gleichförmigen Poren und Kanälen aus. Diese Alumosilikate setzen sich aus einer mikroporösen Gerüststruktur aus AlO_4^- - und SiO_4 -Tetraedern zusammen. Solche Materialien besitzen demnach eine große spezifische Oberfläche mit über $1.000 \text{ m}^2/\text{g}$. Zeolithe werden als Ionenaustauscher, Molekularsiebe^[32] bzw. Absorbentien und insbesondere in modifizierten Varianten als Katalysatoren^[33] für die Funktionalisierung und Aufbereitung von Kohlenwasserstoffen eingesetzt.

Mit den ersten Arbeiten zu synthetisch hergestellten porösen Silikaten, welche geordnete Porenstrukturen in einem Größenbereich von $>1.5 \text{ nm}$ enthielten, wurde die Begrenzung der Porenweiten der Zeolithe durchbrochen^[34]. Es wurde darin die Synthese eines geordneten mesoporösen Molekularsiebs beschrieben und damit der Grundstein für ein ganzes Forschungsgebiet gelegt. Zwar wurden katalytische Aktivitäten, wie sie die Zeolithe aufweisen nie erreicht, dennoch gibt es vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten für poröse Silikamaterialien in Bereichen der Katalyse^[35], Nanoreaktoren^[36], Optik^[37], Elektrochemie^[38], Sensorik^[39] und Separation^[40].

Das Grundprinzip zur Darstellung mesoporöser Silikate ist unabhängig von gewünschter Porenstruktur und -größe und beruht auf einem Sol-Gel-Prozess. Dabei werden lösliche Vorläufermoleküle zu einem anorganischen Netzwerk umgesetzt. Die meistgenutzten Precursoren sind Metall- und Halbmetallalkoxide, im Fall von silikatischen Netzwerken Tetramethoxysilan (TMOS) und Tetraethoxysilan (TEOS). Seltener werden statt Alkoxysilanen andere Silikavorläufer wie Natriumsilikat^[41] (Wasserglas) oder Siliciumcatecholatsalze ($\text{M}_2[\text{Si}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2)_3] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, $\text{M} = \text{Li}, \text{Na}, \text{K}$)^[42] eingesetzt. Unter sauren oder basischen Bedingungen folgt die Vernetzungsreaktion der Tetraalkoxysilane einem Hydrolyse-Kondensations-Mechanismus.

Im ersten Schritt, der Hydrolyse (Abb. 2.4 a), werden die Alkoxygruppen durch Hydroxylgruppen substituiert. Im darauffolgenden Schritt (Abb. 2.4 b) findet unter Abspaltung von Wasser die Kondensation zum SiO₂-Netzwerk statt. Die Geschwindigkeiten der Hydrolyse- und Kondensationsreaktion werden von verschiedenen Parametern beeinflusst. Neben Art und sterischem Anspruch der Alkoxygruppen, Temperatur und Lösungsmittel ist vor allem der pH-Wert entscheidend.

a) Hydrolyse



b) Kondensation

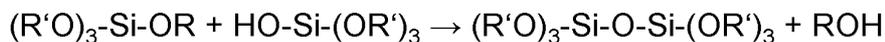
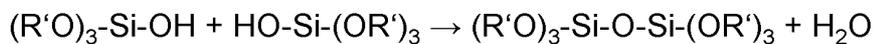


Abb. 2.4. Sol-Gel-Prozess – Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen von Tetraalkoxysilanen, die zur Ausbildung eines SiO₂-Netzwerkes führen (R = Alkyl; R' = Alkyl, H, SiO₂-Netzwerk).

Bei pH-Werten < 5 ist die Hydrolyse wesentlich schneller als die Kondensation, so dass hauptsächlich Si(OH)₄-Monomere, neben wenig niedermolekularen Oligomeren, entstehen. Dieser Verlauf führt zur Bildung von 3D-Netzwerken aus kleinen SiO₂-Partikeln^[43]. Mit Erhöhung des pH-Wertes auf > 5 ist die Kondensationsreaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Dadurch bilden sich große Silikapartikel, die nur langsam in 3D-Netzwerke übergehen^[44].

Ausgehend von diesem grundlegenden Mechanismus wurde durch Kombination des Sol-Gel-Prozesses mit Selbstorganisationsprozessen eine Strukturkontrolle für Silikamaterialien geschaffen. Die Templatierung strukturdirigierender Agenzien erlaubt die Synthese strukturierter Hybridmaterialien und daraus durch Calcinieren erhältlicher, mesoporöser Silikate. Im Laufe der Entwicklungsarbeit auf diesem Gebiet wurden zahlreiche organische Templatmoleküle, darunter niedermolekulare Tenside^[34], amphiphile Blockcopolymere^[45], Farbstoffe^[46], Biomoleküle^[47] und Latexpartikel^[48], eingesetzt. Es kommen prinzipiell alle Moleküle in Frage deren Grenzflächenenergie klein zur Precursorphase ist, um Makrophasenentmischungen zu vermeiden. Am häufigsten werden supramolekulare Aggregate von Amphiphilen, ionische Tenside oder Blockcopolymere, die eine Stabilisierung in der wässrigen Phase erfahren, verwendet.

In den ersten Arbeiten zu mesostrukturierten Silikaten wurde auf ionische Tenside^[49], wie Alkyltrimethylammoniumsalze (z.B. Cetyltrimethylammoniumbromid, CTAB), Alkylsulfonate oder Alkylphosphonate, zurückgegriffen. MCM-41, eines der bekanntesten mesoporösen Silikamaterialien, wurde mit CTAB als Templat synthetisiert und zeichnet sich durch einheitliche, 2D-hexagonal gepackte, zylindrische Poren aus. Die Porendurchmesser können in Abhängigkeit vom verwendeten Tensid zwischen 2 und 10 nm kontrolliert eingestellt werden.

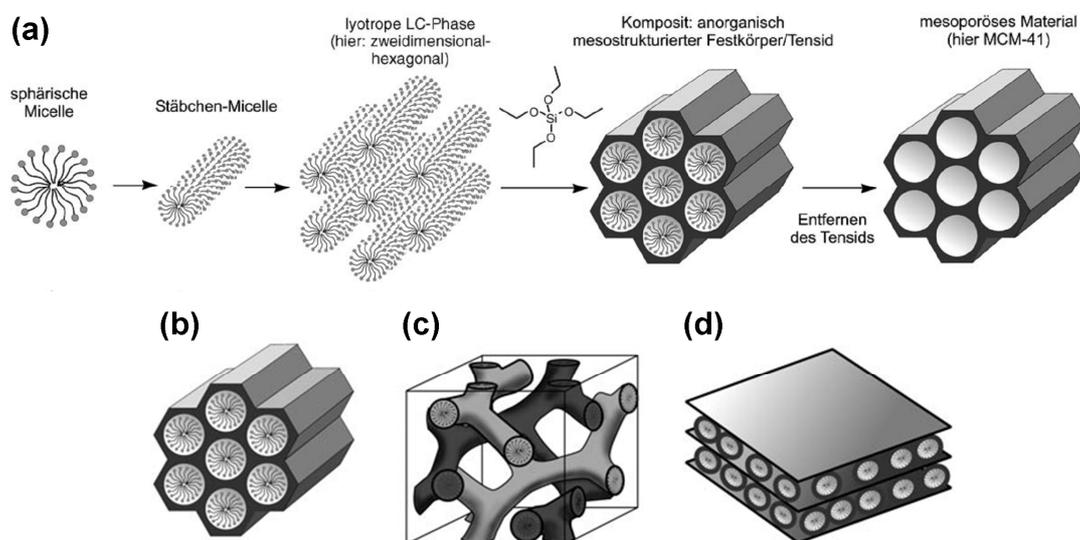


Abb. 2.5. Grafische Darstellung des Templatingprozesses eines Tensidmoleküls mit TEOS (a); Phasenverhalten der Tensid/Silikamischungen und Porenstruktur von mesoporösen Silikaten (MCM-41 (b), MCM-48 (c), MCM-50 (d)), entnommen aus Lit.^[50].

In der Regel wurden die MCM-41-Synthesen mit Tensidkonzentrationen durchgeführt, die weit unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration (critical micellar concentration, CMC) lagen. Das Auftreten der geordneten Porenstruktur kann somit nur über einen synergistischen Effekt zwischen Tensid und Silikamolekülen erklärt werden (Abb. 2.5 a)^[51]. Es wird angenommen, dass die kationische Kopfgruppe des Tensids Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Silikaclustern eingeht^[50]. Die Strukturbildung des Tensids vollzieht sich nur in Gegenwart des Silikaprecursors während der Kondensation. Neben der 2D-hexagonalen MCM-41-Phase (Raumgruppe $p6mm$) (Abb. 2.5 b) lassen sich durch Erhöhung der Templatkonzentrationen auch das kubische MCM-48 (Raumgruppe $Ia3d$) (Abb. 2.5 c) und MCM-50, welches eine lamellare Struktur (Raumgruppe $p2$) (Abb. 2.5 d) besitzt, erhalten^[34, 52].

Als zweite Methode zur Darstellung mesoporöser Silikate wird der Flüssigkristall-Templat-Ansatz (true liquid crystal templating, TLCT) angewendet^[53]. Hierbei wird von hohen Tensidkonzentrationen ausgegangen, so dass sich unter den gegebenen Bedingungen eine lyotrope flüssigkristalline Phase schon ohne die Gegenwart des Silikaprecursors bildet. Nach der Kondensation wird eine Porenstruktur beobachtet, die ein genauer negativer Abdruck der Templatphase ist. Dies wurde durch Röntgen- und TEM-Messungen bestätigt^[54]. Da dieser Ansatz den Abdruck einer organischen Templatphase bis in den Nanometerbereich erlaubt, wird auch von Nanocasting gesprochen^[55].

Es existieren zwei Hauptbeschränkungen bei der Synthese poröser Silikate mit Tensidtemplaten^[49]. Zum ersten könnten die typischen Wanddicken von 0.8-1.3 nm zu Stabilitätsproblemen in katalytischen Verfahren führen. Zum zweiten sind Porengrößen > 10 nm nur unter erschwerten Bedingungen zugänglich. Daher wurden sowohl Fällungs- als auch TLCT-Ansätze auf den Einsatz von amphiphilen Blockcopolymeren übertragen. Pimavaia *et al.*^[56] benutzten als erste Alkyl-Polyethylenoxid- und Polyethylen-Polypropylenoxid-Blockcopolymere in Templatierungsreaktionen unter neutralen Bedingungen. Es wurden einige Verbesserungen wie größere Wanddicken (1.5-4.0 nm), eine verbesserte thermische Stabilität, einfacheres Einstellen der Porengrößen und leichteres Entfernen des Lösungsmittels festgestellt. Unter Verwendung verschiedener Triblockcopolymere Poly(EO)_n(PO)_m(EO)_n [P123] wurden von der Arbeitsgruppe um Stucky *et al.* hochorganisierte Silikate mit Porengrößen von 4.5-30.0 nm und Wanddicken von bis zu 7.0 nm synthetisiert^[57]. Das 2D-hexagonale SBA-15 wird als großporiges Äquivalent zu MCM-41 betrachtet^[58]. Die Synthese wurde mit TEOS als Silikaprecursor bei 35-60 °C unter sauren Bedingungen durchgeführt.

Der TLCT-Ansatz wurde von der Arbeitsgruppe um Antonietti *et al.*^[59] auf eine große Bandbreite an anorganischen Netzwerken und Blockcopolymeren ausgeweitet. So kamen PI-*b*-PEO, P(EO-*b*-butylen)-*b*-PEO (KLE)^[60], PS-PEO^[61] oder ionische Polymere^[62] zum Einsatz.

Die templatierenden Substanzen werden anschließend durch Calcinieren entfernt, um die mesoporöse Porenstruktur zu erhalten. Unter Verwendung des Sol-Gel-Prozesses können im Gegensatz dazu auch anorganisch-organische Polymerkomposite dargestellt werden^[63, 64]. Das Hauptproblem bei deren Herstellung sind häufig komplementäre Polaritäten der Polymere und Silikaprecursoren, die ohne geeignete Zusätze zur Entmischung der Komponenten und damit zum Verlust der besonderen Materialeigenschaften führen.

An diesem Beispiel wird deutlich, wie wichtig die Kontrolle der Grenzflächen zwischen den Komponenten ist. Die Natur hat hierzu einzigartige Methoden entwickelt, und auch die Technik versucht das Zusammenwirken der Komponenten durch die Ausbildung von Wechselwirkungen an den Grenzflächen zu optimieren. In Abhängigkeit von der Art der Wechselwirkungen zwischen anorganischer und organischer Phase werden drei Materialklassen unterschieden^[65]: Bei Typ-I-Kompositen handelt es sich um interpenetrierte Netzwerke (IPN) eines Polymers in der anorganischen Matrix. Es existieren keine attraktiven Wechselwirkungen zwischen den Phasen, eine Entmischung kann aber aus physikalischen Gründen (z.B. durch die Vernetzung des Polymers) nicht stattfinden. Es wird jedoch eine Phasenseparation auf molekularer Ebene beobachtet. Typ-II-Komposite sind solche Polymerkomposite, bei denen der Phasenkontakt über intermolekulare Wechselwirkungen (van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrücken, elektrostatische und ionische Wechselwirkungen) vermittelt wird. In die meist nicht vernetzte Polymerphase wird das anorganische Material als Nanopartikel dispergiert. In Typ-III-Kompositen sind organische und anorganische Komponenten über kovalente Bindungen miteinander verknüpft. Dafür werden unter anderem spezielle Alkoxysilane eingesetzt, die polymerisierbare Gruppen tragen. Polymerkomposite weisen eine große strukturelle Vielfalt auf. Dies wird durch die Diversität der einsetzbaren Edukte, durch die Wechselwirkungsmöglichkeiten der Komponenten und die Synthesestrategien bewirkt.

In biologischen Systemen dirigieren vor allem Proteinmoleküle die strukturellen Eigenschaften komplexer Kompositmaterialien. Daher wird in der letzten Zeit intensiv auf dem Gebiet geforscht, Biomakromoleküle (DNA, Zucker, Proteine) für die Synthese anorganischer Komposite und mesoporöser Systeme einzusetzen. Der Fokus liegt hierbei einerseits auf der Aufklärung der Mechanismen biologischer Silifizierungsreaktionen, andererseits auf der Entwicklung einfacher Zugänge zu hochstrukturierten, hierarchisch aufgebauten Silikastrukturen. Bei der Nachahmung von Biosilifizierungsreaktionen werden zwei Wege beschritten. Zum ersten werden die spezifischen Silika Morphogeneseproteine aus den Meeresorganismen extrahiert und deren Sequenz analysiert^[12, 66]. Zum zweiten werden die Struktur und die Funktion dieser Proteine durch den Einsatz anderer Makromoleküle imitiert^[67, 68]. Deming *et al.* schufen Grundlagen auf diesem Gebiet mit dem Gebrauch von Poly(Cystein-*b*-Lysin)copeptiden^[69], die die Funktionen von Silikateinen nachahmen. Dabei organisiert sich das Blockcopeptid in strukturierte Aggregate und katalysiert die Bildung von definierten Silikamorphologien.

2.3. *Biologische Makromoleküle*

Biologische Organisationsprinzipien bieten die Möglichkeit eine enorme strukturelle Vielfalt aus einfachen Grundbausteinen aufzubauen. Besonders Proteine und Polypeptide zeichnen sich durch ein breites Spektrum an Eigenschaften und Funktionen aus. Molekulare Grundlage hierfür ist der monodisperse Aufbau der Makromoleküle, der eine präzise Kontrolle über das Aggregationsverhalten erlaubt. Entlang der Peptidkette werden über die Aminosäureseitenketten spezifische Wechselwirkungspunkte, durch Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe, ionische und Coulomb-Wechselwirkungen, programmiert. Das Zusammenwirken dieser weichen Wechselwirkungen ermöglicht die Übersetzung des linearen Aminosäurecodes in ein supramolekulares Ensemble mit hochfunktionellen Oberflächen.

2.3.1. **Peptidsekundärstruktur – das β -Faltblattmotiv**

Die primäre Organisation von Peptiden wird durch Ausbildung eines Grundstrukturmotivs, der Sekundärstruktur, ausgelöst. Es können drei Hauptmotive, die α -Helix, das β -Faltblatt sowie verschiedene β -Schleifen unterschieden werden. In biologischen Fasern dominieren sowohl helikale Anordnungen (Collagen, Keratin) als auch β -Faltblattstrukturen (Spinnenseide). Die Spinnenseidenstruktur verdeutlicht anschaulich, dass das β -Faltblattmotiv gerade für materialwissenschaftliche Anwendungen interessante Eigenschaften aufweist^[6]. In Spinnenseiden wurden semikristalline Bereiche mit hohen β -Faltblattanteilen (alaninreiche Abschnitte) nachgewiesen, die in amorphe Bereiche (glycinreiche Abschnitte) eingebettet sind. Diese Anordnung aus kristallinen und amorphen Bereichen verleiht der Spinnenseide eine hohe Zugkraft bei gleichzeitig großer Dehnbarkeit. Hierbei sind die β -Faltblattstrukturen für die Festigkeit, die ungeordneten Bereiche für Flexibilität und Dehnbarkeit verantwortlich. Ein analoges Prinzip wird bei der technischen Herstellung physikalisch vernetzter, thermoplastischer Elastomere verwendet. Die Verarbeitung des Materials hat in beiden Systemen einen großen Einfluss auf die Materialeigenschaften. Spinnenseide wird als flüssigkristalline, wässrige Lösung unter milden Bedingungen versponnen^[70]. Die Proteinmoleküle werden in der flüssigkristallinen Phase vororientiert und so ausgerichtet, dass die β -Faltblattbereiche parallel zur Richtung des Fadens angeordnet sind. Dies verhindert die unkontrollierte Reorientierung der Moleküle, verursacht wenige Defektstellen und ermöglicht einen Spinnprozess, der mit wenig Kraftaufwand betrieben werden kann.

Im Rahmen der Arbeit werden zur gezielten Organisation von Polymer-Peptid-Konjugaten β -Faltblattmotive eingesetzt. Daher sollen im Folgenden kurz die molekularen Grundlagen dieser Sekundärstruktur erläutert werden. Die genaue Strukturaufklärung des β -Faltblattmotivs gelang Pauling und Corey 1951 mittels Röntgenstreuungsexperimenten an kristallinen Proteinen^[71]. Ein wesentliches Merkmal von Peptidsträngen ist die eingeschränkte Rotation um die Amidbindungen, da diese partiellen ($\sim 40\%$) Doppelbindungscharakter besitzen (Abb. 2.6 a). Aminosäurereste in antiparallelen β -Faltblattmotiven nehmen zwischen den starren Peptidbindungseinheiten Torsionswinkel von $\psi = -139^\circ$ und $\phi = 135^\circ$ ein. Dies resultiert in einer zickzack-artigen Anordnung eines β -Stranges, in der die Seitenketten der Aminosäuren jeweils alternierend oberhalb und unterhalb der Faltblattebene (Abb. 2.6 b) liegen^[72].

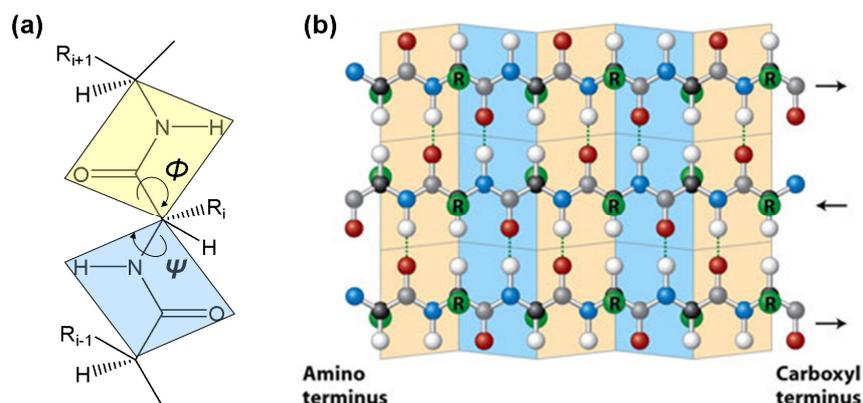


Abb. 2.6. Anordnung der Aminosäuren in einem β -Strang, mit Verdeutlichung der starren Amidbindung und den um die Torsionswinkel ψ und ϕ frei drehbaren Bindungen^[73] (a), Aufbau eines antiparallelen β -Faltblattes durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei β -Strängen (b); entnommen aus Lit.^[74].

Mehrere β -Stränge lagern sich durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den amidischen Carbonylgruppen (H-Akzeptor) und Aminogruppen (H-Donor) zu einem stabilen β -Faltblatt zusammen (Abb. 2.6 b). Die Wechselwirkungen können dabei intermolekular oder bei rückgefalteten Strängen intramolekular stattfinden. Je nach Aminosäuresequenz erfolgt die Anordnung der β -Stränge dabei parallel oder antiparallel bezüglich der Amin- und Carboxytermini, wobei antiparallele β -Faltblattstrukturen als stabiler gelten. Mit einer Bindungsenergie von 20 kJ/mol ist eine einzelne Wasserstoffbrückenbindung im Vergleich zu kovalenten Bindungen (200-400 kJ/mol) relativ schwach.

Die Stabilität der gebildeten Sekundärstrukturen wird durch das Vorhandensein vieler Wasserstoffbrücken gewährleistet. Diese kooperativen Effekte werden häufig in supramolekularen Ensembles genutzt, da sie eine hohe strukturelle Stabilität mit flexibler Selbstorganisation und selbstkontrolliertem Aufbau verbinden.

In α -Helices und β -Faltblättern treten einige Aminosäuren häufiger auf als andere^[75]. Dies hängt mit den elektronischen und sterischen Eigenschaften der Seitenketten zusammen. Sterisch anspruchsvolle Reste, z.B. verzweigte Kohlenwasserstoffe wie Valin, tragen zur Streckung des Peptidstranges bei und begünstigen β -Faltblattmotive. Vor allem beeinflusst aber die Periodizität unpolarer und polarer Aminosäuren in der Kette die gebildete Sekundärstruktur^[76]. Bei einer alternierend auftretenden Reihenfolge aus unpolaren und polaren Seitenketten steigt das Vermögen, β -Faltblattstrukturen zu bilden, erheblich^[75]. Auf diese Weise entstehen Faltblattmotive mit einer polaren und einer unpolaren Seite (faziale Amphiphilie).

Dem ersten Aggregationsschritt folgen abhängig von der Konzentration der β -Faltblatt bildenden Peptide weitere Assoziationsprozesse. Agelli *et al.* ^[9] schlagen in diesem Zusammenhang den folgenden in Abbildung 2.7. veranschaulichten Mechanismus vor.

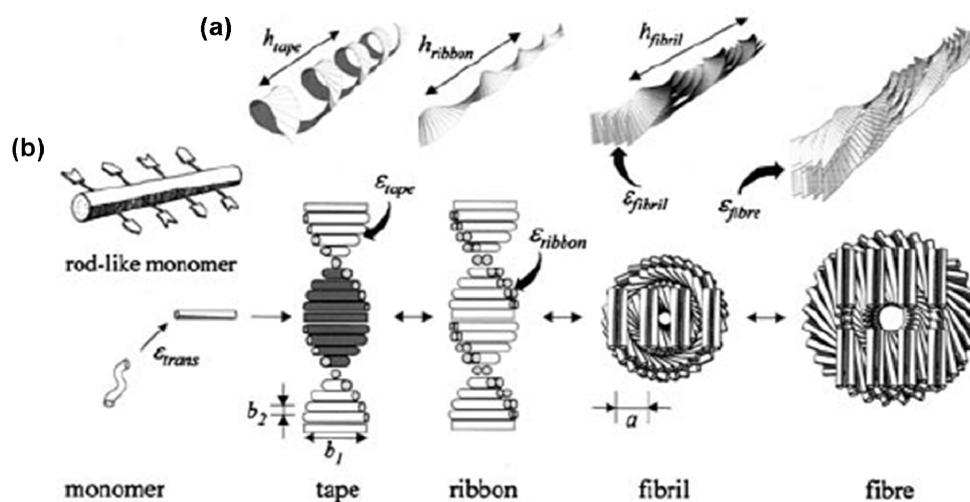


Abb. 2.7. Grafische Darstellung des Aggregationsverhaltens von β -Faltblattstrukturen unter Ausbildung definierter Peptidfibrillen und –fasern; entnommen aus Lit.^[9].

Über die chemisch unterschiedlichen Seiten eines β -Faltblatt-Tapes kann es zu attraktiven Wechselwirkungen zwischen zwei Tapes und zur Bildung von Doppel-Tapes (Bändern) kommen (Abb. 2.7 b, tape \rightarrow ribbon). Eine weitere Stapelung der Bänder führt über Fibrillen zu Peptidfasern (Abb. 2.7 b, ribbon \rightarrow fibril \rightarrow fibre).

Dabei werden Fibrillen und Fasern mit definierten Breiten gebildet. Die Hauptursache für diesen Umstand liegt in der Verdrillung der β -Tapes (Abb. 2.7 a). Diese verfügen über einen Twist mit Winkeln zwischen 0 und 30°. Durch die Verdrillung muss bei der Aggregation elastische Energie aufgebracht werden, da einzelne Bänder ihren Verdrillungswinkel an den ihrer Nachbarn anpassen müssen. Diese Energie sollte durch die anziehenden Wechselwirkungen kompensiert werden. Mit größer werdenden Stapeln an β -Tapes nimmt die elastische Energie zu. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen attraktiven, intermolekularen Band-Wechselwirkungen und der zur Faserbildung aufzubringenden elastischen Energie ein, welches die Faserdurchmesser bestimmt.

2.3.2. Peptidsynthese

Um die dargelegten Strukturbildungs- und Faltungseigenschaften von Peptiden und Proteinen zu analysieren, war es wichtig sich effiziente Syntheserouten für Peptide zueigen zu machen. Auf dem Gebiet der Peptidsynthese wurden in den letzten Jahrzehnten viele Errungenschaften erzielt, so dass heutzutage effektive Syntheserouten zugänglich sind. Diese Synthesestrategien sollen aufgezeigt werden, da sie auf die Synthese der in der Arbeit verwendeten Polymer-Peptid-Konjugate übertragen wurden.

Der Grundstein für die Peptidsynthese wurde 1901 mit der Synthese eines Dipeptides durch Emil Fischer gelegt^[77]. Mit Einführung der ersten temporären Schutzgruppe, der Benzyloxycarbonylgruppe für Aminofunktionen, konnten bis Anfang der 60-iger Jahre zahlreiche kleine Peptide, wie Glutathion und Carnosin, erfolgreich synthetisiert werden. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von geschützten Peptiden in organischen und wässrigen Lösungsmitteln war die Synthese langkettiger Peptide schwierig.

Den Durchbruch schaffte 1963 R.B. Merrifield mit der Einführung der festphasengebundenen Synthese^[78]. Im Gegensatz zur Peptidsynthese in Lösung, bei der das entstehende Peptid nach jedem Schritt isoliert und gereinigt werden muss, ist das Peptid bei der Festphasensynthese an einen unlöslichen, quellbaren, polymeren Träger (Harz) gebunden. Nacheinander werden sich wiederholende Reaktionsabfolgen aus Entschützung, Aktivierung und Kupplung durchgeführt.

Zu Beginn der Synthese wird die erste Aminosäure kovalent an eine reversibel spaltbare Ankergruppe (Linker) eines Polystyrolharzes gebunden. Dies kann in Abhängigkeit vom eingesetzten Linker spezielle Reaktionsbedingungen erfordern.

In der Regel wird die Carboxylfunktion der *N*-geschützten-Aminosäure *in-situ* durch Zugabe eines Aktivierungsreagenzes (z.B. PyBOP) in einen Aktivester überführt. Die Kupplungszeiten variieren zwischen wenigen Minuten und einigen Stunden. Nach Beendigung der Kupplungszeit kann der vollständige Reaktionsumsatz durch eine Farbreaktion auf freie Amine (Kaiser-Test) überprüft werden. Um trotz Farbdetektion Fehlsequenzen durch unvollständige Kupplung einzelner Aminosäuren zu vermeiden, werden nach der Kupplung eventuell vorhandene Aminogruppen acetyliert (gecappt), so dass ein Weiterwachsen dieses Stranges verhindert wird.

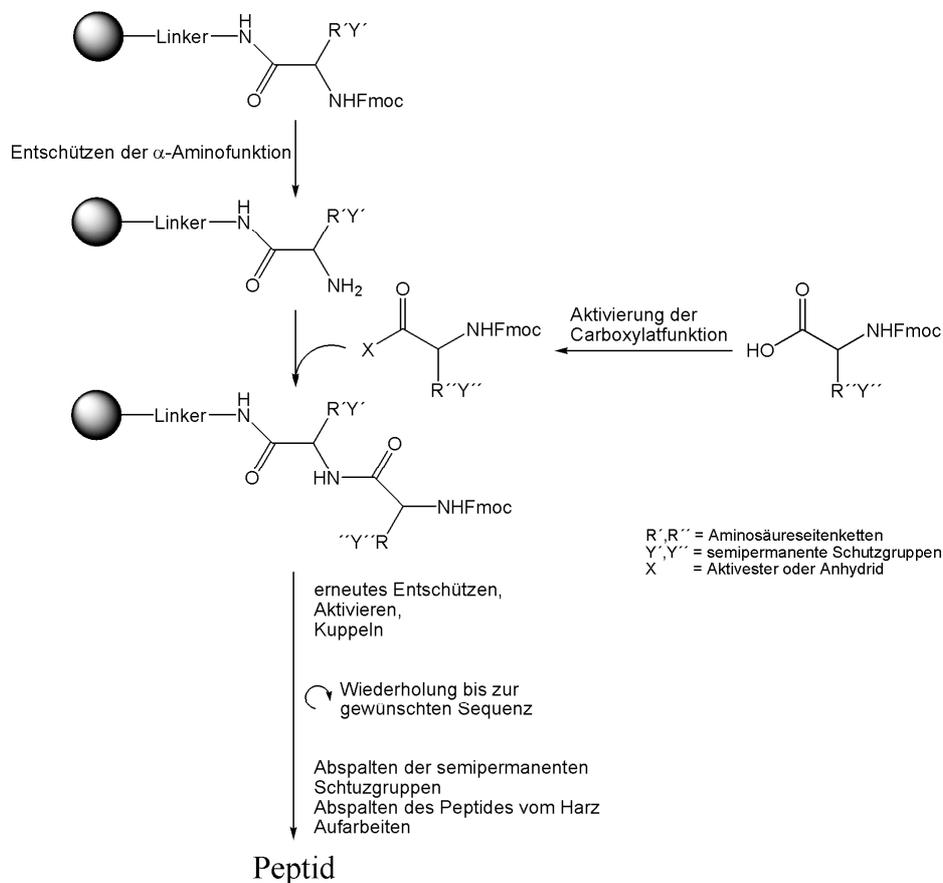


Abb. 2.8. Sequenzielle Synthese eines Peptides nach der Standard Fmoc- Festphasensynthese^[79].

Nach erfolgreicher Kupplung können überschüssige Reagenzien durch einen Waschschrift und Filtration leicht separiert werden. Anschließend wird durch Zugabe von Piperidin die basenlabile Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppe abgespalten. Das sich bildende Dibenzofulven-Piperidin-Addukt kann durch UV-Absorption bei 254 nm detektiert und quantifiziert werden.

Nach erneutem Waschen wird die zweite Aminosäure aktiviert und an die nun ungeschützte Aminogruppe der harzgebundenen ersten Aminosäure gekuppelt. In iterativen Schritten können so sequenziell Peptide mit bis zu 100 Aminosäuren vom C- zum N-Terminus aufgebaut werden.

Schutzgruppenstrategien

Aminosäuren als Monomerbausteine sind mit α -Carboxylat- und α -Aminofunktion mindestens bifunktionale Moleküle und tragen meist weitere funktionelle Seitenketten. Eine selektive, sequenzielle Peptidsynthese unter Vermeidung von Polymerisationsreaktionen ist daher nur mit einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie^[80] möglich. Während der Kondensation der Aminosäure an die Festphase ist die α -Aminofunktion der zu kuppelnden Aminosäure geschützt. Als temporäre Schutzgruppen konnten sich *tert*-Butyloxycarbonyl(Boc) und 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc) etablieren. Diese temporären Schutzgruppen werden nach der Kupplung und den Waschschrritten entfernt, um eine freie N-terminale Aminofunktion am Harz zu erzeugen und die Kupplung der nächsten N-geschützten Aminosäure zu ermöglichen. Bei Verwendung der Boc-Strategie^[81] können die Seitenkettenreste der Aminosäuren durch die Benzyloxycarbonyl-(Z)-Schutzgruppe während der gesamten Synthese geschützt werden. Das Prinzip der Schutzgruppenabspaltung basiert hierbei auf der unterschiedlichen Säurelabilität beider Gruppen. Es muss daher gewährleistet werden, dass die semipermanenten Seitenkettenschutzgruppen bis zum Ende der Synthese erhalten bleiben. Sie müssen während der Kupplungs- und der Abspaltreaktionen der α -Aminschutzgruppe stabil sein, um Nebenreaktionen zu vermeiden. Die zweite Schutzgruppenstrategie, die 1970 von L.A. Carpino und Y. Han eingeführt wurde, nutzt die Fmoc-Schutzgruppe^[82]. In der modernen Peptidsynthese wird, vor allem bei automatisierten Synthesen, meist auf die Fmoc-Strategie zurückgegriffen. Als orthogonale Seitenkettenschutzgruppen werden in diesem Fall säurelabile Schutzgruppen eingesetzt. Dafür bieten sich für Carboxylatgruppen (Asparaginsäure, Glutaminsäure) *tert*-Butylester, für Hydroxylgruppen (Serin, Threonin, Tyrosin) *tert*-Butylether und für Amine (Lysin, Histidin) die Boc- oder die Tritylschutzgruppe an.

Aktivierung der Carboxylgruppe

Die Peptidbindungsknüpfungen sollten mit Ausbeuten >99% verlaufen. Da sich Synthesefehler durch unvollständige Kupplungen bei solchen mehrstufigen Synthesen aufaddieren, würde die Ausbeute des gewünschten Peptides drastisch gesenkt. Bei Ausbeuten von 95% pro Einzelkupplung würde nach zehn Reaktionsschritten die Gesamtausbeute eines Decapeptides bei nur 60% liegen. Außerdem lassen sich vorhandene Nebenprodukte nur schwer abtrennen. Fehlt eine Aminosäure in einer längeren Kette, beeinflusst dies die Masse und die Polarität bzw. das Löslichkeitsverhalten nur unwesentlich, die Faltungseigenschaften des Peptides können aber dramatisch gestört werden.

Aus diesem Grund wird häufig mit großen Überschüssen an Aminosäure gearbeitet und die Carboxylatgruppe durch Überführung in symmetrische Anhydride oder Aktivester aktiviert, um eine quantitative Reaktion zu erreichen^[79]. Zu Beginn der Entwicklung der Peptidsynthese wurde zur Aktivierung der Carboxylatfunktion Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (Abb. 2.9) eingesetzt. Dies brachte aber einige Nachteile mit sich: so ist z.B. die Reaktivität so hoch, dass eine Racemisierung der Aminosäure auftreten kann. Für spezielle Kupplungen wird weiterhin die Aktivierung über modifizierte Carbodiimide (DIC, EDAC) oder Pentafluorphenylester verwendet.

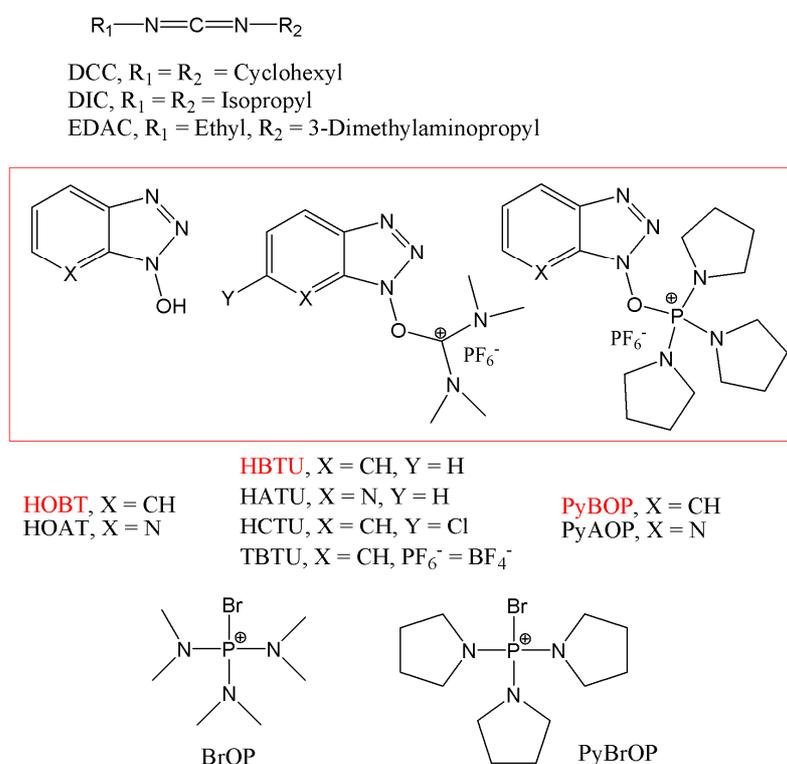


Abb. 2.9. Gängige Aktivierungsreagenzien für die Peptidsynthese, die rot hervorgehobenen Verbindungen HOBT, HBTU und PyBOP werden am häufigsten eingesetzt.

Das Hauptaugenmerk liegt aber auf der Gruppe der sogenannten Phosphonium-Reagenzien (Abb. 2.9). Dazu gehört das sehr gebräuchliche Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP). PyBOP reagiert nicht mit ungeschützten α -Aminogruppen und kann in großem Überschuss (üblich sind bis zu 10 Äq.) eingesetzt werden.

Eine weitere wichtige Gruppe stellen Guanidinium- und Uronium-Reagenzien dar (Abb. 2.9). In der automatisierten festphasengebundenen Synthese wird meist 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) verwendet^[83]. Dies sollte sich immer in leichtem Unterschuss zur Fmoc-Aminosäure im Reaktionsgemisch befinden, da Terminierungsreaktionen mit dem Aminoende der Peptidkette eintreten können. Sowohl bei PyBOP- als auch bei HBTU-Kupplungen wird HOBT^[84] zur Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit und Verringerung der Racemisierungsnebenreaktion beigelegt. Des Weiterem wird dem Reaktionsgemisch als nicht nukleophile Base Diisopropylethylamin (DIPEA) zur Aktivierung der Carboxylfunktion hinzugefügt. Die Entwicklung auf dem Gebiet der Aktivierungsreagenzien geht kontinuierlich weiter, so dass heute eine Vielzahl an Phosphoniumsalzen, darunter PyAOP, PyBrOP, BrOP, sowie Guanidinium-/Uroniumsalzen wie HATU, HCTU, TBTU in Peptidsynthesen genutzt werden. Für routinemäßige, automatisierte Synthesen werden meist kostengünstigere Standardverfahren verwendet, während bei schwierigen, langen Sequenzen auch auf die teureren, aber effektiveren Aktivierungsmittel zurückgegriffen wird.

Polymere Träger

Die Festphasen (Harze) sollten für den Einsatz in der Peptidsynthese einige wichtige Kriterien erfüllen: Unlöslichkeit in den verwendeten Lösungsmitteln, Resistenz gegen Zersetzung und mechanische Stabilität sind Grundvoraussetzungen. Außerdem ist eine gute Quellbarkeit wünschenswert, da eine schnelle Diffusion der Reagenzien zum Reaktionszentrum begünstigt wird. In der Regel werden Polystyrol-Mikrogele^[78] eingesetzt, die einen Vernetzungsgrad von ~1% mit m-Divinylbenzol (DVB) aufweisen. Die Funktionalisierung erfolgt vorwiegend über eine Chloromethylierung. Zwischen der ersten gekuppelten Aminosäure und dem polymeren Träger wird ein Linkermolekül eingeführt. An dieses ist die wachsende Peptidkette während der sequenziellen Synthese kovalent gebunden. Das Linkermolekül ermöglicht nicht nur den notwendigen Abstand des Peptides vom polymeren Träger, sondern auch die Freisetzung des Peptides nach beendeter Synthese durch eine selektive Abspaltung.

Verschiedene Linkermoleküle erlauben spezifische Abspaltungsbedingungen und die Variation der C-terminalen Endgruppe des Peptides. Im Rahmen der Fmoc-Synthesestrategie werden bevorzugt Wang-, Rink-Amid- und Chlorotrityl-Harze verwendet. Wang- sowie Trityl-Linker erlauben die Synthese von Peptiden mit C-terminalen Carbonsäurefunktionalitäten, während die Rink-Amid-Linker die Darstellung C-terminaler Amide erlauben. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgt meist unter sauren Bedingungen mit Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan. Dabei findet gleichzeitig die Entschützung aller Seitenkettenschutzgruppen, die ebenfalls säurelabil sind, statt. Es besteht weiterhin die Möglichkeit das Peptid mit allen semipermanenten Seitenkettenschutzgruppen vollgeschützt zu isolieren. Hierbei können säurelabile Ankergruppen wie der 2-Chlorotrityl-Linker, das photochemisch spaltbare Nitrobenzyl-Linkersystem oder der reaktiv spaltbare Allyl-Linker eingesetzt werden. Vollgeschützte Peptide können z.B. problemlos in Fragmentkupplungsreaktionen verwendet werden.

Für die nachfolgend beschriebenen PEO-Peptid-Konjugate bietet sich ein einfacher Zugang über einen Syntheseansatz mit Tentagel[®] PAP-Harzen an. Diese mit PEO vorfunktionalisierten Harze erlauben den direkten Zugang zu PEO-Peptid-Konjugaten, da nach der Synthese Peptid und kovalent gebundene PEO-Kette zusammen vom Harz abgespalten werden.

Diese effektiven Peptidsynthesestrategien erlauben eine absolute Sequenzkontrolle und ermöglichen die Darstellung einer Vielzahl von Peptiden und Proteinen für die Strukturbestätigung natürlicher Proteine, als bioaktive Wirkstoffe, zur Herstellung von Peptidpharmaka und Anwendungen in der Impfstoffentwicklung.

2.4. Polymer-Peptid-Konjugate

Von den einfachen biologischen Konzepten inspiriert wurde in den letzten Jahren erfolgreich versucht, die naturbedingten Organisationsprinzipien auf synthetische Polymere zu übertragen. Dafür wurden sequenzdefinierte Peptidsegmente mit Polymerblöcken konjugiert, um die selbstorganisierenden Eigenschaften der Peptide zum Aufbau strukturierter Polymeraggregate auszunutzen^[8].

In den meisten Fällen verfügen synthetische Blockcopolymere über keine spezifischen Wechselwirkungen, die Aggregationsprozesse unterstützen. Die Strukturbildung wird von Block-Block-Wechselwirkungen ausgelöst, die auf der selektiven Löslichkeit der Blöcke in bestimmten Lösungsmitteln beruhen^[85, 86].

Im kommenden Abschnitt soll auf Konjugate eingegangen werden, in denen β -Faltblatt bildende Peptide mit synthetischen Polymeren vereint wurden und deren supramolekulare Aggregation allein auf spezifische Wechselwirkungen zwischen den Peptidsträngen zurückzuführen ist. Das Potenzial peptidgelenkter Organisation durch das β -Faltblattmotiv wurde intensiv untersucht, weil der Zugang zu anisotropen, fibrillären oder faserartigen Nanostrukturen möglich wird^[87].

Nanofaserelemente sind wie bereits beschrieben die Grundbausteine in vielen natürlichen Konstruktionsmaterialien. Auch synthetische Nanofasern bieten sich als zugfesteste Komponenten in neuartigen Kompositmaterialien^[88] an und könnten des Weiteren als leitende Elemente in der Mikroelektronik oder für medizinische Anwendungen eingesetzt werden^[89].

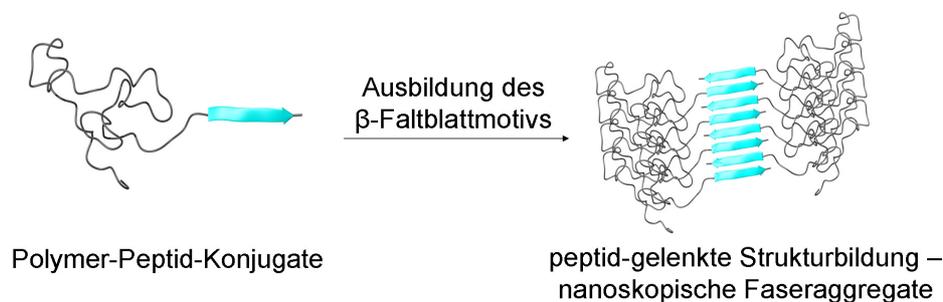


Abb. 2.10. Grundprinzip der Organisation β -Faltblatt bildender Polymer-Peptid-Konjugate in bandartige Aggregate.

Für die Darstellung von Polymer-Peptid-Konjugaten wurden neue Synthesestrategien entwickelt, die eine selektive Anbindung des Peptidblockes an die Polymerkette gewährleisten^[90]. Es wird vornehmlich zwischen Polymerisations- und Kupplungsansätzen unterschieden. Die Polymerisationsstrategie umfasst die Synthese des Polymerblocks in Gegenwart eines Peptidblocks. Nach dem Aufbau des Peptidsegments wird dieses z.B. mit einem Initiator oder einem Kettenübertragungsreagenz versehen. Die resultierenden Peptidmakroinitiatoren oder -makrotransferreagenzien sind mit allen drei Varianten von kontrollierten, radikalischen Polymerisationen (ATRP^[91, 92], RAFT^[93], NMP^[94]) kompatibel. Hierbei erfolgt in Lösung der schrittweise Aufbau des Polymers am Peptidblock. Bei den Kupplungsstrategien werden beide Blöcke durch geeignete Techniken separat synthetisiert und analysiert. Beide Blöcke müssen mit komplementären Endgruppenfunktionalitäten versehen werden, die anschließend eine spezifische Kupplungsreaktion erlauben^[95, 96].

Erste Arbeiten zur Anbindung von β -Faltblattpeptiden an Polyethylenoxid-(PEO)-Ketten wurden von Lynn *et al.*^[97, 98] berichtet (Abb. 2.11 a). Es wurde eine Peptidsequenz aus den 26 zentralen Aminosäuren des β -Amyloidpeptides, welches im Zusammenhang mit Alzheimer untersucht wird, verwendet. Das PEO-Peptid-Konjugat aggregierte zu kurzen, löslichen Fasern, deren Bildung durch Konzentration, Ionenstärke und pH-Wert beeinflusst werden konnte. Die in Faserrichtung wachsenden β -Faltblätter verdrillen sich und bilden Stapel mit bis zu sechs Schichten aus, die von den PEO-Ketten umgeben sind.

Weitere Konjugate aus einer amphiphilen β -Sequenz und PEO wurden von der Arbeitsgruppe um Klok *et al.*^[99, 100] synthetisiert. AB-Diblock- und ABA-Triblockcopolymer (Abb. 2.11 b) (A = PEO, B = β -Peptid) bilden lamellare Überstrukturen, in denen sich PEO-Schichten mit antiparallelen β -Faltblattbereichen abwechseln.

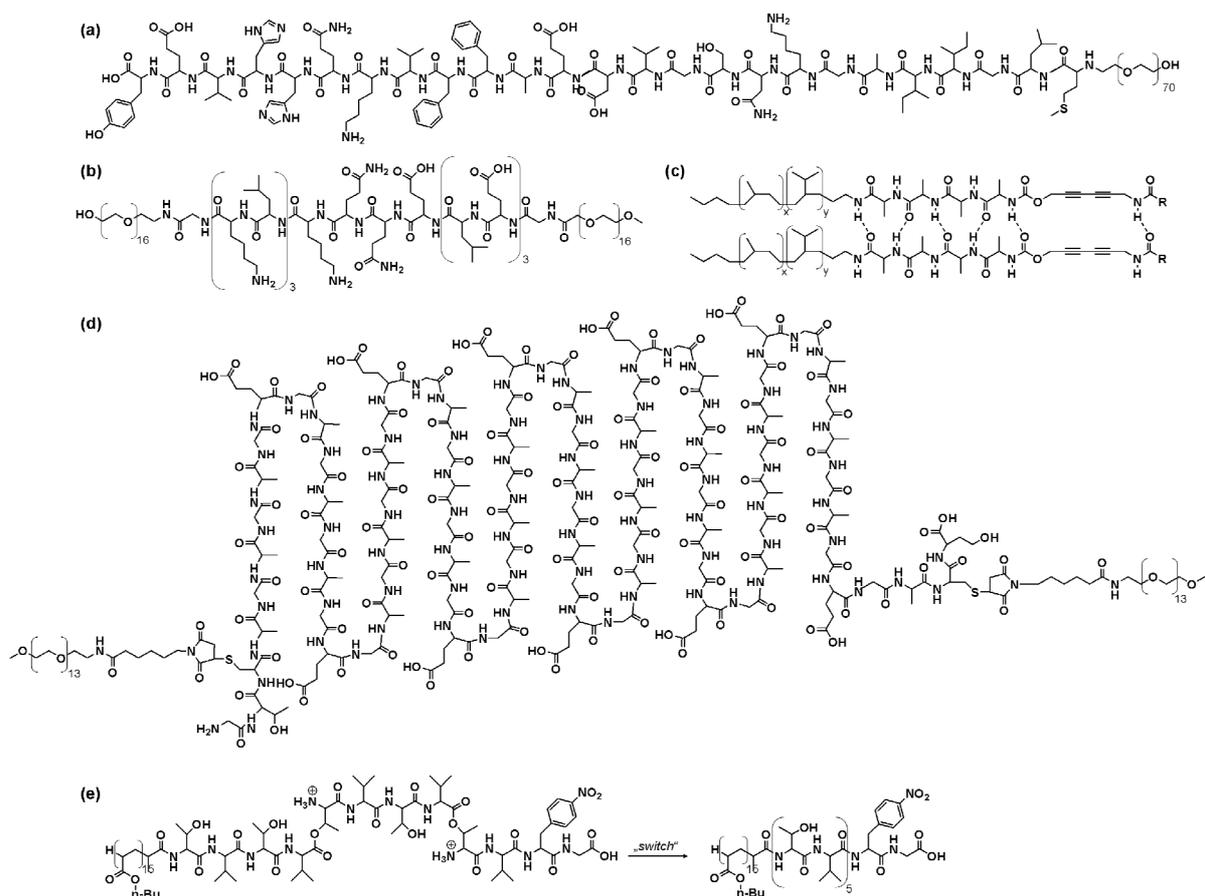


Abb. 2.11. Übersicht über einige der bisher synthetisierten Polymer-Peptid-Konjugate, welche die Variationsvielfalt dieses Strukturbildungsansatzes verdeutlicht; entnommen aus Lit.^[98, 101-104]

ABA-Triblockcopolymeren wurden ebenfalls von van Hest *et al.*^[102] vorgestellt (Abb. 2.11 d). Hierfür wurden längere Peptidsequenzen $([\text{Ala-Gly}]_3\text{-Glu-Gly})_n$ ($n = 10, 20$) gewählt, die dem Aufbau von Spinnenseiden nachempfunden wurden. *N*- und *C*-Terminus wurden mit Cysteinresten versehen, wodurch die Anbindung von maleinsäureimidfunktionalisierten PEO möglich war. Auch diese Konjugate erzeugen Fasern mit mehreren Mikrometern Länge. Die antiparallelen β -Faltblattstrukturen bilden sich intramolekular aus, so dass die Wasserstoffbrückenbindungen senkrecht zur Faserrichtung liegen. Unter Verwendung dieser Konjugatmoleküle findet das Längenwachstum der Fasern durch eine Stapelung der β -Faltblätter statt.

Bei allen Systemen sind Peptidsequenzen mit einer hohen Tendenz zur Bildung stabiler β -Faltblattstrukturen notwendig. Die Handhabung, Synthese und Analyse vor allem längerer Peptidstränge ist allerdings mit Schwierigkeiten verbunden. Häufig kommt es schon während der Synthese an der Festphase zu irreversiblen Aggregationen, was unvollständige Kupplungen und damit Fehlsequenzen verursachen kann. Kürzlich wurde zur Vermeidung dieses Problems eine neuartige Synthesestrategie vorgeschlagen^[105]. Indem gezielt Defektstellen in den Peptidstrang eingebaut werden, wird die gestreckte β -Strang Anordnung gestört. Eine Möglichkeit hierfür sind Verknüpfungen innerhalb der Kette durch *O*-Acylierung von Threoninresten. Mit Erhöhung des pH-Wertes wird ein intramolekularer *O-N*-Acytransfer ausgelöst, der das native Peptidrückgrat wiederherstellt.

Diese „switch“-Segmente können gezielt zur Mikrostrukturbildung herangezogen werden. Börner *et al.* synthetisierten hochgestörte PEO-Peptid-Konjugate, deren Peptidsequenz fünf Wiederholungseinheiten Valin-Threonin mit vier integrierten „switch“-Defekten beinhaltet^[106]. Eine gezielte Anschaltung der „switch“-Segmente initiiert die Aggregationstendenz der Peptidsegmente, so dass es zur Bildung der β -Faltblatt Sekundärstruktur kommt. Die gefundenen Bandstrukturen hatten eine Länge von mehreren Millimetern, Breiten von 2 μm und eine Höhe von ~ 50 nm. Die Dimensionen der Mikrobänder legen hierarchische Selbstorganisationsprozesse nahe, da sie nicht mehr direkt mit den molekularen Dimensionen der Konjugate korreliert werden können. In darauf folgenden Arbeiten^[104] wurden Konjugate mit ähnlicher $(\text{VT})_5$ -Peptidsequenz und einem Poly-*n*-Butylacrylatblock dargestellt (Abb. 2.11 e). Damit wird der Ansatz vom wässrigen Medium auf organische Lösungsmittel übertragen. Das PBA-Peptid-Konjugat bildet nach der Anschaltung und Erhöhung der Aggregationstendenz interessante, linksgängig helikal verdrillte Bänder aus β -Faltblättern.

Polymer-Peptid-Konjugate wurden von der Arbeitsgruppe um Frauenrath *et al.* ^[107] genutzt, um Diacetyleneinheiten für eine photochemische Polymerisation auszurichten (Abb. 2.11 c). Der organisierende Peptidblock ist in diesem Fall eine Tetra-Alanin-Einheit, die mit einer kurzen hydrierten Polyisoprenkette und den Diacetyleneinheiten versehen ist. Es wurden in Abhängigkeit von einer weiteren *N*-terminalen Acetamidgruppe parallele und antiparallele Faltblattstrukturen beobachtet. Zwei Bänder aus parallelen β -Faltblattstrukturen bilden röhrenartige Doppelhelices mit einheitlichen Breiten von ~ 5 nm und Längen von mehreren Mikrometern ^[108].

Zusammenfassend kann bemerkt werden, dass alle Konjugate ein ähnliches Aggregationsverhalten zeigen wie native Peptide. Es entstehen meist Bänder durch Organisation der β -Faltblatt Peptidblöcke, die sich durch Verdrillung oder Stapelung stabilisieren. Dabei wird die laterale Aggregation der β -Faltblattstrukturen durch den Polymerblock unterdrückt. Somit werden in vielen Fällen nanoskopische Faseraggregate beobachtet, deren Breite mit den Dimensionen des Konjugates korreliert ist ^[8]. Es fehlen aber bislang noch verallgemeinerbare Methoden das Längenwachstum der Fasern zu steuern.

2.5. *Synthese und Strukturbildung vororganisierter PEO-Peptid(VT)-Konjugate*

Trotz des Einsatzes effizienter Strategien und automatisierter Syntheseroboter bleibt die Peptidsynthese herausfordernd und relativ teuer. In Hinblick auf industrielle Anwendungen von Polymer-Peptid-Konjugaten in oder als Materialien sollte daher der peptidische Anteil so gering wie möglich gehalten werden. Kürzlich konnte an Poly-*n*-Butylacrylat-Peptid-Konjugaten gezeigt werden, dass eine Induktion und Kontrolle der Strukturbildung schon bei einem Peptidanteil von 3.5 Gew.-% im Konjugat zu beobachten ist ^[109]. Dafür müssen die Peptidsegmente eine hohe Tendenz zur Ausbildung stabiler β -Faltblattstrukturen besitzen. Die Vororganisation der Peptidketten in einer optimalen Geometrie schränkt deren konformative Freiheit ein und erhöht aus entropischen Gründen die Aggregationstendenz. Somit können auch kurze Peptidstränge eingesetzt werden, die einfacher und schneller herzustellen sind. Kelly *et al.* ^[110] führten hierzu Arbeiten über templatvororganisierte Oligopeptide durch. Als Templatmolekül wurde ein substituiertes Dibenzofuran eingesetzt, welches die Geometrie eines β -Turns nachempfunden und die angebondenen Peptidketten für die Bildung eines antiparallelen β -Faltblattmotivs ausrichtet. Dieses Konzept wurde in einer vorangegangenen Arbeit auf Polymer-Peptid-Konjugat-Systeme übertragen ^[11].

Das Dibenzofurantemplat wurde durch ein Carbazolderivat ersetzt, welches über das zentrale Stickstoffatom die Einführung einer Polymerkette ermöglicht. Diese templatvororganisierten Oligopeptidketten wurden hinsichtlich ihres Verhaltens als Organisationseinheiten in der Mikrostrukturkontrolle des Polymers (PEO) untersucht.

Im nächsten Abschnitt sollen die Ergebnisse dieser vorangestellten Arbeit^[10, 11] zusammengefasst und die Selbstorganisation des PEO-Peptid-Konjugates zu einheitlichen Nanobandstrukturen beschrieben werden.

Die Synthese des PEO-Peptid(VT)-Konjugates ist in Ref.^[11] ausführlich beschrieben und soll hier anhand von Abbildung 2.12. kurz dargestellt werden.

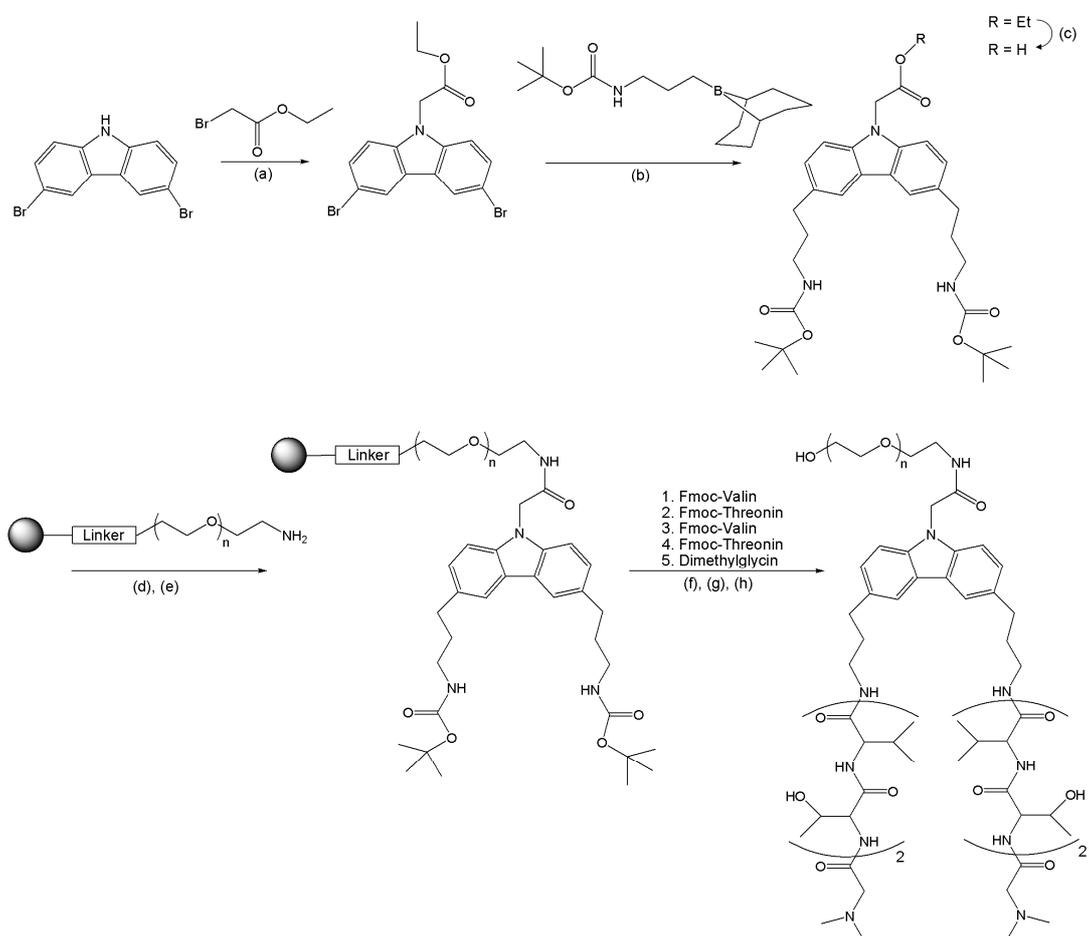


Abb. 2.12. Syntheschema des PEO-Peptid-Konjugates [(dmGly-Thr-Val-Thr-Val)₂NH-Templat-PEO₆₈] mit (a): K₂CO₃, DMF, 55 °C; (b): aq. KOH, Toluol, [Pd(PPh₃)₄], 110 °C, 22 h; (c): aq. KOH, THF, 60 °C, 23 h; (d): PyAOP, DIPEA, NMP, 4 h; (e): TFA/DCM (30 v/v%), 30 min; (f): HBTU, DIPEA, NMP, 2 h; Piperidin/NMP (20 v/v%); (g): PyBOP, DIPEA, DMF, 2 h; (h): TFA 99%, 1% TMSBr, 2–6 h.

Das Templatmolekül 3,6-Bis(3-[*N*-[*tert*-Butoxycarbonyl]-amino]propyl)-carbazol-9-essigsäure wurde ausgehend von 3,6-Dibrom-9H-Carbazol durchgeführt. Im ersten Reaktionsschritt (Abb. 2.12 a) wird 3,6-Dibrom-9H-Carbazol mit α -Brommethylacetat in einer nukleophilen Substitution umgesetzt. Der isolierte 3,6-Dibromcarbazol-9-essigsäure-ethylester wurde einer Suzuki-Miyaura Kreuzkupplungsreaktion mit hydroboriertem *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)allylamin unterzogen (Abb. 2.12 b). Es wurde der 3,6-Bis(3-[*N*-[*tert*-butoxycarbonyl]-amino]propyl)-carbazol-9-essigsäure-ethylester erhalten, dessen Estergruppe anschließend basisch hydrolysiert wurde (Abb. 2.12 c). Das Templatmolekül wurde aus der Synthese als Diaminosäure erhalten, die zwei Boc-geschützte Aminofunktionalitäten und eine ungeschützte Carboxylgruppe aufwies. In Analogie zu einer Boc-geschützten Aminosäure konnte das Templatmolekül an eine Festphase gekuppelt werden (Abb. 2.12 d). Als Festphase wurde ein TentaGel[®] PAP-Harz eingesetzt (siehe Kap. 2.3.2.). Nach Anbinden des Templates und Abspalten der Boc-Schutzgruppen (Abb. 2.12 e) wurde die Aminosäuresequenz nach Standard-Fmoc-Protokollen aufgebaut. Dies konnte automatisiert an einem ABI 433a Peptidsynthesizer durchgeführt werden (Abb. 2.12 f/g).

Die Primärstruktur der Oligopeptidketten besteht aus zwei Wiederholungseinheiten (Valin-Threonin)₂, die *N*-terminal mit *N,N*-Dimethylglycin abschließen. Diese alternierende Sequenz wurde gewählt, da (Val-Thr)_x-Segmente eine hohe β -Faltblattbildungstendenz aufweisen. Sterisch anspruchsvolle Reste und die alternierend hydrophob-hydrophile Sequenz tragen dazu bei (siehe Kap. 2.3.1.). Während in linearen Systemen fünf bis sechs Val-Thr-Wiederholungseinheiten nötig sind^[111], um stabile β -Faltblätter zu bilden, konnte die Sequenz in den vororganisierten Polymer-Peptid-Konjugaten auf zwei Wiederholungseinheiten verkürzt werden (Abb. 2.13 a). Die *N,N*-Dimethylglycin Endgruppen können je nach pH-Wert kationisch vorliegen. Dadurch ist eine Verbesserung der Löslichkeitseigenschaften in Wasser und eine Unterstützung der antiparallelen β -Faltblattbildung zu erwarten. Das komplette Polymer-Peptid-Konjugat wurde vom Harz abgespalten (Abb. 2.12 h) und in großer Reinheit erhalten.

Die Selbstorganisation des PEO-Peptid-Konjugates in einheitliche Nanobandstrukturen wurde durch einen gezielten Aggregationsprozess erreicht. Zuvor wurde eine sorgfältige Deaggregation durch Zusatz von TFA durchgeführt. Die Reaggregation wurde über einen langsamen Lösungsmittelaustausch von Methanol nach Wasser induziert, da die Aggregationstendenz der Peptidstränge mit steigendem Wassergehalt zunimmt. Dieser Prozess wurde mittels Circular dichroismus(CD)-Spektroskopie verfolgt.

Dabei wurde eine kontinuierliche Umwandlung der Oligopeptidketten von der statistischen Knäulstruktur zur β -Faltblattstruktur detektiert. Einhergehend mit der Ausbildung der β -Faltblätter konnte das Entstehen von langen, nanoskopischen Faseraggregaten (im weiteren Verlauf dieser Arbeit PEO-Peptid(VT)-Nanobänder genannt) beobachtet werden. Die resultierenden Nanobandstrukturen sind anisotrope, relativ steife Objekte mit einer Höhe von 1.4 ± 0.1 nm und einer polydispersen Längenverteilung, mit maximalen Längen von ~ 2 μ m. Die Breite der Strukturen wurde an parallel verlaufenden Fasern durch AFM- und TEM-Aufnahmen mit 13-17 nm bestimmt. Das Vorhandensein einer ausgedehnten β -Faltblattstruktur innerhalb der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder wurde IR-spektroskopisch und mittels Elektronenbeugung (SAED) nachgewiesen. Der auf den Untersuchungen basierte Aggregationsmechanismus ist in Abbildung 2.13. schematisch dargestellt.

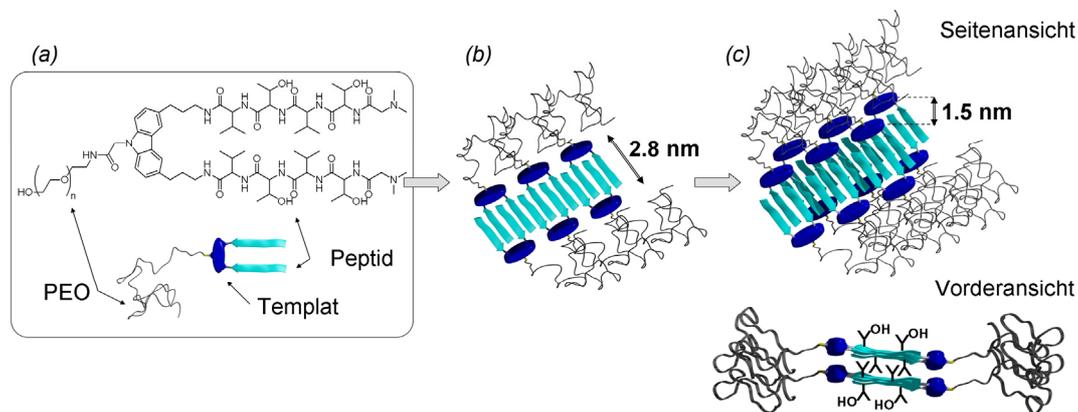


Abb. 2.13. Schematische Präsentation der PEO-Peptid-Konjugate (a) und das idealisierte Organisationsmodell der Konjugate in Nanobänder mit einem Peptidkern und einer PEO-Schale (einfache β -Faltblatt-Tapes (b) und doppelte, zusammengelagerte β -Faltblatt-Nanobänder (c)).

Mittels eines klammerartigen Ineinandergreifens der Peptidstränge bildet sich die antiparallele β -Faltblattstruktur aus. Vermutlich entstehen primär Dimere die in Tape-Strukturen aggregieren (Abb. 2.13 b). Die Anordnung der Peptidseitenketten senkrecht zur Ebene der Wasserstoffbrückenbindungen (siehe Abb. 2.6 b) und die alternierende Val-Thr-Sequenz sorgt dafür, dass sich auf einer Seite der β -Faltblatt-Tapes alle Valinreste und auf der anderen Seite alle Threoninreste befinden. Diese faziale Amphiphilie der β -Faltblatt-Tapes führt im vorliegenden wässrigen Medium entropiegetrieben (hydrophober Effekt) zu einer Zusammenlagerung zweier Strukturen zu einem doppelten β -Faltblatt-Tape (Band), was die unpolare Valinseite gegenüber dem polaren Lösungsmittel abschirmt (Abb. 2.13 c).

Durch die Bildung dieser Nanobandstruktur wird das Faseraggregat versteift und eine Verdrillung der β -Faltblattstruktur kann nicht beobachtet werden. Dies könnte eine mögliche Ursache für die Limitierung des Längenwachstums sein, da starre Strukturen nur begrenzt Verdrillungen tolerieren und mechanisch abgebaut werden. Die Abschirmung und Stabilisierung der β -Faltblatt Peptidbereiche durch die PEO-Ketten bewahrt die Bänder vor lateraler Aggregation (siehe Kap. 2.3.1., Abb. 2.7).

Der Aufbau der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder zeichnet sich durch eine Kern-Schale-Architektur aus, wobei der innere Peptidkern funktional ist und von der PEO-Hülle umgeben ist. Dies wurde durch unterschiedliche chemische und viskoelastische Eigenschaften von Kern und Schale bestätigt, die mit Hilfe von TEM (Abb. 2.14 b) und hochauflöser AFM (Abb. 2.14 a) nachgewiesen wurden.

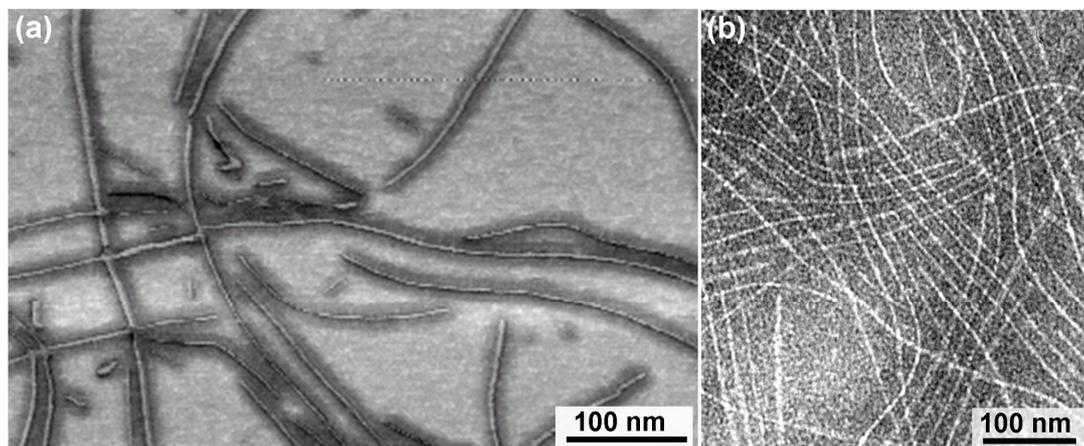


Abb. 2.14. Ausbildung von Nanobändern durch gezielte Aggregation der PEO-Peptid-Konjugate. Der β -Faltblatt Peptidkern und die Schale der PEO-Ketten sind durch unterschiedliche viskoelastische und chemische Eigenschaften gekennzeichnet (hochauflöste AFM-Aufnahme (a)); TEM-Aufnahme nach negativer Kontrastierung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder mit Uranylacetat (b)), entnommen aus Lit.^[11].

Das besondere Charakteristikum dieser Nanobandstruktur ist deren Funktionalität. So werden entlang des Peptidkerns auf der Ober- und Unterseite der Nanobänder funktionale Flächen erzeugt, die die Hydroxylgruppen der Threoninseitenketten und die kationischen tertiären Aminogruppen der *N,N*-Dimethylglycine präsentieren. Der Peptidkern kann genutzt werden, um präzise funktionelle Gruppen zu platzieren. Diese sollten zur Erzeugung sekundärer Wechselwirkungen zwischen den Nanobändern und zur Anordnung dieser in hierarchischen Strukturen führen.

3. Relevante Charakterisierungsmethoden

3.1. Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM)

Das Messprinzip der Rasterkraftmikroskopie beruht auf der Bestimmung von Kräften, die zwischen einer Sonde und der Probenoberfläche herrschen. 1986 entwickelten G. Binnig und H. Rohrer die Rasterkraftmikroskopie^[112] als Weiterentwicklung der Rastertunnelmikroskopie. Der große Vorteil der Rasterkraftmikroskopie ist, dass auch nichtleitende organische bzw. biologische Proben unverfälscht vermessen werden können, ohne diese mit leitfähigen Materialien bedampfen oder sie hochenergetischer Elektronenstrahlung aussetzen zu müssen. Bei der AFM rastert eine sehr feine Spitze, aufgehängt an einer mikroskopischen Blattfeder (Cantilever), die Oberfläche der Probe in sehr geringem Abstand entlang ihrer xy-Richtung in einem festgelegten Bereich ab. Die präzisen Bewegungen in alle drei Raumrichtungen werden dabei durch einen Piezo-Kristall gesteuert. So lassen sich Probe und Spitze mit einer Genauigkeit von bis zu 0,01 nm gegeneinander verschieben.

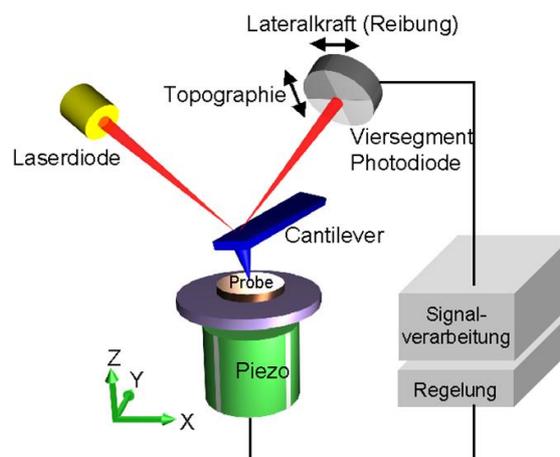


Abb. 3. 1. Schematische Darstellung des Aufbaus eines Rasterkraftmikroskops^[113].

Durch Höhenunterschiede auf der Probenträgeroberfläche wirken Kräfte auf die Spitze, was in einer Bewegung der Cantilever resultiert. Diese werden über eine positionssensitive Photodiode, die auf die Rückseite der Blattfeder fokussiert ist, detektiert. Auftretende Wechselwirkungen zwischen Atomen der Spitze und den Oberflächenatomen, lassen sich in Näherung durch ein Lennard-Jones-Potential beschreiben. Wird die Spitze der Oberfläche angenähert, erfährt sie abhängig vom Abstand r anfangs anziehende Kräfte (proportional zu r^{-6}) ausgelöst durch van-der-Waals-Wechselwirkungen. Bei weiterer Annäherung dominieren jedoch stark abstoßende Kräfte (proportional zu r^{-12}).

Für den Betrieb eines AFM sind verschiedene Messmodi entwickelt worden, die sich hinsichtlich des Abstandes zwischen Spitze und Probenoberfläche unterscheiden. Im Kontaktmodus (*contact mode*) wird die Spitze bis zum Kontakt (Kompression der Elektronenhüllen) mit der Oberfläche angenähert. Es wird dabei im Bereich der repulsiven Kräfte gemessen. Dadurch ist eine nahezu atomare Auflösung erreichbar. Nachteilig wirken sich die durch das Abrastern auftretenden Scherkräfte aus, die weiche Proben verändern bzw. zerstören können. Dieser Modus bietet andererseits die Möglichkeit Informationen über die Elastizität, Adhäsion und den Reibungswiderstand der Oberfläche erhalten zu können.

Um eine Zerstörung von weichen Proben durch die konstante Krafteinwirkung im Kontaktmodus zu vermeiden wird meist im *tapping mode* gemessen, der kontaktfreies Arbeiten erlaubt. Hierbei oszilliert die Spitze vertikal wenige Nanometer über der Oberfläche mit einer Resonanzfrequenz der Blattfeder zwischen 100-350 kHz. In dieser Entfernung wirken van-der-Waals-Kräfte auf die Spitze, die die ursprüngliche Amplitude der Schwingung verringern. Da die Schwingungsamplitude ein Maß für den Abstand der Spitze zur Oberfläche darstellt, lässt sich aus dieser Information ein Höhenprofil errechnen. Des Weiteren kann die Phasenverschiebung der Schwingung in Bildinformationen umgewandelt werden, was Aufschluss über die viskoelastischen Eigenschaften der Probe geben kann.

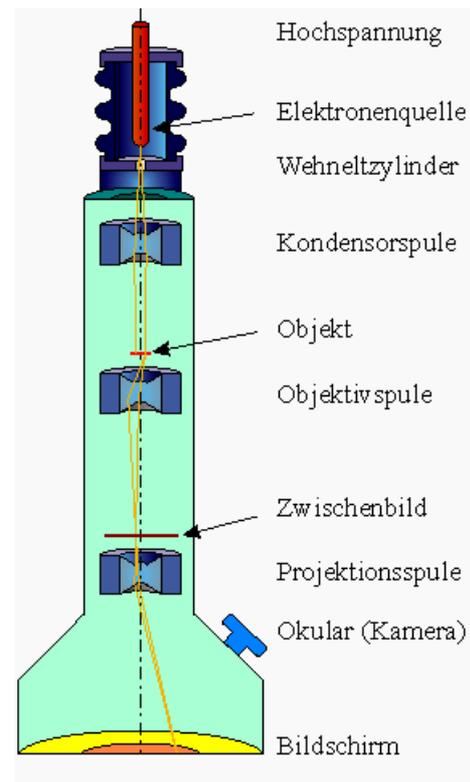
3.2. Elektronenmikroskopie

Bei der Elektronenmikroskopie^[114], zu deren Entwicklung E. Ruska wesentliche Beiträge geleistet hat, werden die zu untersuchenden Materialien mit schnellen Elektronen beschossen, um Schlüsse über das Innere oder die Oberfläche einer Probe zu ziehen. Der Aufbau eines Elektronenmikroskops, dargestellt in Abbildung 3.2., unterscheidet sich prinzipiell nur wenig von dem eines Lichtmikroskops. Grundlage dessen ist die Tatsache, dass sich Elektronenstrahlen in gleicher Weise bündeln und fokussieren lassen wie Lichtstrahlen. Da Elektronen eine sehr viel kleinere Wellenlänge haben als sichtbares Licht, kann mit Elektronenmikroskopen eine deutlich höhere Auflösung (etwa 0.1 nm) erreicht werden.

Der Elektronenstrahl wird durch Glühemission (Wolframdraht, LaB₆-Kristalle) oder durch Feldemission im Kathodenraum erzeugt und gegen die Anode mit Beschleunigungsspannungen zwischen 80 und 400 kV beschleunigt.

Magnetische Linsen, die eine Regulierung der Brennweite zulassen, fokussieren den Elektronenstrahl, der anschließend eine Kondensorblende passiert, die eine Begrenzung des Strahldurchmessers und das Abfangen von gestreuten Elektronen ermöglicht. Das Arbeiten unter Hochvakuum garantiert eine große freie Weglänge der Elektronen, die nicht durch Zusammenstöße mit z.B. Gasmolekülen abgelenkt werden.

Abb. 3.2. Prinzipieller Aufbau eines Elektronenmikroskops^[115], wobei Unterschiede zwischen Transmissionselektronen- und Rasterelektronenmikroskopen bestehen.



Elektronenmikroskope können nach drei wichtigen Gesichtspunkten unterschieden werden: nach der Art des Elektronenstrahls und des Informationsgewinnes sowie der Anordnung des Detektors.

3.2.1. Rasterelektronenmikroskopie (scanning electron microscopy, SEM)

Wird die Probenoberfläche mit einem feinen Elektronenstrahl zeilenweise abgerastert, handelt es sich um ein Rasterelektronenmikroskop. Die durch Wechselwirkungen des Elektronenstrahls mit der Probe erzeugten Sekundärelektronen werden als Informationsquelle genutzt. Als Detektor dient ein Faraday-Becher mit Szintillator (Everhart-Thornley-Detektor) und ein Photomultiplier, der seitlich über der Probe angeordnet ist. Das Bild wird digital erzeugt. Da die Sekundärelektronen mit einer Energie von 3-5 eV nur bei kurzer Diffusionsdistanz aus der Probe austreten, werden besonders Kanten und geneigte Flächen hervorgehoben. Dies ist der Grund für die plastisch aussehenden SEM-Aufnahmen und die hohe Tiefenschärfe. Nichtleitende Proben sind bei SEM-Messungen problematisch, da nur sehr wenige Sekundärelektronen abgestrahlt werden und sich die Probe negativ aufladen kann, was dann zur Ablenkung des Elektronenstrahls führt. Um diesen Effekt zu vermeiden, werden die Probenoberflächen mit einer sehr dünnen leitenden Schicht (einige Nanometer) versehen (bedampfen mit Gold, Platin, Palladium oder Graphit).

3.2.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Eine weitere Elektronenmikroskopieart stellt die Transmissionselektronenmikroskopie dar. Im Gegensatz zur SEM wird die Probenoberfläche nicht mit dem Elektronenstrahl abgerastert, sondern ein breiter statischer Strahl zur Bilderzeugung genutzt. Außerdem befindet sich der Detektor unterhalb der Probe im Strahlengang. Beim Durchtritt des Elektronenstrahls durch die Probe werden die Elektronen entweder absorbiert oder elastisch und inelastisch gestreut. Alle Elektronen, die die Probe im selben Winkel wieder verlassen, werden in einem Punkt fokussiert. Gestreute Elektronen, die den Detektor nicht erreichen, führen zu einer Verringerung der Elektronendichte und einer Erhöhung des Kontrastes und dienen so als bilderzeugende Information. Schwere Atome streuen die Elektronen im Strahl stärker, so dass kontrastreichere Bereiche entstehen. Da die Durchstrahlkraft von Elektronen begrenzt ist, muss die Objektdicke für eine optimale Auflösung entsprechend der Ordnungszahl der Atome und der Höhe der Beschleunigungsspannung angepasst werden. Als Detektor wird primär ein Leuchtschirm mit fluoreszierender Zinksulfidbeschichtung verwendet, der das Zwischenbild abbildet. Die Aufzeichnung des Bildes erfolgt mit Hilfe fotografischer Platten oder CCD-Kameras. Biologische oder organische Proben müssen im Gegensatz zu den meisten anorganischen Proben vor dem Messen speziell mit Schweratomen versetzt werden, um einen messbaren Kontrast zu erhalten. Die Proben werden dazu mit Schwermetallsalzen wie Uranylacetat oder Bleicitrat behandelt. Es wird von positiver Kontrastierung gesprochen, wenn die Struktur das Kontrastierungsmittel absorbiert bzw. einlagert. Negative Kontrastierung tritt auf, wenn der Hintergrund durch das Schwermetallsalz angefärbt wird und es sich höchstens außen an die Strukturen anlagert.

3.2.3. Elektronenbeugung (selected area electron diffraction, SAED)

Das Transmissionselektronenmikroskop ist auch in einer anderen Anordnung betreibbar. Hierbei wird die Probenfläche parallel zur Abbildungsachse des Gerätes ausgerichtet. Grundlage dieser Methode ist, dass Elektronen bei der Beugung an einem Gitter ähnliche Interferenzmuster zeigen wie monochromatische Röntgenstrahlen. Bei richtiger Ausrichtung der Probe werden nur die Elektronen gestreut, die auf ein gebundenes Elektron auf einer inneren Bahn treffen. So wirken die in der Probe angeordneten Atome als Gitter für die Elektronenbeugung. Dies ermöglicht die Auflösung von Gitternetzlinien und die Analyse von Kristallstrukturen. Die Detektion der gestreuten Elektronen erfolgt in einer Fokusebene, so dass ein Elektronenbeugungsmuster gemessen wird.

4. Gerichtete Organisation von PEO-Peptid-Nanobändern durch Silika

4.1. *Peptidgelenkte Synthese hierarchisch aufgebauter Kompositfasern*

In Kapitel 2.1.2. wurde der hierarchische Aufbau der Skelette von Glasschwämmen und Diatomeen beschrieben. Die Bildung dieser Käfigstrukturen verläuft mit hoher Präzision und Schnelligkeit. Es konnte demonstriert werden, dass die aus Glasschwämmen und Kieselalgen isolierten Proteine Silikatein I und II^[116] sowie Silaffin^[12] in der Lage sind die Hydrolyse und Kondensation von Tetraethoxysilan zu katalysieren, wobei meist sphärische Silikapartikel entstehen.

Schnelle Silifizierungsprozesse, die unter milden Bedingungen (RT, neutraler pH) mit der Ausbildung nanoskopischer, organisch-anorganischer Kompositfasern einhergehen, sind sehr interessant, vor allem weil solche Kompositfasern als Grundbausteine in Biokeramiken, Stützgerüsten für Gewebekulturen oder in faserverstärkten Materialien eingesetzt werden könnten. Zur Synthese von Komposit- und Silikananofasern wurden bislang eine Reihe an Templatmolekülen, einschließlich Polymeramphiphile^[117], Blockcopeptide^[69], Cellulose-^[118] und Collagenfasern^[47], Kohlenstoffnanoröhrchen^[119] und sogar Viruskapseln^[120], untersucht. Für diese seit einigen Jahren etablierten Sol-Gel-Strategien werden häufig Tetraalkoxysilane als Silikaprecursoren eingesetzt. Alle verwendeten Templatmoleküle wurden somit dahingehend konzipiert, katalytisch aktive Oberflächen für die Hydrolyse des Alkoxysilans zu präsentieren. Hierfür wurden z.B. kationische Aminogruppen von Aminosäureseitenketten (Lysin, Arginin) aber auch von synthetischen Polyaminen eingesetzt.

Nach der katalysierten Hydrolyse des Silikavorläufers kontrollieren die kationischen Template zusätzlich die Kondensationsreaktion, so dass definierte Silikanetzwerke und Kompositmaterialien entstehen. Der in dieser Art katalysierte Sol-Gel-Prozess verläuft in der Regel unter milden Bedingungen recht langsam^[121], gewährleistet aber nur so eine kontrollierte Silikabildung.

In jeden Fall sind für Reaktionen mit den anorganischen Silikavorläuferspezies definierte, anisotrope Nanofaseraggregate mit funktionalen Oberflächen nötig. Die in Kapitel 2.5. vorgestellten PEO-Peptid(VT)-Nanobänder wurden daher so konzipiert, dass die strukturellen und funktionalen Eigenschaften von Silika Morphogeneseproteinen imitiert werden.

Sie präsentieren entlang des Peptidkerns definierte funktionale Oberflächen, die mit Hydroxylgruppen in hydrophober Umgebung (Threoninseitenketten) und kationischen, tertiären Aminogruppen (*N,N*-Dimethylglycin-Endgruppen) besetzt sind. Es wurde im Folgenden überprüft, ob diese funktionellen Gruppen mit Silikaprecursoren bzw. Kieselsäureanaloga reagieren. Sowohl für die hydrophoben Hydroxylgruppen, als auch für die Aminogruppen können Wechselwirkungen mit Silikaspezies erwartet werden^[122, 123]. Weiterhin wurden die Kontrolle der Kondensationsreaktion, der Einbau der Nanobänder in das Silikanetzwerk und die gezielte Anordnung der Nanobänder in hierarchisch organisierte Überstrukturen untersucht. Mit Hilfe der nachstehenden Experimente sollte untersucht werden, ob die PEO-Peptid(VT)-Nanobänder eine kontrollierte Silikabildung induzieren, welche Konzentrationen an Aggregaten und Silikavorläufer nötig sind und wie sich zeitliche Einflüsse auswirken.

4.1.1. Synthese makroskopischer anorganisch-bioorganischer Kompositfasern

Die erwähnten Sol-Gel-Prozesse nutzen die katalytischen Eigenschaften der Templatmoleküle für die Hydrolyse und Kondensation von Tetraalkoxysilanen. Im Gegensatz dazu wurde der Fokus dieser Arbeit darauf gelegt, direkt Kieselsäure als Silikaquelle zu verwenden. In Analogie zu natürlichen Biosilifizierungsprozessen sollte somit eine selektive und schnelle Reaktion ablaufen.

Um Kieselsäure bereitzustellen können Tetraalkoxysilane in einem separaten Schritt unter stark sauren Bedingungen hydrolysiert werden. In allen nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde mit Tetramethoxysilan (TMOS) als Kieselsäurequelle gearbeitet. Im Allgemeinen wurden für die Hydrolysereaktion TMOS und Salzsäure (0.1 mol/L, pH ~ 1.1) in einem Masseverhältnis von 2:1 gemischt und bei RT für 1 h in einem geschlossenen Gefäß gerührt.

Nahe des isoelektrischen Punktes von Kieselsäure verläuft die Hydrolyse des Alkoxysilans schnell in Bezug zur Kondensationsreaktion^[124], so dass in der TMOS/HCl-Mischung vorrangig Kieselsäure neben unterschiedlich substituierten Tetramethoxysilanmolekülen sowie niedermolekularen Kieselsäureoligomeren vorliegt.

In ersten Versuchen wurden zu einer wässrigen Lösung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder (1.2 mg/mL) der hydrolysierte Silikaprecursor hinzugefügt, wobei es sofort zur Bildung eines undefinierten Gels kam. Dies ist verständlich, da es durch den Verdünnungseffekt bei der Mischung zu einer Erhöhung des pH-Wertes auf 6-7 kommt.

In diesem pH-Wert-Bereich verläuft die Kondensationsreaktion zu Polykieselsäuregelen sehr schnell. Daher können spezifische Wechselwirkungen mit den PEO-Peptid(VT)-Nanobändern nur unzureichend ausgebildet werden, welches das Entstehen unstrukturierter Silikanetzwerken zur Folge hat. Durch die Erniedrigung des pH-Wertes auf ~ 3 sollte sich die Silikakondensation verlangsamen, wodurch Wechselwirkungen mit den Nanobänder möglich wären. Unter diesen Reaktionsbedingungen konnten erste Anzeichen für die Bildung faserartiger Strukturen beobachtet werden. Um einen kontrollierten Silifizierungsprozess zu gewährleisten, mussten daher zwei Kriterien erfüllt werden: Erstens die unkontrollierten Kondensationsreaktionen zu verlangsamen und zweitens die attraktiven Wechselwirkungen zwischen PEO-Peptid(VT)-Nanobändern und Kieselsäuremolekülen zu unterstützen. Beides wurde erreicht, indem das Lösungsmittel von Wasser zu Ethanol gewechselt wurde.

Die Zugabe von 30 μL des Silikavorläufers zu einer verdünnten Lösung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder (1.2 mg/mL in Ethanol) führte spontan zur Bildung eines faserartigen Niederschlags (Abb. 4.1). Genauere Untersuchungen zeigten, dass nach einer Reaktionszeit von 3-10 Sekunden, in denen die Komponenten durch intensives Schütteln gemischt wurden, ein makroskopisches, farbloses Fasergeflecht entsteht. Das entstehende Fasergeflecht wurde 16 h in der Reaktionslösung gealtert und anschließend mit reichlich Ethanol gewaschen.

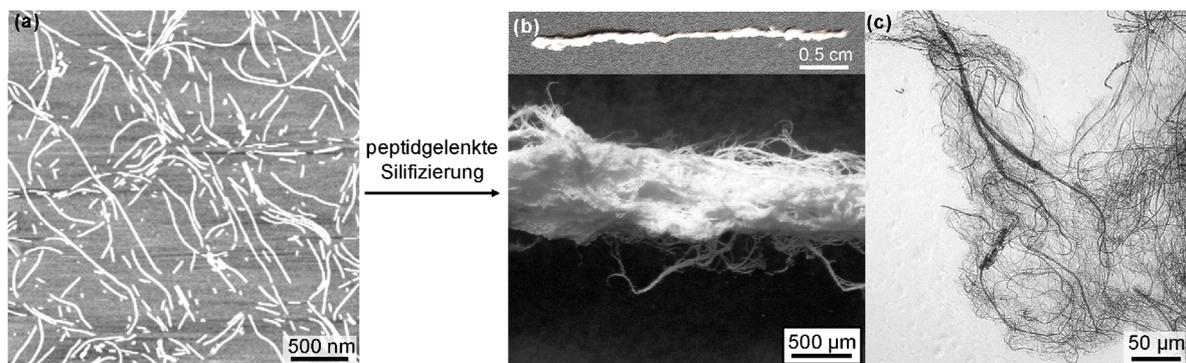


Abb. 4.1. Spontane Bildung eines farblosen, faserartigen Niederschlags durch Mischen einer Lösung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder in Ethanol mit hydrolysiertem TMOS. Die AFM-Aufnahme der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder (a) sowie die Fotos (b) und die Lichtmikroskop-Aufnahme des gebildeten Fasergeflechts (c) visualisieren die Größenunterschiede beider Strukturen.

4.1.2. Charakterisierung der Kompositfasern

Lichtmikroskop-Aufnahmen (Abb. 4.1 b) des erhaltenen Niederschlags deuten auf einen interessanten, hierarchischen Aufbau hin. Es wird eine Feinstruktur sichtbar, die sowohl sehr dünne Faserelemente (~ 400 nm) als auch aus diesen entstehende, größere Aggregate ($2-5 \mu\text{m}$) aufweist. Bevor jedoch eine detaillierte strukturelle Analyse durchgeführt wurde, sollte zunächst die Zusammensetzung der Fasern untersucht werden. Mit Hilfe der Thermogravimetrischen Analyse (TGA) und IR-spektroskopischen Messungen konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den ausfallenden Fasern, um ein Kompositmaterial handelt.

Die TGA wurde an luftgetrockneten Fasern durchgeführt, wobei in einer oxidierenden Atmosphäre mit einer Aufheizgeschwindigkeit von 20 K/min gearbeitet wurde (Abb. 4.2 a). Bei $53 \text{ }^\circ\text{C}$ trat ein erster Masseverlust von $\sim 2\%$ auf, der mit dem vollständigen Entfernen des anhaftenden Lösungsmittels Wasser erklärt werden kann. Ab $328 \text{ }^\circ\text{C}$ konnte ein deutlicher Masseverlust beobachtet werden, der mit dem Abbau der organischen Komponenten einhergeht. Der Gesamtmasseverlust nach der Verbrennung der organischen Komponenten bei $950 \text{ }^\circ\text{C}$ betrug 41% . Dies zeigt, dass in der Silifizierungsreaktion ein Hybridmaterial entstanden ist, das zu $59 \text{ Gew.}\%$ aus der anorganischen Komponente (Silika) und zu $41 \text{ Gew.}\%$ aus der organischen Komponente (PEO-Peptid-Nanobänder) besteht.

In Abbildung 4.2.b wird außerdem das IR-Spektrum einer getrockneten Faser gezeigt. Neben einer intensiven Schwingung bei $\nu = 1047 \text{ cm}^{-1}$, welche der O-Si-O-Etherstruktur zugeordnet werden konnte, werden Schwingungsbanden bei $\nu = 1689 \text{ cm}^{-1}$, 1629 cm^{-1} (Amid-I) und 1554 cm^{-1} (Amid-II) detektiert. Die Lage dieser Amidbanden variiert in Peptiden in Abhängigkeit von der Sekundärstruktur^[125]. Alle detektierten Schwingungsbanden sind charakteristisch für antiparallele β -Faltblattstrukturen und treten bei gleichen Wellenzahlen in den IR-Spektren der PEO-Peptid-Nanobänder auf. Eine Schwingungsbande der Ethergruppen des Polyethylenoxides, die im Allgemeinen bei $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ auftritt, konnte nicht eindeutig detektiert werden, da sie von der O-Si-O-Bande überlagert wird. Folglich entsteht ein Kompositmaterial, in dem die Peptidelemente die vorhandene β -Faltblatt Sekundärstruktur ungestört beibehalten. Demnach werden die PEO-Peptid-Nanobänder durch die Einbettung in das silikatische Netzwerk nicht stark beeinflusst.

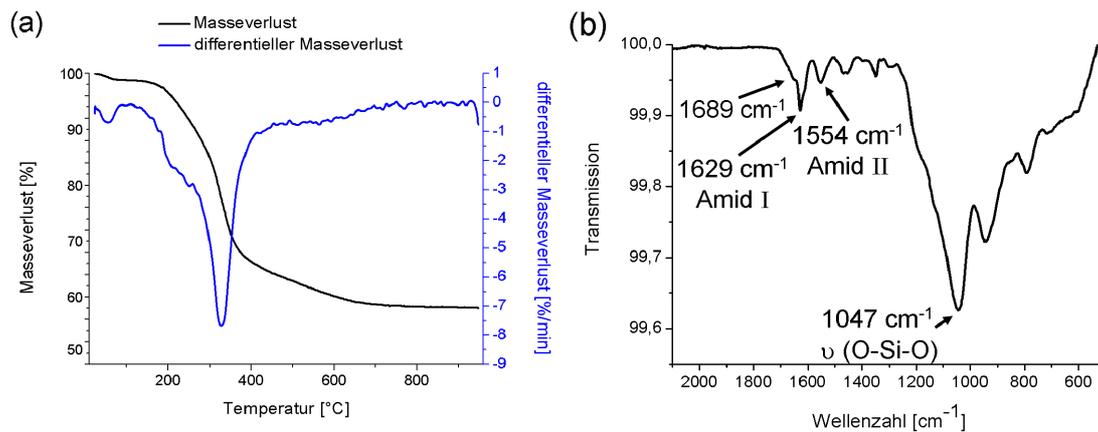


Abb. 4.2. TGA-Messung an getrockneten Kompositfasern (a) sowie FTIR-Spektrum der getrockneten Kompositfasern (b), welches sowohl die für β -Faltblattstrukturen (ν Amid-I und Amid-II) als auch die für Silikanetzwerke (ν Si-O-Si) charakteristischen Schwingungsbanden aufweist.

Bei einer Differential Scanning Calorimetry (DSC)-Messung der Kompositfasern konnte kein scharfer Phasenumwandlungspunkt detektiert werden. Das Auftreten eines solchen könnte z.B. auf eine Denaturierung (Schmelzen) der β -Faltblattstrukturen im Peptidkern hindeuten. Dies wurde für die PEO-Peptid(VT)-Nanobänder bei einer Temperatur von 116 °C beobachtet. Beim ersten Aufheizzyklus tritt ein sehr breites Signal zwischen 55 und 100 °C auf. Dieses ist für leicht- und mittelvernetzte Silikanetzwerke typisch und kann auf Umorganisations- und Nachkondensationsprozesse im Silika zurückgeführt werden.

Die Bestimmung der Ausbeute gibt u.a. darüber Aufschluss, wie effektiv die PEO-Peptid(VT)-Nanobänder, als komplexe Templatmoleküle, in der Silifizierungsreaktion genutzt werden. Dafür wurden nach der Reaktion durch Zentrifugation des Reaktionsgemisches alle silifizierten, präzipitierbaren Bestandteile entfernt. Anschließend wurde die Intensität der UV-Absorption dieser Lösung bei 295 nm bestimmt und mit der einer Lösung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder vor der Silifizierungsreaktion verglichen. So wurde festgestellt, dass 85% der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder in die ausgefallenen Kompositfasern integriert wurden. Dies ist vergleichbar mit synergistisch verlaufenden Fällungsreaktionen unter Verwendung von Blockcopolymeren, bei denen oft 80-90% der eingesetzten Template effektiv genutzt werden.

Im Gegensatz zu Standard Templatierungsreaktionen, die $\sim 95\%$ ^[57] des eingesetzten Silikavorläufers in SiO_2 umwandeln, werden in der vorgestellten Reaktion nur $\sim 10\%$ des Silikaprecursors ausgenutzt. Dies gibt einen ersten Hinweis auf einen selbstkontrollierenden Mechanismus der Reaktion. Im Rahmen der weiteren Untersuchungen wird auf diese Tatsache noch näher eingegangen werden.

Im nächsten Abschnitt soll nun der strukturelle Aufbau des Kompositmaterials beschrieben werden. Die spontan gebildeten Faserbündel können makroskopische Längen von bis zu 3 cm und einen Durchmesser von 1-2 mm erreichen. Bei genauerer Betrachtung der Strukturen im Lichtmikroskop werden sehr feine Strukturelemente (~ 400 nm) sichtbar, die sich zu größeren Bündeln (2-5 μm) zusammenlagern (Abb. 4.1 b). Das Vorhandensein einer definierten Feinstruktur wurde durch SEM-Untersuchungen bestätigt, wobei klar unterscheidbare Hierarchieebenen gefunden wurden (Abb. 4.3 a).

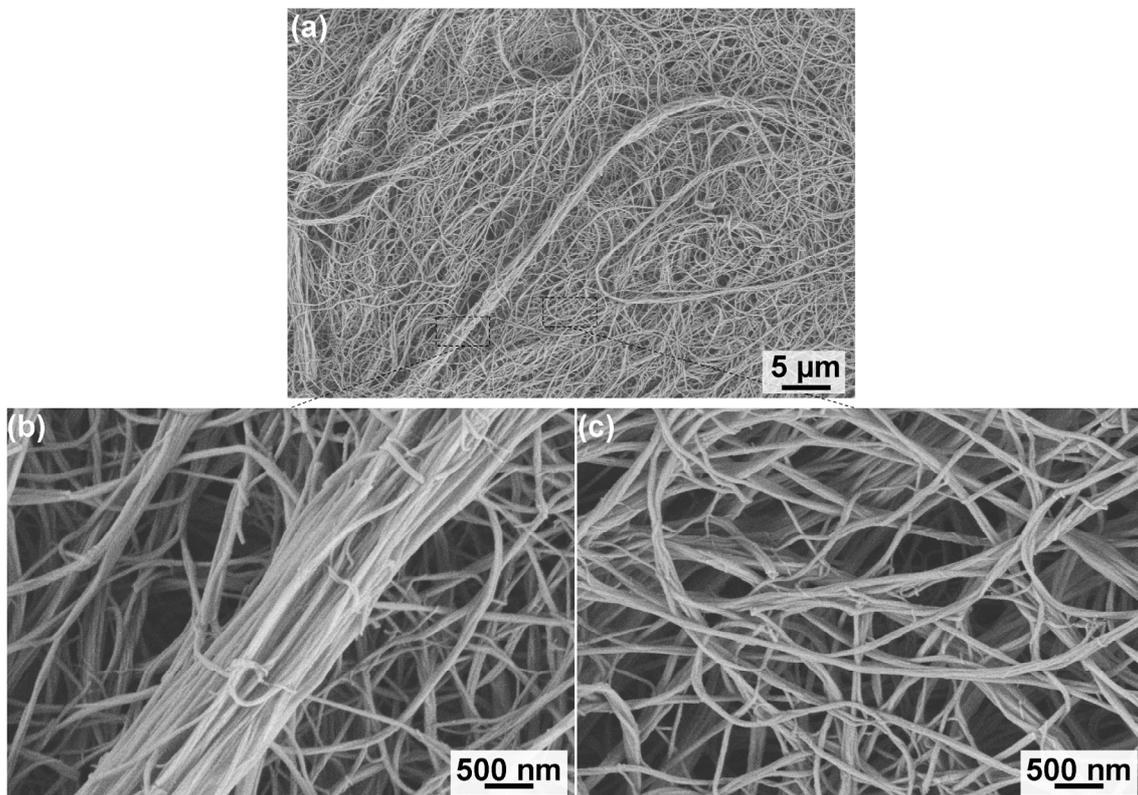


Abb. 4.3. SEM-Aufnahmen machen die Feinstruktur der Kompositfasergeflechte sichtbar, die aus einheitlichen Strukturelementen aufgebaut sind (Übersichtsaufnahme (a); Zusammenlagerung mehrerer Protokompositfasern zu einem Faserbündel (b); isolierte Protokompositfasern in einer netzwerkartigen Struktur (c)).

Die in Abbildung 4.3. dargestellten SEM-Aufnahmen zeigen als kleinste erkennbare Untereinheiten Fasern mit einer einheitlichen Breite von 95 ± 15 nm und Längen von mehreren zehn Mikrometern. Diese Strukturelemente werden im Folgenden als Protokompositfasern bezeichnet. Protokompositfasern können isoliert in einer Art Netzwerkanordnung vorliegen (Abb. 4.3 c), besitzen aber die Neigung zur Ausbildung von Faserbündeln (Abb. 4.3 b), was auf ihre Steifigkeit hinweist. Solche Protokompositfaserbündel können Durchmesser von bis zu $2\ \mu\text{m}$ einnehmen. Das Verkleben von Protokompositfasern untereinander und mit Protokompositfaserbündeln führt letztendlich zum Aufbau der makroskopischen Faserbündelstränge.

Der grundlegende Strukturaufbau kann anhand dieser Beobachtungen durchaus mit den Skeletten von Glasschwämmen verglichen werden. Die Silikanadeln der Glasschwämme bilden sich durch Anlagerung von hydratisierten Silikananopartikeln an einem zentralen Proteinfilament (siehe Kap. 2.1.2.) und weisen Durchmesser von $5\text{-}50\ \mu\text{m}$ auf. Sie bilden ebenfalls durch Bündelung der Silikanadeln stärkere Fasern aus, die für den Aufbau der Käfigstruktur verantwortlich sind. Analog bilden sich die Protokompositfasern durch Anlagerung eines homogenen, wahrscheinlich amorphen Silikanetzwerkes an die PEO-Peptid(VT)-Nanobänder. Dabei lassen die recht einheitlichen Durchmesser von ~ 95 nm vermuten, dass sich innerhalb der Protokompositfasern nicht nur ein zentrales Nanofaseraggregat befindet. Auch die beobachtete Tendenz zur Bündelbildung ist ein häufig in der Natur vorkommendes Phänomen, um Faserstrukturen zu verstärken. Letztlich unterscheidet jedoch die hochgeordnete makroskopische Form Glasschwammskelette von den synthetisierten Kompositfasern. Deren makroskopische Form wird von ineinander verschlungenen Protokompositfasern bestimmt, die eher an versponnene Proteinfasern von Wolle erinnern.

4.1.3. Innere Strukturanalyse poröser Silikafasern

Bei natürlichen und synthetischen faserverstärkten Kompositmaterialien werden die Materialeigenschaften entscheidend von der Ausrichtung der Faserkomponenten in der Matrix beeinflusst^[21, 126]. Auch die Grenzflächen zwischen organischen und anorganischen Bestandteilen sind von Bedeutung. Daher war es wichtig das Zusammenspiel von PEO-Peptid(VT)-Nanobänder und Silikamatrix auf nanoskopischer Ebene zu untersuchen. Die weitere Analyse des strukturellen Aufbaus kann Aussagen über die Anordnung und Orientierung der faserartigen PEO-Peptid(VT)-Nanobänder in den Protokompositfasern liefern.

Ein geeigneter Weg dazu ist die organischen Komponenten aus dem Kompositmaterial zu entfernen und die zurückbleibende Porenstruktur zu analysieren. Aussagen zur Lage und Größe der Poren liefern indirekt Beweise für die Anordnung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder. Das Verfahren des Nanocastings dient vorrangig zur Synthese mesoporöser Silikastrukturen kann aber auch zur Analyse lyotroper Phasen von Blockcopolymeren genutzt werden^[61]. Es wurde festgestellt, dass die entstehende Porenstruktur nach dem Calcinieren einen 1:1-Abdruck der Templatphase darstellt (siehe Kap. 2.2)^[55].

Somit wurden die Hybridfasern bei 550 °C für 5 h calciniert. Ein IR-Spektrum der zurückbleibenden Silikafasern bestätigte das vollständige Entfernen aller organischen Komponenten durch das Fehlen sämtlicher Amid-Schwingungsbanden (Abb. 4.4 a).

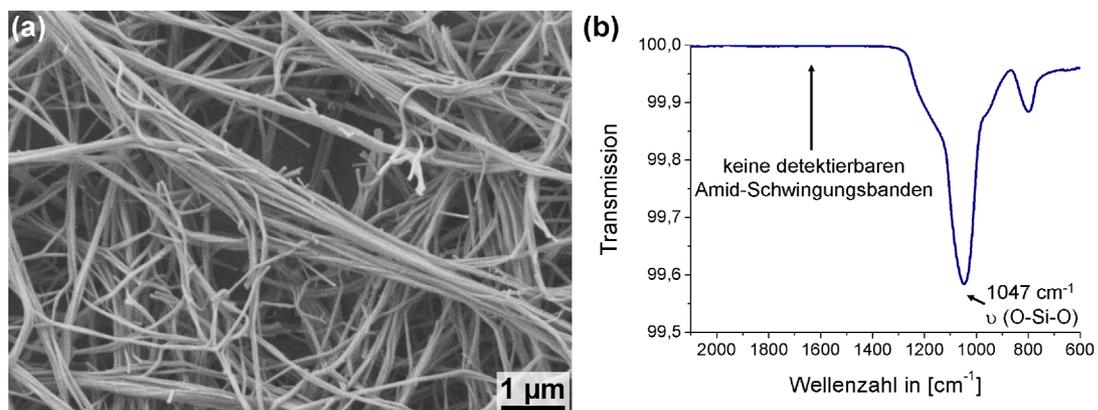


Abb. 4.4. SEM-Aufnahmen (a) und FTIR-Spektrum (b) der porösen Silikafasern nach dem Calcinieren der Kompositfasern bei 550 °C. (SEM-Aufnahmen belegen, dass ein Erhalt der makro- sowie mikroskopischen Struktur gegeben ist; IR-Spektroskopie bestätigt das quantitative Entfernen aller organischen Komponenten)

Das Calcinieren der Kompositfasern verläuft unter Erhalt der makro- und mikroskopischen Struktur (Abb. 4.4 a). Kompositfasern und die durch das Calcinieren erhaltenen Silikafasern zeichnen sich durch eine sehr ähnliche Topologie aus. Dabei können nach dem Calcinieren die gleichen Strukturelemente, Protofasern und Faserbündel dieser (Abb. 4.4 a) gefunden werden. Das anorganische Silikanetzwerk ist so stabil, dass es während des Calcinierungsvorganges nicht kollabiert. Wie von Silikanetzwerken zu erwarten, weist das Auftreten von Bruchstellen innerhalb der Protokompositfasern (Abb. 4.4 a) auf einen geringen Schrumpfung des Silikagerüsts hin.

Da die Mikrostruktur den Calciniervorgang im Wesentlichen unverändert übersteht, ermöglicht TEM Einblicke in die Porenstruktur der Silikafasern und erlaubt aus deren Analyse indirekt Rückschlüsse auf die Organisation der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder innerhalb der Kompositfasern zu ziehen. Wie in Kapitel 3.2.3. beschrieben, erfordert TEM als Durchsichtsmethode möglichst dünne Proben, daher wurden die Silikafasern vor den Messungen gemörsert.

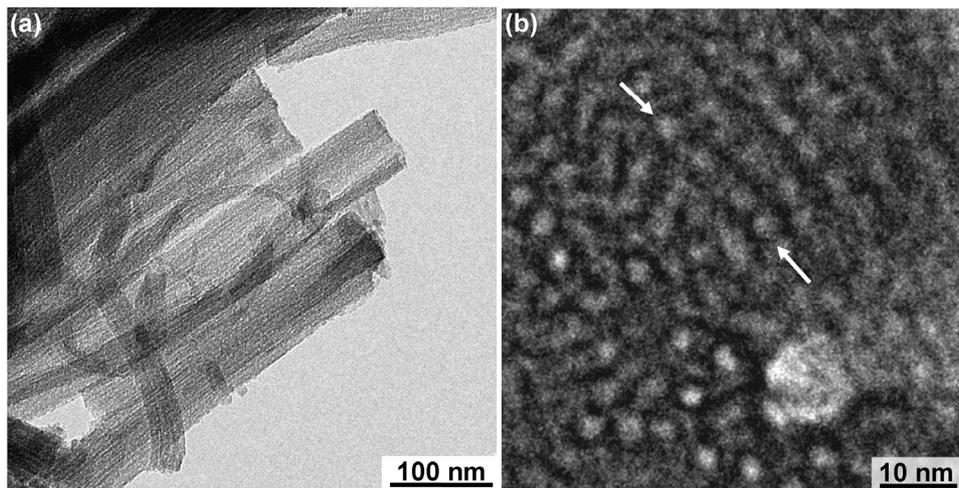


Abb. 4.5. TEM-Aufnahmen nach dem Calcinieren der Kompositfasern (hochorganisierte Porenstruktur der Silikafasern (a); Aufnahme eines Dünnschnitts, der senkrecht zu einer Protofaserlängsachse durchgeführt wurde (b)).

In Abbildung 4.5. sind die TEM-Aufnahmen der Silikafasern gezeigt. Interessanterweise können oft die Protofaserelemente mit einem Durchmesser von ~ 100 nm abgebildet werden. Durch das Mörsern brechen die Fasern offensichtlich an den Klebestellen zwischen den Protofasern. Diese bleiben als kompakte, stabile Strukturelemente intakt. Es lassen sich anhand der elektronenkontrastreichen und elektronenkontrastarmen Bereiche hochorganisierte, über mehrere hundert Nanometer parallel ausgerichtete Poren identifizieren (Abb. 4.5 a). Diese Poren besitzen eine Breite von 3 ± 0.5 nm. Durch Dünnschnitte senkrecht zur Hauptachse der Protofasern wird die Abbildung der Porenquerschnitte ermöglicht (Abb. 4.5 b). Der mittlere Abstand zwischen zwei benachbarten Poren in dichtester Packung ließ sich in diesen Bereichen gut bestimmen und beträgt 5.6 ± 0.6 nm. Die Porenquerschnitte erscheinen rund, welches aber durch Scherungseffekte beim Schneiden oder die Wahl der Fokusebene bei den TEM-Messungen verursacht werden kann.

Des Weiteren scheinen die Poren nicht perfekt 2D-hexagonal gepackt zu sein, wie z.B. für die Silikamaterialien MCM-41 charakteristisch, sondern es ist vielmehr eine lineare Stapelung erkennbar. Genauere Aussagen zu den Porenquerschnitten und der Porenanordnung würden TEM-Tomographiemessungen liefern, die jedoch aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnten.

Neben den TEM-Untersuchungen eignen sich auch SAXS- und Sorptionsmessungen zur Analyse der porösen Silikafasern. Die gemessene SAXS-Streukurve (Abb. 4.6 a) zeigt einen breiten, aber klar definierten Reflex. Damit wird das Vorhandensein eines sich wiederholenden Strukturmotivs angezeigt und so die geordnete Porenstruktur aus den TEM-Aufnahmen bestätigt. Allerdings weisen die parallel ausgerichteten Poren nur eine gewisse Nahordnung auf, die sich nicht über die ganze Probe erstreckt. Aufgrund der begrenzten Ausdehnung der Protokompositfasern ist dies auch nicht zu erwarten. Der Porenabstand, als vorhandenes Strukturmerkmal, konnte anhand der Streukurve mit 5.8 ± 0.2 nm errechnet werden.

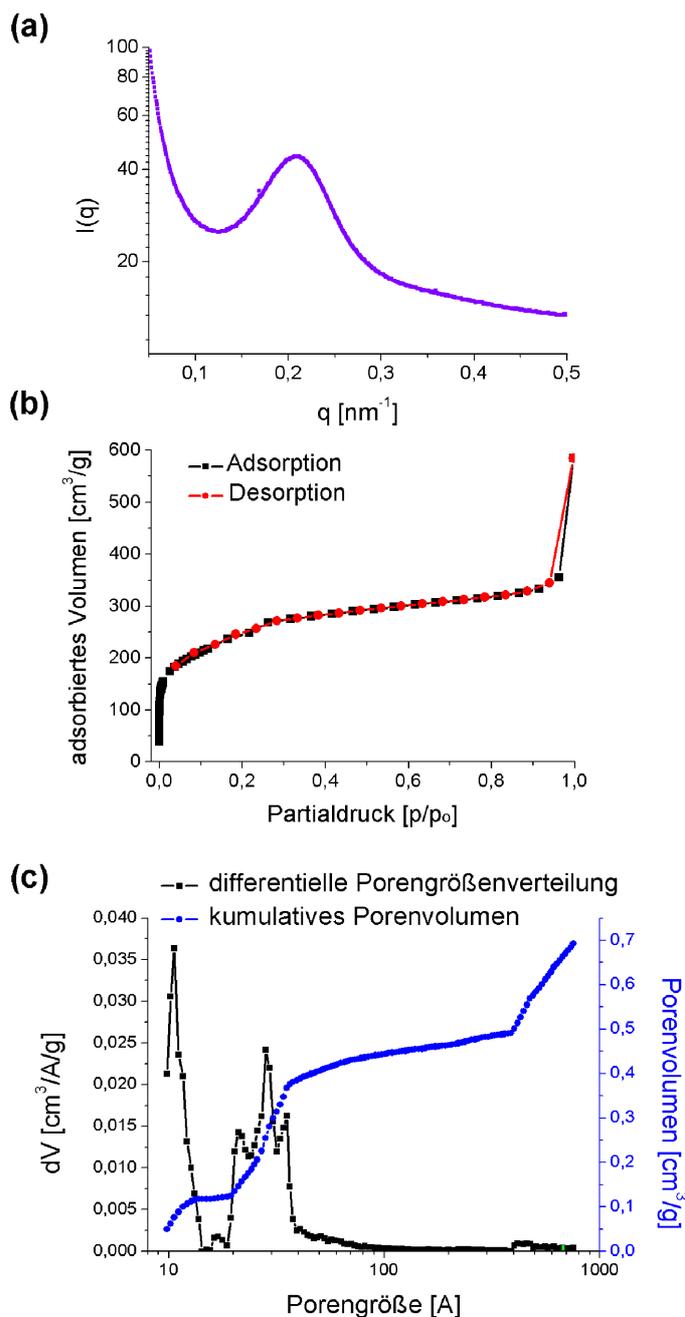


Abb. 4.6. Analyse der Porengrößen und Porenanordnungen der porösen Silikafasern (SAXS-Streukurve mit einem Signal bei 5.8 nm (a); Stickstoffadsorptionsisotherme (b) sowie differentielle und kumulierte Porengrößen bzw. -volumen Berechnungen (c)).

Der Verlauf der Stickstoffsorptionsisothermen poröser Silikate ist charakteristisch und hängt von Porengröße und Porengrößenverteilung ab. Dabei kann zwischen dem Vorhandensein von Mikro-, Meso- und Makroporen unterschieden werden. Die Stickstoffsorptionsisotherme der untersuchten Silikafasern macht deutlich, dass schon bei niedrigen Partialdrücken große Mengen an Stickstoff aufgenommen wurden (Abb. 4.6 b). Dieses Verhalten ist typisch für Mikroporen oder Mesoporen mit Durchmessern von höchstens 2-3 nm. Es wurde keine Hysterese bei der Desorption beobachtet, was für gut zugängliche, recht einheitliche Poren spricht. Eine genaue Analyse der Porengrößenverteilung (differentielle und kumulierte DFT-Kalkulationen; Abb. 4.6 c)) ergab zwei Maxima bei Porengrößen von 1.1 nm (Mikroporen) und 2.9 nm (Mesoporen). Das totale Porenvolumen wurde mit $0.69 \text{ cm}^3/\text{g}$ berechnet, wovon $0.12 \text{ cm}^3/\text{g}$ von den Mikroporen, $0.30 \text{ cm}^3/\text{g}$ von den Mesoporen und das restliche Volumen von Makroporen zwischen einzelnen Faserkomponenten erzeugt werden. Mittels BET-Analyse wurde eine spezifische Oberfläche von $870 \text{ m}^2/\text{g}$ bestimmt.

Nach der Analyse der Porenstruktur im calcinierten Material bleibt festzustellen, dass die Poren regelmäßig und parallel ausgerichtet innerhalb der Silikamatrix vorliegen. Die Dimensionen der analysierten Poren lassen sich gut mit den Dimensionen der PEO-Peptid Nanobänder in Einklang bringen. Innerhalb der Fehlergrenzen sind die mit den verschiedenen Methoden ermittelten Werte für die Porengröße bzw. den Porenabstand identisch. Der für die im TEM abgebildeten Mesoporen gefundene Wert von $\sim 2.9 \text{ nm}$ korreliert gut mit den Dimensionen des Peptidkerns, dessen Breite mit $2.6\text{-}2.8 \text{ nm}$ angegeben wurde. Die seitlich am Peptidkern geknault vorliegenden PEO-Ketten werden vermutlich vom Silikanetzwerk eingeschlossen und sind nach dem Calcinieren für das Entstehen der Mikroporen verantwortlich^[127]. Diese Übereinstimmung der Porengrößen mit den Ausmaßen der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder lässt den Schluss zu, dass die PEO-Peptid-Nanobänder in den Protokompositfasern ebenfalls parallel, in Richtung der Hauptfaserachse ausgerichtet sind.

4.1.4. Systematische Variationen der Reaktionsbedingungen

Die bisher aus der Analyse der Komposit- und Silikafasern gewonnenen Ergebnisse deuten auf einen selbstorganisierenden und -regulierenden Silifizierungsprozess hin. Diese Annahme wird unter anderem durch das Auftreten der definierten Feinstruktur (einheitliche Protokompositfasern) und durch die einheitlichen Silikawanddicken zwischen den Poren gestützt.

Eine systematische Variation ausgewählter Reaktionsparameter sollte diese Annahme bestätigen und das mechanistische Verständnis für den Silifizierungsprozess unterstützen. Dabei sollte vornehmlich aufgeklärt werden, ob sich eine Erhöhung des Überschusses an Silikavorläufer auf die Zusammensetzung der Fasern auswirkt und ob sich die Porenabstände in Folge vermehrter Silikaeinlagerung vergrößern. Weiterhin wurde der Einfluss der Alterungszeit in Abhängigkeit vom eingesetzten Überschuss an Silikaprecursor untersucht.

Ein weiterer wichtiger Parameter war die Hydrolysezeit des Tetramethoxysilans, die für eine erfolgreiche Reaktion 45 min nicht unter- und 6 h nicht überschreiten durfte. Dies deutet darauf hin, dass sowohl eine zu geringe Konzentration freier Silanolgruppen als auch zu stark vernetzte Kieselsäureoligomere die Bildung der makroskopischen Kompositfasern verhindert. Im beschriebenen Zeitfenster hat die Hydrolysezeit der TMOS/HCl-Mischung aber keinen entscheidenden Einfluss auf die mikroskopische Struktur der Fasern.

Bei konstanter Konzentration an PEO-Peptid(VT)-Nanobänder (1.2 mg/mL in EtOH) wurde die Menge an hinzugefügtem Silikaprecursor zwischen 10 und 2400 Äq. pro PEO-Peptid-Konjugatmolekül variiert. Dabei stellt die zugegebene Menge von 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$ an hydrolysiertem Silikavorläufer (2400 Äq.) das Maximum dar. Bei einer weiteren Erhöhung der Kieselsäureäquivalente konnte kein Ausfallen der Kompositfasern beobachtet werden. Bei den niedrigeren Silikavorläuferkonzentrationen 0.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (10 Äq.) bzw. 2.47 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (40 Äq.) kam es nicht zum Ausfallen einer kompakten Faser, sondern es wurden dünne, mikroskopisch kleine Faserbündel gebildet. Das spricht dafür, dass gerade so viel Silikaprecursor in der Lösung vorhanden ist, um stabile Protokompositfasern auszubilden. Das weitere Verkleben dieser findet aus Mangel an kondensationsfähigen Kieselsäuremolekülen nicht spontan statt.

Daher sollen im folgenden Kompositfasern miteinander verglichen werden, die mit 480 Kieselsäureäquivalenten (30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Nanobandlösung) und der fünffachen Menge (2400 Äq., 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$) an Silikaprecursor dargestellt wurden. Nach 10 Minuten sowie 48 h Alterungszeit wurden die entstandenen Kompositfasern aus dem Fällungsbad entfernt. Wenn der Silifizierungsprozess selbstorganisierend bzw. selbstregulierend stattfindet, sollte der Überschuss an eingesetzten Kieselsäureäquivalenten den strukturellen Aufbau der Fasern nicht wesentlich beeinflussen.

In Abbildung 4.7. sind SEM-Aufnahmen der unterschiedlich präparierten Kompositfasern gegenübergestellt.

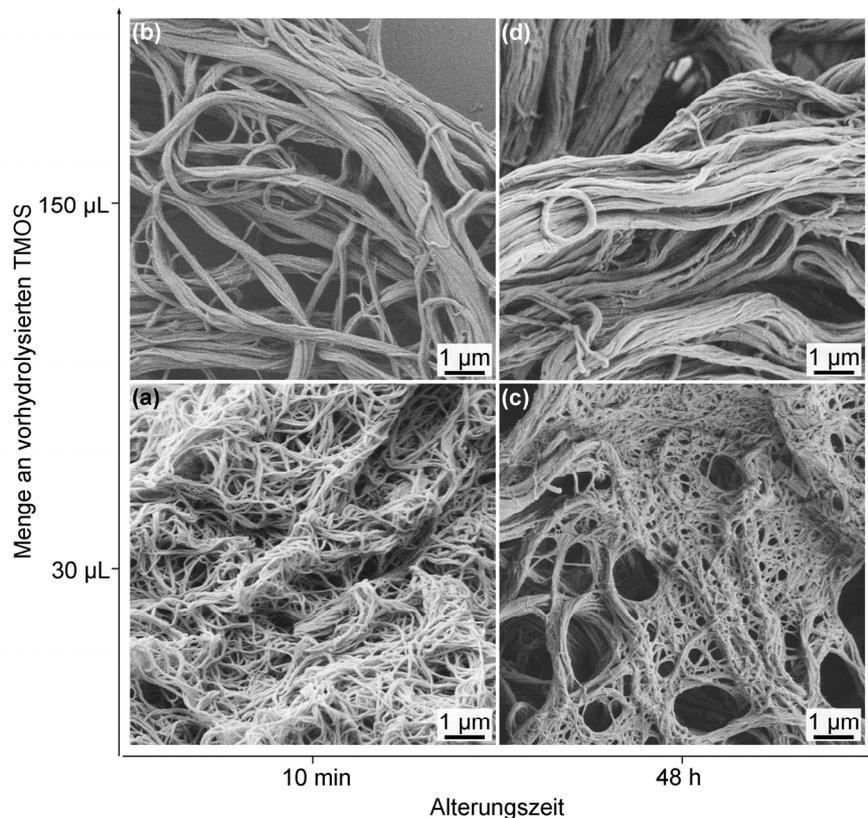


Abb. 4.7. SEM-Aufnahmen verdeutlichen die mikroskopische Struktur von Kompositfasern, die nach unterschiedlichen Reaktionsbedingungen (Variation des Silikavorläuferüberschusses und der Alterungszeit) dargestellt wurden. Es werden jeweils Proben mit geringerer Menge an hydrolysiertem TMOS (30 μL , 480 Äq.) und höherer Konzentration an „Kieselsäure“ (150 μL , 2400 Äq.) bei Alterungszeiten von 10 Minuten und 48 Stunden miteinander verglichen.

Die mikrostrukturellen Unterschiede sind nur geringfügig ausgeprägt. Zeigen die SEM-Aufnahmen der Kompositfasern mit 480-fachem Überschuss an Silikaprecursor (Abb. 4.7 a, c) eher einzeln vorliegende Protokompositfasern in einer netzwerkartigen Anordnung, so tritt mit der Zunahme des Silikaprecursors eine vermehrte Bündelbildung auf. Bei den Faserproben, die mit 2400 Äq. „Kieselsäure“ (Abb. 4.7 b, d) dargestellt wurden, werden fast ausschließlich Bündel der Prototasern, mit Durchmessern von bis zu 2 μm , beobachtet. Eine exakte Unterscheidung einzelner Protokompositfasern in diesen Bündeln ist teilweise nicht mehr möglich.

Dennoch bilden sich unabhängig vom Silikavorläuferüberschuss die gleichen Strukturelemente aus. Alle Proben sind aus einheitlichen Protokompositfasern mit Durchmessern von ~ 95 nm aufgebaut. Die Variation der Alterungszeit zwischen 10 min und 48 h hat bei gleichen Silikavorläufermengen kaum Auswirkungen auf die Struktur der Proben. Das Verhältnis von nicht aggregierten Protofasern zu Faserbündeln wird durch die Menge an Kieselsäureäquivalenten bestimmt und ändert sich mit der Zeit kaum.

Die Zusammensetzung der Kompositfasern ändert sich in Abhängigkeit der Reaktionsparameter nur minimal. Aus Abbildung 4.8. geht hervor, dass der prozentuale Anteil an anorganischem Material trotz der fünffachen Menge an zur Verfügung stehendem Silikaprecursor bei gleichen Alterungszeiten nur jeweils um $\sim 2\%$ steigt (Abb. 4.8, Vergleich Probe a mit b bzw. c mit d). Wird die Alterungszeit von 10 min auf 48 h erhöht, steigt der Anteil an Silikamatrix im Vergleich zu den organischen Komponenten interessanterweise unabhängig von der vorhandenen Silikavorläufermenge um $\sim 4\%$ (Abb. 4.8, Vergleich von Probe a mit c bzw. b mit d).

Probe	vorhydrolysierte TMOs-Lösung (μL)	Alterungszeit	Gesamtmasseverlust beim Calcinieren (Gew.-%)	d_{max} Porenabstand (nm)
a	30	10 min	45 ± 2	4.8
b	150	10 min	43 ± 2	4.7
c	30	48 h	41 ± 2	5.8
d	150	48 h	39 ± 2	5.9

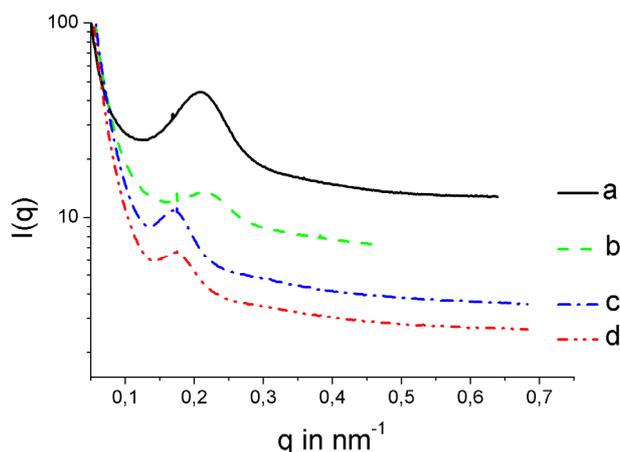


Abb. 4.8. Übersicht der Röntgenkurven und Porenabstände sowie der Zusammensetzung der unterschiedlich präparierten Kompositfasern.

Des Weiteren wurden die Faserproben separat bei 550 °C calciniert, um den Porenaufbau vergleichen zu können. Die aus TEM-Aufnahmen ermittelten Porengrößen von ~ 3 nm sind bei allen Kompositfaserproben innerhalb der Fehlergrenzen identisch.

Beim Vergleich der mit SAXS ermittelten Porenabstände fällt ein deutlicher Unterschied zwischen den kürzer gealterten und länger gealterten calcinierten Silikafasern auf. Liegen die Werte nach einer Reaktionszeit von 10 min bei 4.8 nm (Abb. 4.8, Probe a) bzw. 4.7 nm (Abb. 4.8, Probe b), so erhöhen sie sich nach einer Alterungszeit von 48 h auf 5.8 nm (Abb. 4.8, Probe c) bzw. 5.9 nm (Abb. 4.8, Probe d). Bei längeren Alterungszeiten sind Nachkondensationsprozesse innerhalb des Silikanetzwerkes möglich, die zu einer Stabilisierung des selbigen führen. Die größeren Porenabstände können vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass beim Calcinieren das stabilisierte, festere Netzwerk weniger schrumpft als ein leicht vernetztes Gerüst.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse lassen nachfolgende Schlussfolgerungen zu: Der primäre Silifizierungsprozess findet sehr schnell statt und wird nur wenig von den Reaktionsbedingungen beeinflusst. Es werden in jedem Fall einheitliche Protokompositfasern gebildet (Abb. 4.7). Dabei sollte aber mindestens ein Überschuss von ~ 100 Äq. Silikaprecursor in Bezug auf das PEO-Peptid-Konjugat vorhanden sein, um die Bildung makroskopischer Kompositfasern zu ermöglichen. Eine Erhöhung der Mengen an Silikaprecursor führt nicht zu einer Verdickung des Silikamaterials zwischen den PEO-Peptid-Nanobändern. Dies wurde über die Bestimmung der Porenabstände mittels Röntgenmessungen bestätigt. TGA-Messungen belegen außerdem, dass sich der Silikaanteil in den Kompositfasern mit Vergrößerung des Überschusses an Silikavorläufer im Reaktionsgemisch nur unwesentlich ($\sim 2\%$) ändert. Trotz der erhöhten Silikaprecursormenge werden davon in etwa gleiche Mengen für die Kompositfaserbildung genutzt. Der prozentuale Anteil von ausgenutztem Silika im Vergleich mit hinzugefügtem Silika sinkt dabei von $\sim 10\%$ ($30 \mu\text{L}$, 480 Äq.) auf $\sim 2\%$ ($150 \mu\text{L}$, 2400 Äq.). Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass die Nanobänder die Kondensationsreaktion kontrollieren und nur bestimmte Mengen an Silika in das Kompositmaterial integriert werden. Bei längeren Alterungszeiten läuft nach der Kompositfaserbildung ein zweiter, langsamer Prozess ab. Hierbei kommt es zu einer verstärkten Kondensation von Silika an den Faseroberflächen. Dieser Prozess läuft sowohl zwischen den netzwerkartigen Strukturen als auch auf der Oberfläche von Protokompositfaserbündeln ab. Diese werden von einer Silikaschicht überzogen, so dass einzelne Protofaserelemente nicht mehr eindeutig identifiziert werden können. Dieser Sekundärprozess, der nicht sehr stark ausgeprägt ist, führt zur Erhöhung des Silikaanteils in den Fasern um $\sim 4\%$ und ist relativ unabhängig von der Silikaprecursormenge.

4.1.5. Mechanismus der Kompositfaserbildung

Ausgehend von bekannten Biosilifizierungsmechanismen^[13] und Bezug nehmend auf die gewonnenen Erkenntnisse wird der folgende Mechanismus der Kompositfaserbildung vorgeschlagen. Ausgangspunkt der Reaktion ist die Zugabe der Kieselsäurequelle (hydrolysierte TMOS-Lösung) zu einer Lösung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder in Ethanol. Dabei erhöht sich durch den Verdünnungseffekt der scheinbare pH-Wert der TMOS/HCl-Mischung von ~ 1 auf 6-7. In diesem pH-Wert-Bereich sind Kieselsäuremoleküle und Kieselsäureoligomere negativ geladen^[50]. Als mögliche Wechselwirkungen mit den PEO-Peptid(VT)-Nanobänder kommen somit einerseits ionische Wechselwirkungen^[12] mit den positiv geladenen *N,N*-Dimethylglycinen, andererseits Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Effekte mit den Threoninseitenketten in Frage. Es wird postuliert, dass diese Wechselwirkungen zur Bindung der Kieselsäuremoleküle auf dem funktionalen Peptidband führen. Die lokale Erhöhung der Konzentration an $\text{Si}(\text{OH})_4$ beschleunigt lokal die Kondensation zu einem kompakten Silikanetzwerk. Interessanterweise zeigt der vorgeschlagene Reaktionsweg viele Analogien zu biologischen Silifizierungsprozessen^[128]. Von Biosilifizierungsreaktionen in Kieselalgen bekannt ist, dass Kieselsäure entweder auf kationischen Peptidsequenzen oder hydroxylgruppenreichen β -Faltblattstrukturen angereichert wird. Auch Computersimulationen schlagen katalysierte Reaktionswege mit niedriger Aktivierungsenergie für Silikakondensationen auf Oberflächen mit Hydroxylgruppen in hydrophober Umgebung vor^[123] und unterstützen somit den vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus.

Eine durch bevorzugte Adsorption von Kieselsäure an den PEO-Ketten ausgelöste Kondensation kann nach den vorliegenden Ergebnissen weitgehend ausgeschlossen werden. Polyethylenoxid als Analogon zu Kronenethern ist zwar für seine hohe Komplexierungsaffinität, besonders gegenüber Alkalimetallionen, bekannt und könnte daher auch Kieselsäure aufnehmen. Allerdings bestätigten verschiedene Kontrollexperimente in denen die PEO-Peptid(VT)-Nanobänder durch PEO-Block- oder PEO-graft-Strukturen ersetzt wurden, dass kein dominierender Effekt der PEO-Ketten nachgewiesen werden konnte. Wurden Poly(octa(ethylen-glycol)methacrylat) oder P123 (PEO-*block*-PPO-*block*-PEO) unter denselben Bedingungen wie die PEO-Peptid-Nanobänder mit dem Silikaprecursor gemischt, ließ sich in keinem Fall eine Anreicherung von Silika auf den Polymerstrukturen nachweisen.

Dies wurde durch AFM- und TEM-Messungen unabhängig von den Konzentrationen der PEO-Polymere und dem Überschuss an Silikaprecursor nachgewiesen. Außerdem wurde niemals das Ausfallen von silikatischem Material beobachtet.

Diese Experimente unterstreichen die Wichtigkeit des Peptidkerns zur Bindung der Kieselsäure in der Silifizierungsreaktion. In Abbildung 4.9. wird der Mechanismus der Bildung der hierarchischen Kompositfasern schematisch dargestellt.

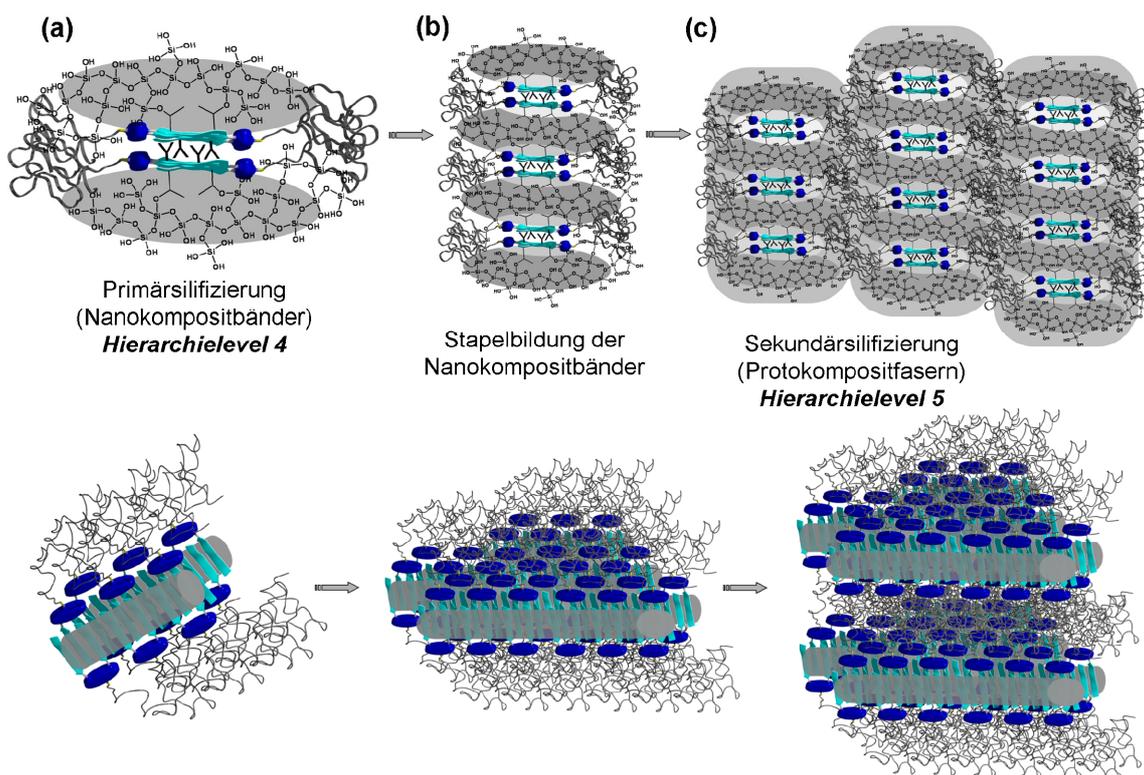


Abb. 4.9. Schematische Darstellung des Mechanismus der Kompositfaserbildung, in der die verschiedenen Hierarchieebenen veranschaulicht werden.

Der Silifizierungsprozess startet mit der Kieselsäureanreicherung auf beiden Seiten der Nanobänder (Abb. 4.9 a). Anschließend kommt es in einem synergistischen Prozess zur Anordnung dieser silifizierten Nanobänder in Stapeln (Abb. 4.9 b). Dabei wirken die lockeren, nicht vollständig durchkondensierten Silikanetzwerke als „Klebstoff“ zwischen den Fasern. Dies wurde anhand der TEM-Aufnahmen und der Röntgenstreuukurven calcinierter Silikafasern nachgewiesen. Es wurde eine recht regelmäßige, parallele Anordnung der Poren in gleichbleibenden Abständen gefunden. Die PEO-Peptid(VT)-Nanobänder binden offensichtlich nur so viel der vorhandenen Kieselsäuremoleküle, wie zur Ausbildung einer stabilen Struktur nötig ist.

TEM-Aufnahmen der Porenstruktur der calcinierten Silikafasern geben außerdem Hinweise darauf, dass bei der Anordnung der silifizierten Nanobänder eine recht lineare Stapelarchitektur eingenommen wird. In einem zweiten Schritt aggregieren kleine Stapel lateral über ihre teilweise silifizierten PEO-Ketten (Abb. 4.9 c). Sekundär wird die Struktur durch Einbinden und Kondensation weiterer Kieselsäure stabilisiert. Die resultierenden Protokompositfasern bestimmen dann wie bereits beschrieben durch Bündelbildung die makroskopische Form der Kompositfasern.

Diese Mikrostruktur mit den einheitlichen Grundelementen, den Protokompositfasern, wird auf den SEM-Aufnahmen sichtbar. In einer schnellen selbstkontrollierenden Reaktion entsteht also ein komplexes Hybridmaterial mit sechs Hierarchieebenen, die wie folgt zusammengefasst werden können: Die PEO-Peptid-Konjugate (Hierarchielevel 1, siehe Abb. 2.13 a) aggregieren im ersten Selbstorganisationsschritt zu β -Faltblatt-Tapes (Hierarchielevel 2, Abb. 2.13 b) und den faserartigen PEO-Peptid(VT)-Nanobänder (Hierarchielevel 3, Abb. 2.13 c). In der Silifizierungsreaktion, dem zweiten Selbstorganisationsschritt, wird zunächst Silika auf der Oberfläche der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder angelagert, sogenannte Nanokompositbänder entstehen (Hierarchielevel 4, Abb. 4.9 a). Weitere Aggregation führt über die Protokompositfasern (Hierarchielevel 5, Abb. 4.9 c) zu Faserbündeln (Hierarchielevel 6) und abschließend zu makroskopischen Kompositfasern. Dieser letzte Prozess entspricht keinem separaten Hierarchielevel, da die Organisation keinem definierten Motiv folgt. Die Verschlaufung der Protokompositfasern kann eher mit dem Verspinnen der Proteinfasern in Wolle verglichen werden.

4.2. Isolierung und Charakterisierung der Nanokompositbänder

Aus materialwissenschaftlicher Sicht ist die Synthese starrer, nanoskopischer Glasfasern bzw. Glas-Kompositfasern sehr interessant^[129]. Sie könnten vor allem in faserverstärkten Kompositmaterialien oder potenziell als Analoga zu optischen Glasfaserkabeln eingesetzt werden. Hierbei sind effiziente und schnelle Syntheserouten von Vorteil, die in der Natur bei Biosilifizierungsreaktionen zu beobachten sind. In der Natur wird als Silikaquelle Kieselsäure genutzt, die in geringen Konzentrationen ($\sim 90 \mu\text{M}$)^[130] in den Ozeanen vorkommt. Spezialisierte, faserartige Proteinfilamente binden die Kieselsäuremoleküle und kontrollieren den Silifizierungsprozess, so dass Kondensationsreaktionen und der Aufbau des Silikanetzwerkes nur in bestimmten Kompartimenten ablaufen^[131].

Die technische Synthese nanoskopischer, faserartiger Silikakomposite gelang mit unterschiedlichen Templatmolekülen, die die Funktion natürlicher Proteinfilamente übernahmen^[132]. Dabei waren im Allgemeinen Reaktionszeiten von 3-7 Tagen notwendig.

Im vorangegangenen Kapitel wurde der peptidgelenkte Mechanismus der Silifizierungsreaktion der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder vorgestellt. Als Primärschritt wurde die Bildung von Nanokompositbändern postuliert. Es sollte daher aufgeklärt werden, ob die Isolierung einzelner Nanokompositbänder möglich ist. Damit sollten einerseits der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus bestätigt und andererseits definierte Nanokompositfasern synthetisiert werden. Außerdem sollte untersucht werden, mit welcher Effizienz die PEO-Peptid(VT)-Nanobänder Kieselsäuremoleküle binden, ob die Kondensation des Silikanetzwerkes von der Oberfläche der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder aus beginnt und welche Wechselwirkungen zwischen funktionellen Gruppen der Faseraggregate und den Kieselsäuremolekülen beteiligt sind.

4.2.1. Synthese und Charakterisierung der Nanokompositbänder

Da eine direkte Analyse der Reaktionsgemische durch AFM oder TEM angestrebt wurde und eine nachträgliche Verdünnung vermieden werden sollte, erwies sich eine Konzentration der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder von 0.12 mg/mL als vorteilhaft. In einem typischen Versuch wurden 1.2 μ L einer verdünnten Lösung (700 mM in EtOH) des hydrolysierten TMOS zu 2 mL einer Lösung der PEO-Peptid-Nanobänder in Ethanol gegeben. Es wurde dabei mit nur 10 Äquivalenten Überschuss Silikaprecursor pro PEO-Peptid-Konjugat gearbeitet, welches 2.5 Äq. pro Threonin Hydroxylgruppe entspricht. Nach einer Reaktionszeit von 10 Sekunden wurde die Reaktion im Allgemeinen abgebrochen, in dem das Reaktionsgemisch auf die entsprechenden Analysenträger (MICA für AFM, kohlenstoffbeschichtete Kupfergrids für TEM) aufgetropft wurde.

Die AFM-Aufnahmen in Abbildung 4.10. zeigen die Nanobänder nach der Silifizierungsreaktion. Es werden einheitliche, steife, bandartige Objekte gefunden (Abb. 4.10 a). Die erhaltenen Nanokompositbänder zeichnen sich gegenüber den nicht silifizierten PEO-Peptid(VT)-Nanobändern durch ein Ansteigen der Längen von durchschnittlich 800 nm auf über 5 μ m aus. Auch die messbaren Höhen steigen von 1.4 nm auf 3.1 nm (Abb. 4.10 c), während die Breiten sich mit \sim 15 nm (Abb. 4.10 d) nur wenig ändern.

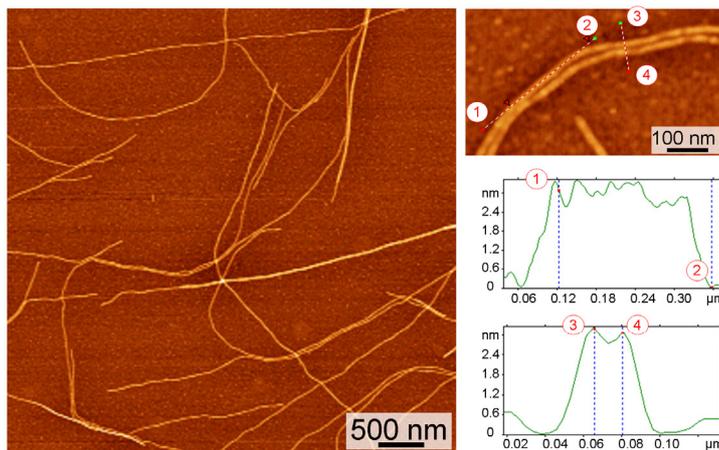


Abb. 4.10. AFM-Aufnahme der entstehenden nanoskopischen Kompositbänder nach der Silifizierungsreaktion. Die dargestellten Höhenprofile belegen ein Höhenwachstum auf 3.1 nm im Vergleich zu den nicht silifizierten PEO-Peptid(VT)-Nanobändern.

Das Ansteigen der Höhen der abgebildeten Fasern legt einen Einbau von Silika in die Nanobänder nahe. Mittels Zentrifugation des Reaktionsgemisches konnten die Nanokompositbänder isoliert und IR-spektroskopisch analysiert werden. Sie enthalten nachweislich sowohl die β -Faltblatt typischen Amid-Schwingungsbanden bei 1629 cm^{-1} (Amid-I) und 1558 cm^{-1} (Amid-II) als auch die für Silikanetzwerke charakteristische Si-O-Si-Schwingungsbande bei 1050 cm^{-1} (Abb. 4.11 c). Damit kann auf das Vorhandensein ungestörter PEO-Peptid-Aggregate als auch des Silikanetzwerkes geschlossen werden. In Kontrollexperimenten die einerseits ohne die PEO-Peptid-Nanobänder und andererseits ohne Silikaprecursor durchgeführt wurden, konnten keine durch Zentrifugation abtrennbaren Stoffe erhalten werden.

Weiteren Aufschluss über die Struktur der Nanokompositbänder und die Art und Weise der Integration des Silika in die PEO-Peptid-Aggregate gaben TEM-Untersuchungen. Hierbei wurden ebenfalls faserartige Strukturen gefunden, die im Gegensatz zu den nicht silifizierten PEO-Peptid(VT)-Nanobändern einen deutlich erhöhten Elektronenkontrast aufweisen (Abb. 4.11 a). Die Breite der Fasern wurde mit $11\pm 2\text{ nm}$ bestimmt. Zusätzlich zu der IR-Messung konnte das Erhaltenbleiben des β -Faltblattmotivs während der Silifizierungsreaktion durch SAED bestätigt werden, indem das typische d-spacing bei 4.8 \AA detektiert wurde (Abb. 4.11 b).

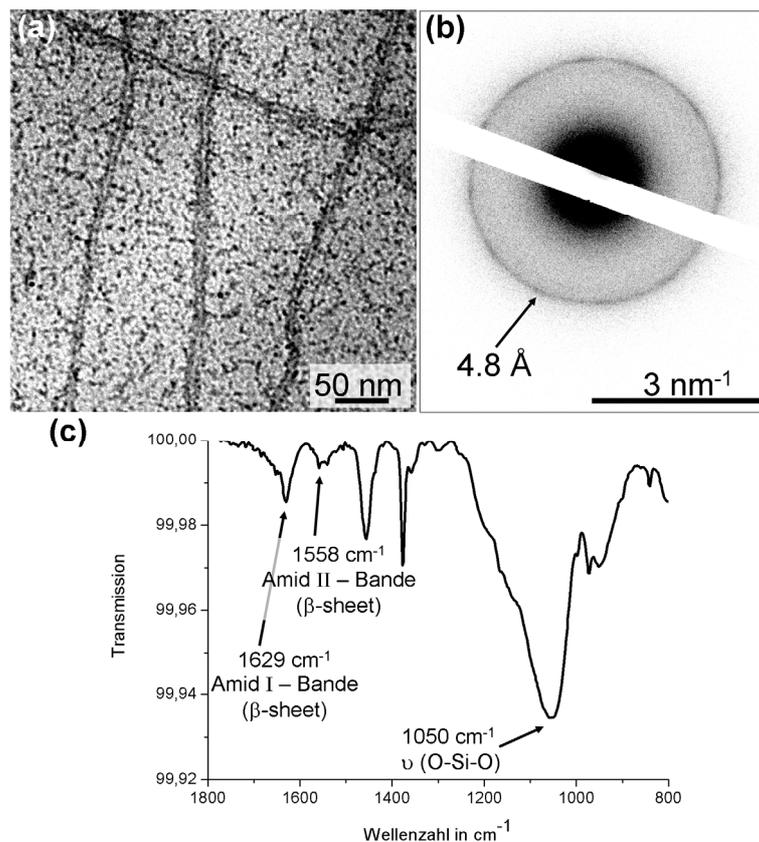


Abb. 4.11. TEM-Aufnahme von separierten Nanokompositbändern mit elektronenkontrastreichen Seiten und einem mittleren elektronenkontrastarmen Bereich (a). Nachweis der Hybridstruktur durch detektiertes d-spacing bei 4.8 \AA (charakteristisch für β -Faltblattbereiche) im SAED (b) und typische IR-Banden für PEO-Peptid(VT)-Nanobänder und Silikanetzwerk (c).

Aus den bisher beschriebenen Beobachtungen lässt sich eine erste Vorstellung über den Aufbau der Nanokompositbänder entwickeln. Die erhöhte Steifigkeit und die Zunahme der Längen sind auf den Einbau silikatischen Materials in die PEO-Peptid(VT)-Nanobänder zurückzuführen. Es wird eine Stabilisierung erreicht, die möglicherweise das Auseinanderbrechen längerer Fasern in der Lösung z.B. durch thermische Fluktuationen verhindert^[133]. Weiterhin sind die entstehenden Nanokompositbänder höher als die nicht silifizierten PEO-Peptid(VT)-Nanobänder. Die Auswertung des Höhenprofils der AFM-Messungen ergab ein Anwachsen um insgesamt $1.7 \pm 0.3 \text{ nm}$, was auf die Ausbildung einer $\sim 0.8 \text{ nm}$ dicken Silikaschicht auf beiden Seiten der PEO-Peptid-Nanobändern hindeutet (Abb. 4.12).

Es liegt nahe, dass sich der Peptidkern zentral innerhalb der Nanokompositbänder befindet und die Kondensation von diesem her startet, da sehr regelmäßige Faserquerschnitte beobachtet werden. Außerdem zeigen die TEM-Aufnahmen der Fasern mittig einen Bereich niedrigen Elektronenkontrastes, welcher beidseitig von 4.2 ± 0.2 nm breiten Bereichen mit hohem Elektronenkontrast flankiert wird (Abb. 4.11 a). Der elektronenkontrastarme Streifen hat eine Breite von 2.7 ± 0.2 nm, die mit der Breite des β -Faltblatt Peptidkerns übereinstimmt. Die Verteilung des Silikanetzwerkes innerhalb der Nanokompositbänder ist schematisch in Abbildung 4.12. dargestellt. Hierbei wird davon ausgegangen, dass der Peptidkern nicht wesentlich zum Elektronenkontrast beiträgt und die Silikaschicht in diesem Bereich dünner ist als an den Seiten. Die Kondensation setzt sich vom Kern her fort, so dass die Silikamatrix in die PEO-Knäule integriert wird und dort die elektronenkontrastreichen Gebiete bildet.

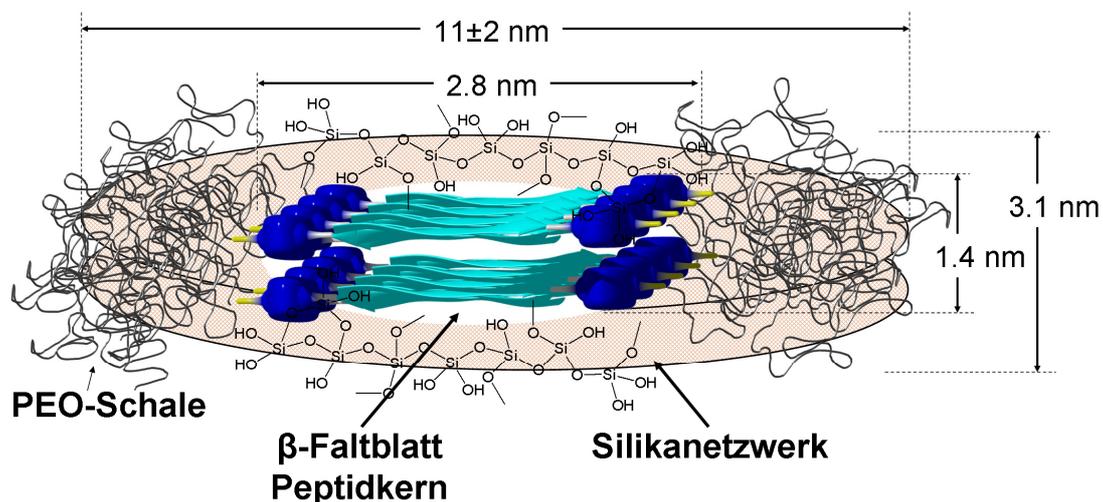


Abb. 4.12. Schematische Darstellung eines Protokompositbandes, welche die Verteilung des Silikanetzwerkes innerhalb der Struktur und die mittels AFM und TEM bestimmten Dimensionen verdeutlicht. Beide Seiten des Peptidkerns sind mit einer homogenen Silikaschicht bedeckt, die ebenfalls in die benachbarten PEO-Ketten eingebaut ist.

Ein Vergleich der durch AFM und TEM ermittelten Werte für die Breite der Nanokompositbänder (~ 15 nm bzw. ~ 11 nm) liegt im Bereich der Fehlergrenzen beider Methoden. Möglicherweise kann dies aber ebenso als Hinweis gedeutet werden, dass nicht oder schwach silifizierte PEO-Ketten, die einen schwachen Elektronenkontrast liefern, an den Seiten der Fasern vorliegen. Dies könnte vermutlich eine Erklärung für die kolloidale Stabilität der Nanokompositbänder bieten, da die unsilifzierten PEO-Ketten die Nanokompositbänder vor weiterer Aggregation abschirmen.

Die Isolierung der Nanokompositbänder unterstützt den für die Silifizierungsreaktion postulierten Mechanismus. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die funktionalen PEO-Peptid-Nanobänder die Funktion von Silika Morphogeneseproteinen übernehmen. Ähnlich wie Silikateine oder Silaffine besitzen die PEO-Peptid(VT)-Nanobänder eine starke Bindungsaffinität gegenüber Kieselsäure und können deren Kondensation zu Silikanetzwerken kontrollieren. Es war möglich mit einer Kieselsäurekonzentration, die nur rund dreimal höher ist, als die Durchschnittskonzentration in den Ozeanen, definierte nanoskopische Kompositfasern darzustellen. Außerdem konnte die Silifizierung in sehr kurzen Reaktionszeiten beobachtet werden.

4.2.2. Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Nanokompositbänder

Wie schon die makroskopischen Kompositfasern wurden die Nanokompositbänder in Bezug auf die strukturellen Einflüsse von Silikavorläuferüberschuss und Alterungszeit untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass bei Kieselsäurekonzentrationen unter 10 Äq. pro PEO-Peptid-Konjugat nur eine unzureichende Silifizierung statt fand, d.h. es wurden nur einige Fasern oder Teilbereiche von Fasern mit einer Silikahülle umgeben und keine einheitlichen Fasern ausgebildet. Dies konnte erwartet werden, da die Ausbildung eines durchkondensierten Silikanetzwerkes mit weniger als 10 Äq. Silikavorläufer theoretisch schlecht möglich ist. In weiteren Experimenten wurde unter Konstanthalten der Alterungszeit (10 Sekunden) der Silikaprecursorüberschuss zwischen 20 und 480 Äquivalenten variiert. Abbildung 4.13. präsentiert AFM-Bilder der Nanokompositbänder die nach Zugabe von 10, 20, 40 und 480 Äq. Silikavorläufer aus den Reaktionsgemischen isoliert wurden.

Es wird deutlich, dass je mehr Kieselsäureäquivalente in der Lösung vorliegen, desto mehr Silika wird in die Faserstrukturen integriert und damit nimmt die Höhe der Nanokompositbänder zu (Vergleich 3.1 nm (Abb. 4.13 a) zu 3.8 nm (Abb. 4.13 b)). Dies erhöht außerdem die Steifigkeit und „Klebrigkeit“ der Nanokompositbänder, bei Verlust der kolloidalen Stabilität. Konsequenterweise aggregieren die nanoskopischen Kompositbänder primär zu Bündeln (Abb. 4.13 c) und bei hohem Überschuss an Silikaprecursor zu mikroskopisch großen Faserknäulen (Abb. 4.13 d).

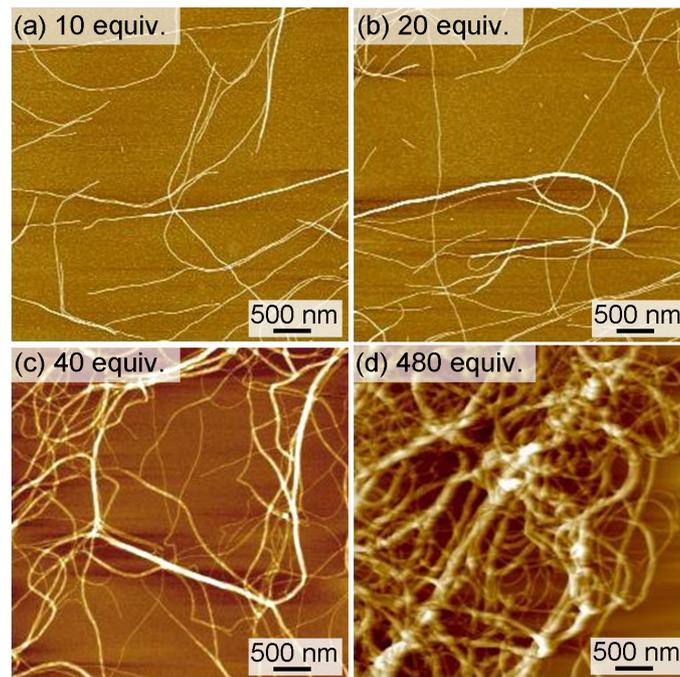


Abb. 4.13. AFM-Aufnahmen der Nanokompositbänder in Abhängigkeit von der zugefügten Menge an Kieselsäureäquivalenten. Mit steigendem Silikaüberschuss steigt die Tendenz der Nanokompositbänder zur Bündelbildung.

Für die verschiedenen Silikakonzentrationen wurde anschließend die Alterungszeit von 10 Sekunden über 10 Minuten auf 16 Stunden verlängert. Dabei scheint die Alterungszeit im Fall der mit 10 Äq. Kieselsäure entstehenden Nanokompositbänder keinen Einfluss auf deren Struktur zu haben. Nanokompositbänder und hydrolysiertes TMOS befinden sich in einer Gleichgewichtskonzentration, bei der im Laufe der Zeit kein zusätzliches Silika angelagert und eine Aggregation der Fasern nicht ausgelöst wird.

Bei leichter Erhöhung der Kieselsäurekonzentration auf 20 Äquivalente war unter den jetzt vorliegenden Reaktionsbedingungen ein zeitlicher Einfluss sichtbar. Nach einer Reaktionszeit von 10 s zeigten die AFM-Aufnahmen in Abbildung 4.14. steife Nanokompositbänder mit einer Höhe von 3.4 ± 0.3 nm und Längen von >5 μm . Weiteres Altern führte nach 10 min zu einer Koexistenz einzelner Kompositbänder (Höhe = 3.8 ± 0.3 nm) mit Faserbündeln, deren Höhen bis zu 15 nm betragen. Nach 16 h sind sämtliche Nanokompositbänder in Faserbündel integriert. Höhen- und Breitenwachstum lässt Faserbündel mit einem Querschnitt von 40×80 nm entstehen.

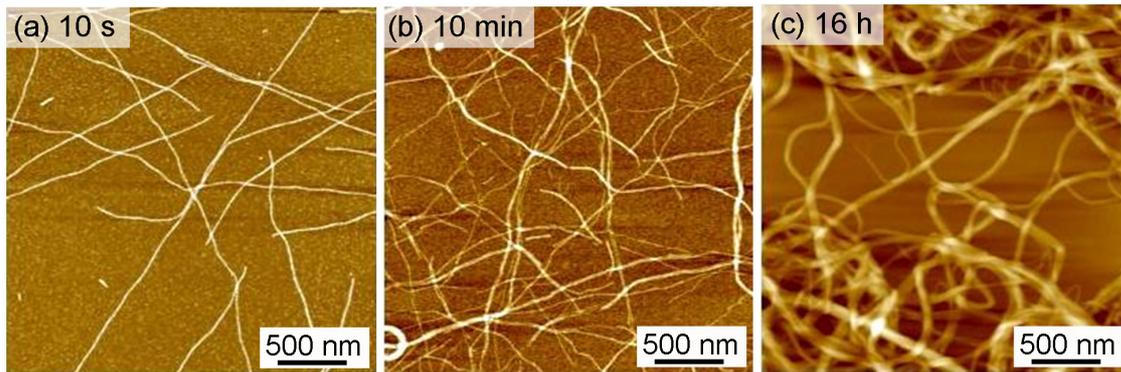


Abb. 4.14. Variation der Alterungszeit zwischen 10 Sekunden (a), 10 Minuten (b) bis zu 16 Stunden (c) bei einem Silikavorläuferüberschuss von 20 Äq. Die AFM-Aufnahmen zeigen einen Anstieg in der Menge an Faserbündeln mit zunehmender Alterungszeit.

Die Strukturanalyse der gebildeten Faserbündel wurde bei den makroskopischen Kompositfasern ausführlich beschrieben. Die Bündelung der Nanokompositbänder führt zu Strukturen, die eine einheitliche Packungsdichte von 5.8 nm und die parallele Ausrichtung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder entlang der Faserrichtung aufweisen.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass Nanokompositbänder schon bei sehr geringen Kieselsäurekonzentrationen in kurzer Zeit gebildet werden. Mit der Kontrolle der Konzentration an PEO-Peptid(VT)-Nanobändern und Silikavorläuferüberschuss lassen sich die Dimensionen der Kompositfasern gezielt zwischen nanoskopisch und makroskopisch einstellen. Dabei wird der hierarchische Aufbau beibehalten, was auf einen toleranten, robusten Selbstorganisationsprozess hinweist.

4.3. Plotten makroskopischer Kompositobjekte

Das biomedizinische Gebiet des „*Tissue engineering*“ beschäftigt sich mit dem Versuch synthetische Gerüststrukturen für das definierte Wachstum von Zellen und Gewebe zu erschaffen. Damit soll die Grundlage für das künstliche Erzeugen von Organen, Knochen und anderen Geweben gelegt werden. Diese synthetischen Gerüststrukturen (bisher meist abbaubare Polymere darunter Polymilchsäure, Polyester und Polycaprolacton) sollten ähnliche Materialeigenschaften haben wie die natürliche Gerüstmaterialien (Keratin, Collagen)^[134]. Nur so ist eine ausreichende Kompatibilität mit Zellen und Wachstumsfaktoren gegeben, die das regenerative Wachstum von Gewebe auslösen. Daher sind die makro- und mikrostrukturellen Eigenschaften der synthetischen Gerüstmaterialien entscheidend.

Sie sollten sich durch eine hohe Porosität mit untereinander vernetzten, zugänglichen Poren auszeichnen und leicht in eine beliebige makroskopische Form gebracht werden können^[135]. Des Weiteren müssen sie für den Einsatz in lebenden Organismen u.a. nicht giftig und nicht genverändernd sein. 3D-Druckprozesse (solid free-form fabrication, SFF)^[135, 136] wurden entwickelt, um die makroskopische Gestalt und die Porenstruktur kontrollieren zu können. In gedruckten Gerüststrukturen lassen sich der Grad der Porosität und die Porengröße gezielt einstellen. Meist werden die gewünschten Gitterstrukturen durch ein 90° versetztes Übereinanderlegen mehrerer Ebenen von Linien gleichen Abstandes aufgebaut (Abb. 4.15).

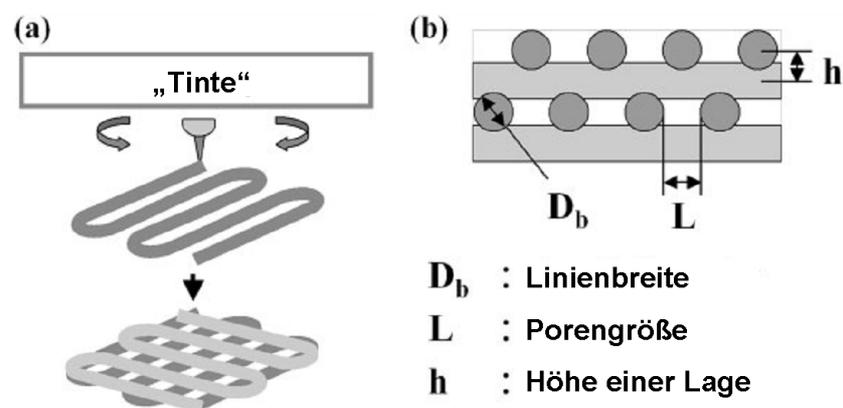


Abb. 4.15. Schematische Darstellung eines 3D-Druckprozesses (solid free-form fabrication, SFF), entnommen aus Lit.^[134].

Eine bei allen Druckprozessen zu beachtende Größe ist die Viskosität der gedruckten Lösungen („Tinte“). Sie muss einerseits so hoch sein, dass die gedruckten Objekte ihre Form halten und andererseits gute Verarbeitbarkeit gewährleisten. Weiterhin ist ein schnelles Aushärten der Strukturen nach dem Plotten nötig, um definierte Objekte mit eindeutigen Abgrenzungen zu generieren. Es gibt dabei je nach Art des eingesetzten Polymers verschiedene Möglichkeiten des Aushärtens. So können Ein- und Zweikomponenten-druckprozesse unterschieden werden. Eine Polymilchsäurelösung^[134] in Methylethylketon wird z.B. durch Verdampfen des Lösungsmittels gehärtet (Einkomponentenprozess). Chitosan dagegen wird in einem Zweikomponentenprozess verdruckt. Die Vernetzung des Gels erfolgt mit Natronlauge. Hierbei wird das Chitosangel entweder in ein Natronlauge-Bad injiziert^[137] oder beide Lösungen werden direkt nacheinander auf dieselbe Stelle geplottet^[135]. Weitere Möglichkeiten sind die Verarbeitung von Polymerschmelzen, -pasten oder -dispersionen und die Nutzung von reaktiven Monomeren^[136].

Definierte anorganische Netzwerke können ebenfalls durch Druckprozesse erhalten werden^[138]. Ein Druckprozess für Titandioxidstrukturen wurde auf Basis von Sol-Gel-Chemie mit Titanalkoxiden (z.B. Titandiisopropoxid-bisacetylacetonat) als „Tinte“ entwickelt. Die gedruckten Objekte härten in Folge von Vernetzungsprozessen durch Lösungsmittelverdampfung an der Luft. Anschließendes Calcinieren ergibt die gewünschte oxidische Phase. Es konnten Linienbreiten von ca. 270 nm erreicht werden.

Bei der Darstellung von silikatischen Materialien gelingt bisher die Kontrolle der Nano- und Mikrostrukturen, der Porengrößen, der Porengeometrien, der Chiralität und der Oberflächenfunktionalität sehr gut. Hierfür wird in Sol-Gel-Routen die Templatierung einer Vielzahl von Strukturen (kleine Moleküle bis hin zu Polymeramphiphilen) genutzt (siehe Kap. 2.2.). Andere Methoden wie Nanocasting, Nanocoating oder Spraytechniken^[139] werden ebenfalls zum kontrollierten Aufbau von Silikastrukturen verwendet. Eine entgegengesetzte Strategie beruht auf dem Versuch Biosilifizierungsreaktionen nachzuahmen. Hierbei werden meist anisotrope, nanoskopische Komposite erzeugt (siehe Kap. 4.1.1.). Die Prozessierung dieser Strukturen in makroskopische Objekte, unter Erhalt der Komplexität und Porosität, wäre von großem Interesse.

In Kapitel 4.1.2. wurde die Synthese von hierarchisch strukturierten Kompositfasern beschrieben. Diese makroskopischen Fasern bildeten sich innerhalb weniger Sekunden in einem selbstorganisierten Silifizierungsprozess. Während die Mikrostruktur der Kompositfasern mit sechs Hierarchieebenen sehr definiert ist, sollte die makroskopische Gestalt optimiert werden. Idealerweise könnten beide Ansätze, die peptidkontrollierte Silifizierung (bottom-up) und das Prozessieren in gewünschte makroskopische Formen (top-down), in einem integrierten Druckprozess vereinigt werden. Definierte Objekte mit einer hierarchisch aufgebauten Mikrostruktur wären auf diesem Weg zugänglich. Die vorgestellte Vernetzung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder durch Silika bietet alle Voraussetzungen für einen erfolgreichen Plotprozess. Schnelle Reaktionszeiten und die hohe Viskosität eines Reaktionspartners (der „Tinte“) sollten das Verschmieren von gedruckten Objekten minimieren. In einem Zweikomponentenprozess müsste dabei die zu druckende Komponente zum Aushärten mit der zweiten Komponente in definierter Form zusammengebracht werden. Auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse wurde folgender Plotprozess entwickelt.

4.3.1. Entwicklung des Plotprozesses – Aufbau des Setup

Im Gegensatz zum Prozess, in dem die PEO-Peptid(VT)-Nanobänder mit hydrolysiertem TMOS unter Schütteln zur Reaktion gebracht wurden, wurde bei dem entwickelten Plotprozess die unverdünnte Lösung der Nanobänder (20 mg/mL) in eine verdünnte Silikaprecursorlösung injiziert. In einer flachen Petrischale wurde das hydrolysierte TMOS/HCl-Gemisch in Ethanol (30 μ L/mL, 0.21 mol/L) vorgelegt. Die Lösung der PEO-Peptid-Nanobänder wurde, reguliert durch eine Spritzenpumpe, mit einer Geschwindigkeit von 12 mL/h (bzw. 0.2 mL/min) durch eine HPLC-Kapillare (Durchmesser = 250 μ m) in die Vernetzungslösung eingebracht. Dabei wurde die Kapillare knapp unterhalb des Lösungsmittelspiegels geführt, um eine definierte Injektion zu gewährleisten. Nach 30-90 Sekunden war das Ausfallen eines strukturierten, farblosen zweidimensionalen Objektes mit definierten Kanten zu beobachten.

Anfangs wurde die Kapillare mit der Hand geführt, was das Plotten von variablen 2D-Objekten erlaubte. Eine SEM-Analyse der handgeplotteten Objekte zeigte die bekannte aus netzwerkartigen Protokompositfasern aufgebaute Struktur. Um den Einfluss der Plotgeschwindigkeit auf die gebildeten 2D-Objekte untersuchen zu können und eine exakt geradlinige Bewegung zu garantieren, wurde der Druckkopf an den computergesteuerten Tisch einer Drehbank angebracht. Dazu wurde am Schlitten eine Halterung für die Kapillare installiert, die Petrischalen mit der Kieselsäurelösung wurden darunter platziert. Ein Foto der umgebauten Drehbank ist in Abbildung 4.16. zu sehen.

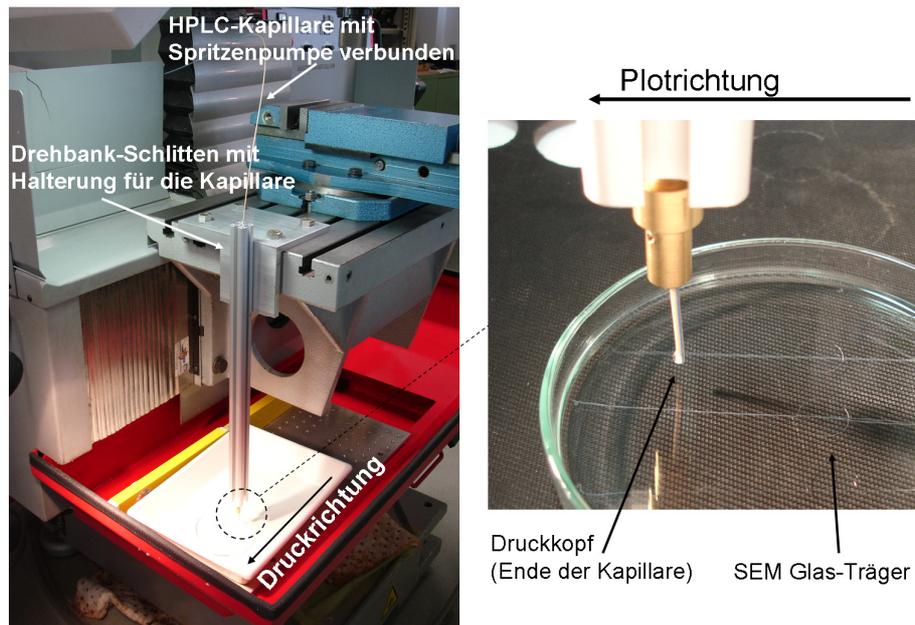


Abb. 4.16. Darstellung des verwendeten Aufbaus für den Plotprozess. Die Kapillare injizierte mit einer konstanten Ausflussgeschwindigkeit von 0.2 mL/min die Lösung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder in die Vernetzungslösung mit Silikaprecursor. Die Geschwindigkeit der Kapillare (Plotgeschwindigkeit) wurde über den Computer der Drehbank gesteuert und zwischen 0.5 und 2 m/min eingestellt.

Die Plotbewegung konnte nun mit einer konstanten Geschwindigkeit und vollständig geradlinig ausgeführt werden. Unter diesen reproduzierbaren Bedingungen zeigt Abbildung 4.17. den Einfluss der Plotgeschwindigkeiten auf die makroskopische Form des ausfallenden Kompositmaterials.

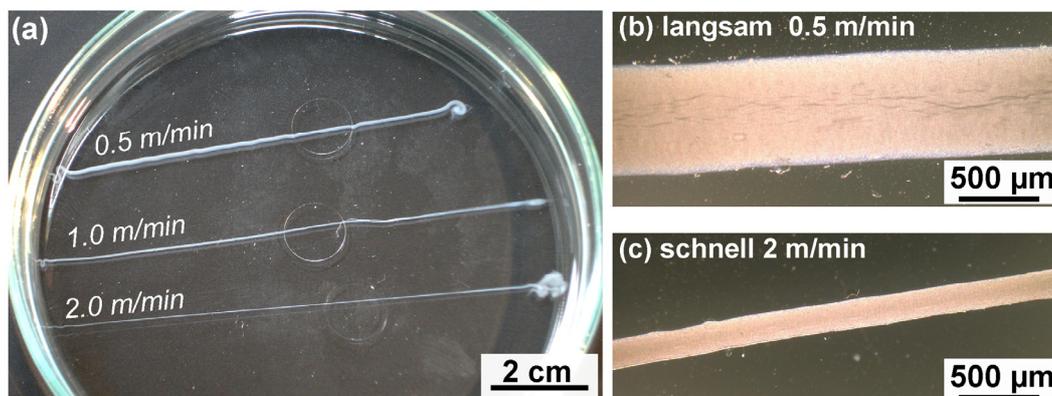


Abb. 4.17. Foto (a) und Lichtmikroskop-Aufnahmen (b) der geplotteten Kompositobjekte, die die scharfen Außenbegrenzungen der Objekte und die Abhängigkeit der Linienbreite von der Plotgeschwindigkeit verdeutlichen.

Mit diesem Setup wurden geradlinige Objekte mit unterschiedlichen Plotgeschwindigkeiten zwischen 0.5 und 2 m/min produziert. Beim Vergleich dieser Objekte ist der direkte Einfluss der Plotgeschwindigkeit auf die Linienbreite offensichtlich. Die erhaltenen Linien wurden unter Beibehaltung der Injektionsrate je breiter, desto langsamer die Plotgeschwindigkeit gewählt wurde (Abb. 4.17 a). So lassen sich die Linienbreiten der Kompositobjekte zwischen $\sim 700 \mu\text{m}$ (0.5 m/min, Abb. 4.17 b) und $\sim 150 \mu\text{m}$ (2 m/min, Abb. 4.17 c) einstellen. Dies kann mit der Reduktion der gedruckten Menge an PEO-Peptid-Nanobändern pro Zentimeter von 0.08 mg bei einer Geschwindigkeit von 0.5 m/min auf 0.02 mg bei 2 m/min und der daraus resultierenden Verringerung des Kompositmaterials erklärt werden. Die unterschiedlichen Plotgeschwindigkeiten haben sehr wenig Einfluss auf die Zusammensetzung des Kompositmaterials. Diese betrug 36:64 Gew.-% organischer zu anorganischer Anteil.

4.3.2. Charakterisierung der geplotteten Kompositfasernetzwerke

Unter den beim Plotten gegebenen Bedingungen werden flache zweidimensionale Strukturen erhalten. Die Höhe der Linien wurde aus AFM-Messungen mit $\sim 300 \text{ nm}$ bestimmt, wobei die Ränder flacher sind als die Mitte der Linie. Vermutlich entsteht anfänglich ein lockeres Silikanetzwerk, welches sich erst im Laufe der Zeit verfestigt. Dabei verlangsamt die relativ hohe Viskosität der geplotteten Lösung der Nanobänder ein diffusionsbedingtes seitliches Verlaufen der primär injizierten Linien. Die definierte Linienbreite und die scharf zur Umgebung abgegrenzten Kanten der Linien deuten aber darauf hin, dass eine kritische Vernetzungsdichte in der Struktur schnell erreicht wird. Hierbei muss eine schnelle Diffusion der Kieselsäuremoleküle in die Nanobandlösung ablaufen, um sowohl den Silifizierungs- als auch den Selbstorganisationsprozess der Protokompositfasern kontrollieren zu können.

Der Vorgang der Ausbildung der Kompositobjekte konnte unter dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden. Schon 15 s nach der Injektion der Nanobandlösung in die Kieselsäurelösung konnte der Beginn der Verfestigung der Strukturen detektiert werden (Abb. 4.18 a). Es wird deutlich, dass die äußeren Begrenzungen der geradlinigen Objekte während des Kondensationsprozesses konstant bleiben. Diese Beobachtung konnte mit Hilfe eines einfachen Farbstoffexperimentes bestätigt werden (Abb. 4.18 b). Die mit Malachitgrün angefärbte Lösung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder wurde in die Vernetzungslösung injiziert und der Prozess zeitlich verfolgt.

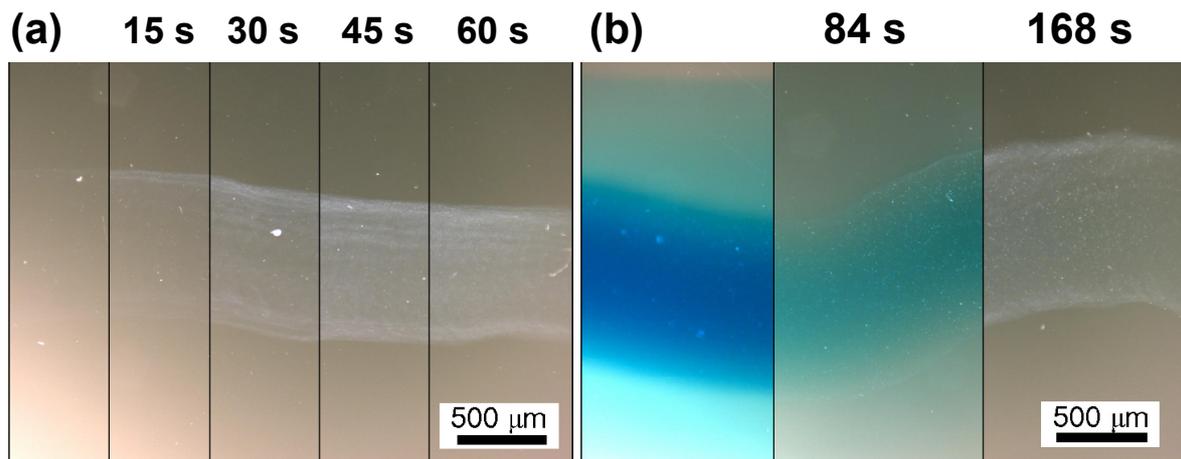


Abb. 4.18. Lichtmikroskop-Aufnahmen des zeitlichen Verlaufs der Kompositobjektbildung. Anhand der mit Malachitgrün angefärbten Lösung der Nanobänder (b) konnte gezeigt werden, dass während des Silifizierungsprozesses die Linienbreite stabil blieb und ein Verschmieren der Strukturen nicht beobachtet wurde.

Im zeitlichen Verlauf lässt sich eine verlangsamte Diffusion des Farbstoffes aus dem Bereich der Faserbildung erkennen. Die Breite der Linie ist direkt nach der Injektion nahezu identisch zur Breite des Kompositobjektes. Ein Vergleichsexperiment mit einer angefärbten P123-Lösung gleicher Konzentration zeigte dagegen eine sehr schnelle Diffusion des Farbstoffes aus dem Bereich des Plottens. Außerdem konnte keine Bildung von silikatischen Strukturen beobachtet werden.

Ähnlich wie die makroskopischen Kompositfasergeflechte zeichnen sich auch die geplotteten Objekte durch eine hierarchische Feinstruktur aus. Durch die Prozessierung der Kompositfasern wird der komplexe Strukturaufbau beibehalten. SEM-Messungen an den Kompositobjekten zeigten netzwerkartige Strukturen, die aus einheitlichen Strukturelementen mit einem Durchmesser von 80 ± 20 nm, den Protokompositfasern, aufgebaut sind. Es werden also in der Silifizierungsreaktion die gleichen Hierarchieebenen ausgebildet. Das legt nahe, dass trotz der unterschiedlichen Reaktionsführung im Batch- und im Plotprozess der Mechanismus der Kompositfaserbildung in beiden Fällen identisch verläuft. Der Plotprozess beeinflusst jedoch die anisotrope Ausrichtung der Protokompositfasern sehr stark.

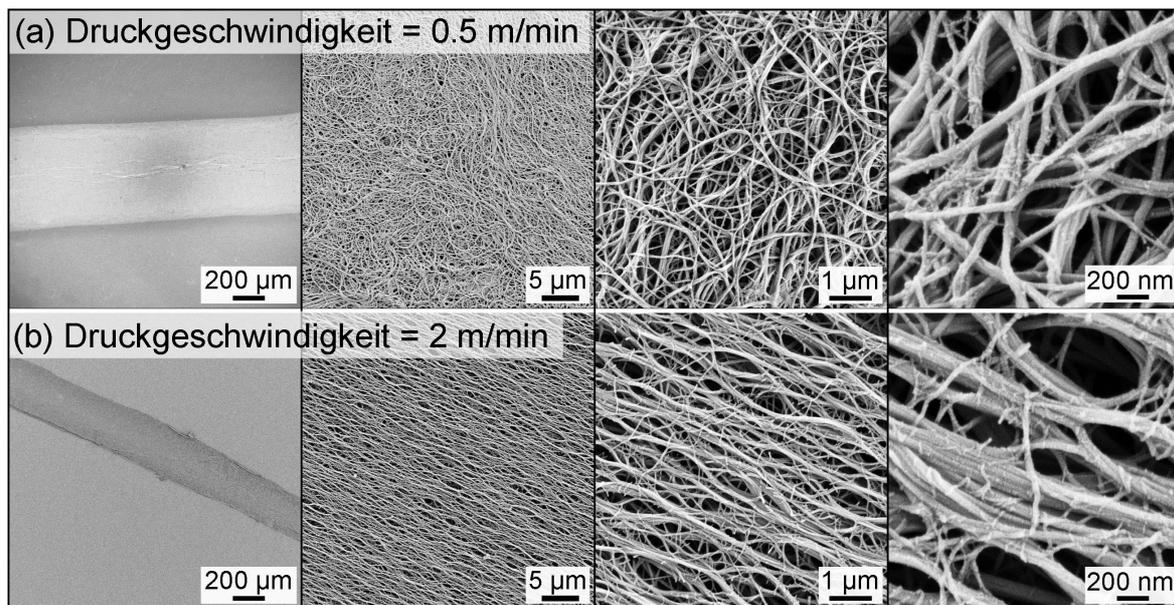


Abb. 4.19. SEM-Aufnahmen verschiedener Größenordnungen, die die Feinstruktur geplotteter, geradliniger Objekte widerspiegeln. Dabei wird eine Ausrichtung des Netzwerkes entlang der Faserrichtung mit Erhöhung der Plotgeschwindigkeit von 0,5 m/min (a) auf 2 m/min (b) sichtbar.

In Abbildung 4.19. stellt Fasern vergleichend gegenüber, die mit 0,5 m/min und 2 m/min geplottet wurden. Bei hohen Plotgeschwindigkeiten wird eine deutliche Ausrichtung der Protokompositfasern und des gesamten Silikanetzwerkes in Richtung der Faserachse sichtbar. Während des Fließens durch die Kapillare kommt es aufgrund des Geschwindigkeitsgradienten zu einer Verstreckung und Ausrichtung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder in der injizierten Lösung. Diese Ausrichtung wirkt sich beim Plotprozess indirekt weiter auf die Profaser- und Netzwerkbildung aus.

Neben den SEM-Aufnahmen lieferte eine Messung mit polarisierter IR-Strahlung weitere Hinweise auf die anisotrope Ausrichtung der Protokompositfasern. Da die β -Faltblätter entlang der Faserachse der Nanobänder ausgerichtet sind, können Rückschlüsse auf die Orientierung der Nanobänder in der Silikamatrix gezogen werden. Mit einer erhöhten Ausrichtung des Protokompositfasernetzwerkes (Plotgeschwindigkeit 2 m/min) konnte eine Erhöhung der Intensität der Amid-I Schwingungsbande bei Einstrahlung von parallel polarisiertem IR-Licht beobachtet werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Nanobänder und damit die β -Faltblattstrukturen anisotrop in der Silikamatrix ausgerichtet sind.

Die beobachtete Ausrichtung der Protokompositfasern im Netzwerk (Abb. 4.19) und der PEO-Peptid-Nanobänder innerhalb der Protofasern bei hohen Plotgeschwindigkeiten bestätigt zudem die Annahme eines schnell verlaufenden Silifizierungsprozesses. Eine diffusionsbedingte Reorganisation der durch das Plotten ausgerichteten Nanobänder hin zu einer weniger organisierten Anordnung wird unterbunden.

Neben der Plotgeschwindigkeit haben auch andere Reaktionsparameter Einfluss auf den Plotprozess. Die Konzentration der Lösung der PEO-Peptid-Nanobänder darf nicht zu gering gewählt werden, da mit Abnahme der Viskosität der gedruckten Lösung die Linienbreite erheblich steigt und bei verdünnten Lösungen keine definierten Objekte mehr gebildet werden. Mit Erhöhung der Konzentration an Silikavorläufer in der Vernetzungslösung konnte die Geschwindigkeit der Kompositobjektbildung erhöht werden. Dies ist konsistent mit der Bedingung, dass die Kieselsäure an den Ort des Plottens und in die geplottete Nanobandlösung hinein diffundieren muss. Es wurde außerdem beobachtet, dass die Kompositobjektbildung schneller verläuft, wenn die Hydrolysezeit des Silikaprecursors auf 2-3 h verlängert wurde.

Die bisherige Methode um Plotgeschwindigkeit und Plotbewegung zu kontrollieren, war auf die geradlinige Bewegung des Drehbankaufsatzes beschränkt. Das Potenzial der Methode soll hier durch einige Freihand geplottete Objekte demonstriert werden.

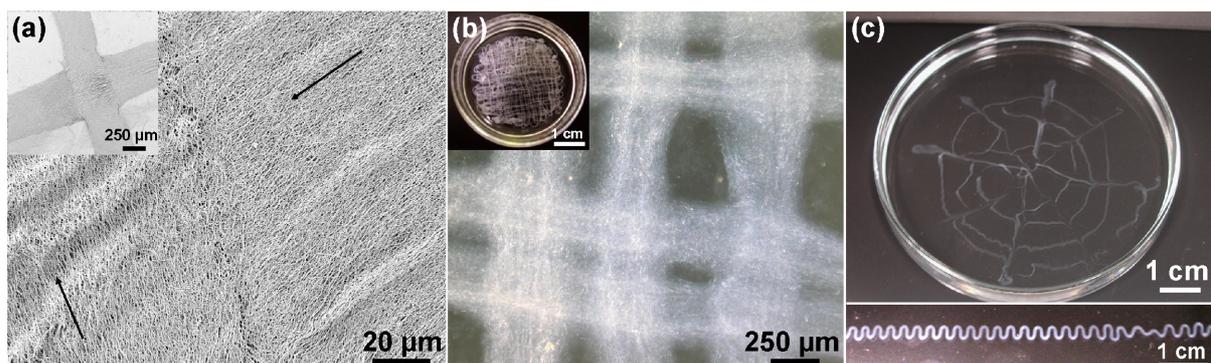


Abb. 4.20. Auswahl an Freihand-Strukturen, die das Potenzial des Plotprozesses anschaulich machen sollen (SEM-Aufnahmen eines Kreuzes zweier Kompositlinien (a); Foto und Lichtmikroskopbild einer Gitternetzstruktur (b); Fotos von gebogenen Linien und einer Wellenlinie (c)).

Abbildung 4.20. c zeigt z.B. eine durch Schwingungen der Kapillare beim Plotten hervorgerufene Wellenlinie. Des Weiteren können Kreuzungen von zwei Fasernetzwerken dargestellt werden (Abb. 4.20 a). Beide Plotrichtungen lassen sich anhand der Ausrichtung der Protokompositfasern identifizieren. Das Übereinanderlegen mehrerer Linien führt zu Gitterstrukturen (Abb. 4.20 b), die per Hand jedoch nicht annähernd so präzise geplottet werden können, wie computergesteuert. Zur Visualisierung, dass durchaus auch gebogene Linien plottbar sind, wurde ein Spinnennetz gezeichnet (Abb. 4.20 c).

Kürzlich konnten die Möglichkeiten des Plotprozesses erweitert werden, in dem der Druckkopf mit einem computergesteuerten Roboterarm (Abb. 4.21 a) verbunden wurde. Damit sind Bewegungen in alle drei Raumrichtungen und das Plotten von 2D-Objekten und möglicherweise auch 3D-Objekten jeglicher Art möglich. Exemplarisch soll ein mit dem Roboterarm dargestelltes Netzwerk gezeigt werden (Abb. 4.21 b), welches im Vergleich zu dem Freihand geplotteten Netzwerk (Abb. 4.20 b) sehr regelmäßige Linienbreiten und -abstände hat.

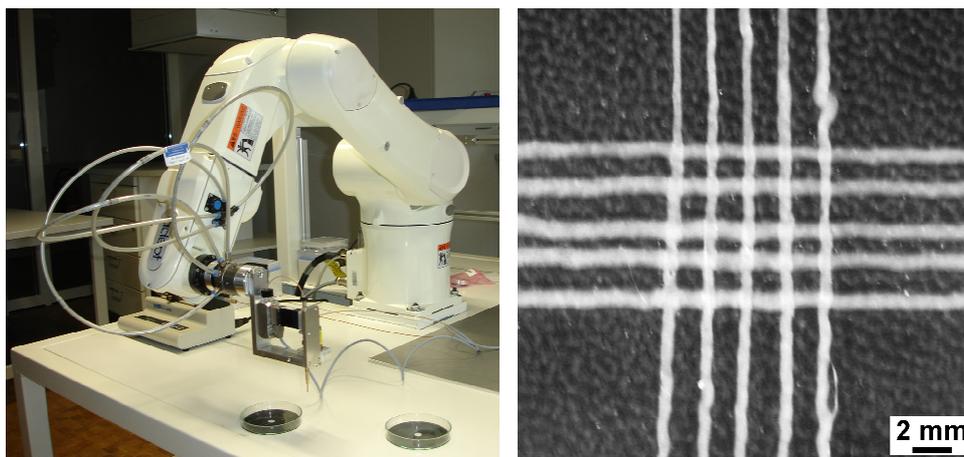


Abb. 4.21. Foto des Roboterarms (Fraunhofer-Institut für biomedizinische Technik (IMBT), Potsdam) mit Aufsatz für den Druckkopf (a); Foto eines geplotteten Netzwerkes mit einer Linienbreite von 500 μm und einem Linienabstand von 2 mm.

4.3.3. Mesoporöse Silikanetzwerkstrukturen

Geplottete Kompositfasernetzwerke können als Vorstufen für definierte, poröse Silikamaterialien dienen. Durch schrittweises Calcinieren der Kompositobjekte bei maximal 450 $^{\circ}\text{C}$ wurden die organischen Bestandteile quantitativ entfernt. Dies wurde mittels IR-Spektroskopie anhand der alleinig detektierten O-Si-O-Schwingungsbande bei 1052 cm^{-1} nachgewiesen. Die Fasermorphologie, Mikrostruktur und Ausrichtung des Netzwerkes bleiben nach dem Calcinierungsvorgang erhalten (Abb. 4.22).

In Silikanetzwerken mit makroskopischen Dimensionen tritt durch Nachkondensationsprozesse (auch während des Calciniereins) ein Schrumpfen der Struktur auf, da das Netzwerk verdichtet wird. Dem Schrumpfen des Silikanetzwerkes weichen diese makroskopischen Silikate durch das Ausbilden von Mikrorissen aus. Dieses Verhalten wurde auch für die durch Calciniereins erhaltenen Silikaobjekte beobachtet (Abb. 4.22 a).

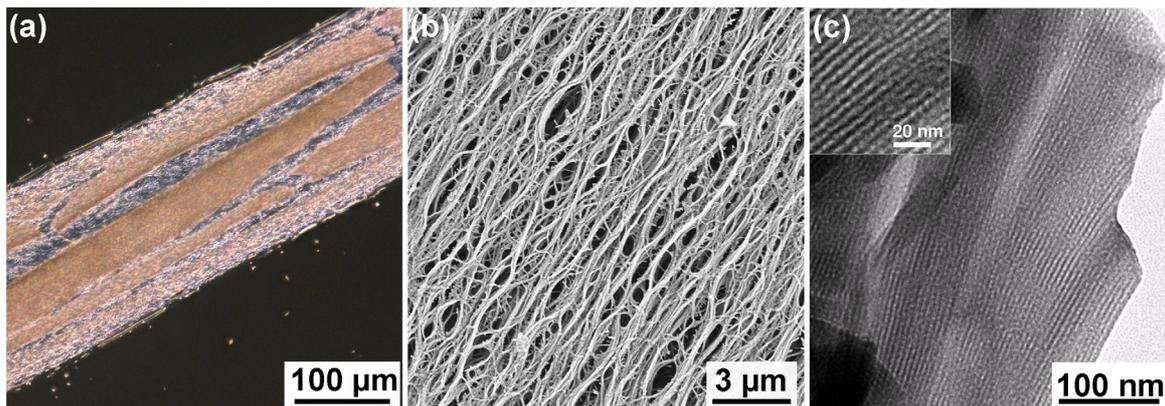


Abb. 4.22. Übersicht über die strukturellen Ebenen calcinierter Silikalinen (Lichtmikroskop-Aufnahme eines bei 450 °C calcinierten Fasernetzwerks (a), Einblick in die Mikrostruktur der Silikanetzwerke mittels SEM-Messungen (b) und TEM-Aufnahme der regelmäßigen, in Plotrichtung liegenden, zylindrischen Poren (c)).

Die erhaltenen mesoporösen Silikaobjekte zeichnen sich durch das Vorhandensein von zylindrischen Poren mit einer Porengröße von 3 ± 0.2 nm aus. Diese hochgeordnete Porenstruktur ist durch eine deutliche Ausrichtung der über große Bereiche parallel vorliegenden Poren in Richtung der Hauptfaserachse gekennzeichnet. Aus der gemessenen Streukurve (Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS)) der calcinierten Silikaobjekte konnte ein Porenabstand von 5.8 nm berechnet werden. Der gemessene Porenabstand ist vergleichbar mit dem nicht prozessierter Kompositfasern einer Alterungszeit von 48 h. Des Weiteren wurde mittels Kryptonadsorptionsmessungen eine spezifische Oberfläche von $480 \text{ m}^2/\text{g}$ bestimmt. Diese mesoporösen Silikaobjekte sind durch ihre bevorzugte Porenorientierung, die sich eindeutig mit der Plotrichtung korrelieren lässt, und der variablen äußeren Form interessant für vielfältige Anwendungen, u.a. als Gerüstmaterial für das Wachstum von Zellen und Knochenimplantate.

4.4. *Materialeigenschaften der Kompositfasern*

Das Hauptziel der Darstellung von Kompositmaterialien ist die Kontrolle der Materialeigenschaften, die aus der Synergie verschiedener Materialien hervorgehen. Dabei ist nicht nur die Zusammensetzung eines Komposits sondern auch dessen struktureller Aufbau entscheidend. Biologische Kompositmaterialien zeichnen sich durch ein hervorragendes Zusammenwirken der Komponenten aus. Evolutionär wurden Materialien geschaffen, die perfekt auf die Auftretenden mechanischen Belastungen angepasst sind. Die makroskopischen, mechanischen Eigenschaften synthetischer sowie natürlicher Komposite können mit klassischen Prüftests, wie Zug-Dehnungs-Messungen, Druckverformungstests, Biegeversuchen, Bruchtests oder Eindruck-(Indentations-)verfahren, ermittelt werden. Bei sehr kleinen oder makroskopisch inhomogenen Proben erlaubt ein spezielles, auf Mikrostrukturen anwendbares Indentationsverfahren die Messung von Deformationsprozessen. Beim Verfahren der Nanoindentation^[140] wird ein Diamantprüfkopf in die Probe gedrückt, wobei die Eindringtiefen bei < 200 nm liegen. Während der Messung werden ausübende Kraft und Eindringtiefe des Indenters kontinuierlich detektiert. Aus den erhaltenen Be- und Entlastungskurven lassen sich die Härte des Materials im Bereich der Messung (nanoskopische Größenordnung) und das reduzierte Eindruckmodul berechnen. Dafür wird aus der Eindringtiefe und der bekannten Geometrie des Prüfkopfes nach *Oliver und Pharr* die Fläche des Abdrucks bestimmt. Oft werden sogenannte Berkovich-Indenter verwendet, deren Prüfkopf als Geometrie eine dreiseitige Pyramide aufweist. Die entstehende Fläche A_c ist eine Funktion der Eindringtiefe h_c ($A_c = f(h_c)$) und in erster Näherung $A_c \sim 24.5 \cdot h_c^2$. Die Nanohärte H ist definiert als $H = P_{\max}/A_c$, mit P_{\max} = maximale Indentationskraft. Das reduzierte Eindruckmodul berechnet sich nach $E_r = (S \cdot \sqrt{\pi}) / (2 \cdot \sqrt{A_c})$, wobei S , die Kontaktsteifigkeit, aus dem Anstieg der Entlastungskurve ermittelt wird.

Die in dieser Arbeit bisher vorgestellten Kompositfasergeflechte zeichnen sich durch einen sehr interessanten strukturellen Aufbau aus und können dank des entwickelten Plotprozesses in definierte makroskopische Formen gebracht werden. Daher sollte untersucht werden, wie sich die strukturellen Eigenschaften auf die mechanischen Eigenschaften auswirken. Dabei werden die Ergebnisse mit denen synthetischer Glasfasern und Silikanadeln der Kieselschwämme verglichen. Nanoindentationsmessungen wurden stellvertretend an den spontan gebildeten makroskopischen Kompositfasergeflechten vorgenommen.

In Zukunft ist die Durchführung von klassischen Zug-Dehnungs-Tests und Biege-Tests an geplotteten Kompositobjekten wünschenswert, da diese Aussagen über makroskopische, mechanische Eigenschaften der Probe liefern würden.

Mit einer Nanohärte von 0.99 ± 0.2 GPa erreichen die Kompositfasern etwa ein Drittel der Härte von Bioglasfasern der Glasschwämme (z.B. *Rosella racovitza* mit 3.22 ± 0.33 GPa^[141]) und ~13% der Härte synthetischer Glasfasern. Dafür wurde mit ~10 GPa ein reduziertes Eindrückmodul gemessen, das eine viermal höhere Elastizität in Bezug zu Glasschwamm Silikanadeln und einen siebenmal höheren Wert im Vergleich zu optischen Glasfasern zeigt. Die geringere Härte und höhere Elastizität lässt sich auf den relativ hohen Anteil (~40%) an verformbaren, organischen Komponenten in den Kompositfasern zurückführen. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass eine Kontrolle über die Zusammensetzung und vor allem den inneren Aufbau von Kompositmaterialien es ermöglicht, die Materialeigenschaften stark zu variieren ohne die Bestandteile des Komposits verändern zu müssen.

Die Materialeigenschaften der Kompositfasern werden vermutlich entscheidend durch die Variation des Silikanetzwerkes beeinflusst. Der bis hierhin verwendete Silikaprecursor TMOS kann mit allen vier Bindungen Kondensationsreaktionen eingehen und bildet so sehr stabile, aber steife Silikanetzwerke aus. Unter Verwendung von Organosilanen des Typs $(RO)_3SiR'/(RO)_2SiR'_2$ oder verbrückter Organosilane $(R'O)_3Si-R-Si(OR')_3$ könnten weniger vernetzte und damit weichere Silikastrukturen entstehen. Von besonderem Interesse wäre die Darstellung eines faserverstärkten Kompositmaterials, in dem die harten, nanoskopischen Kompositbänder in eine weiche Matrix aus vernetzten Polydimethylsiloxan(PDMS)-Ketten gerichtet eingebettet wären. Solch ein Kompositmaterial würde den strukturellen Aufbau von Knochen (siehe Kap. 2.1.2.) auf der Hierarchieebene der Einbettung calcinierter Collagenfibrillen in eine weiche extrazelluläre Matrix imitieren.

5. Hierarchische Strukturen durch gezielte Funktionalisierung von PEO-Peptid-Nanobändern

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine gerichtete Organisation und Vernetzung der in Kapitel 2.5. vorgestellten PEO-Peptid-Nanobänder über ihre Oberflächenfunktionalitäten angestrebt. Die Möglichkeiten einer Vernetzung der in vorangegangenen Arbeiten synthetisierten hydroxyfunktionalisierten PEO-Peptid(VT)-Nanobänder durch Silika wurden in Kapitel 4. diskutiert. Ausgehend von dieser gerichteten Vernetzung der Nanobänder durch anorganische Matrizes, sollte das Konzept nun auf eine koordinativ- oder ionenvermittelte Organisation übertragen werden. Es sollten rein organische oder metallorganische Komposite erzeugt werden, deren Materialeigenschaften sich deutlich von denen der Silikakompositfasern unterscheiden würden. In der Natur werden ebenfalls vielfältige Arten an Wechselwirkungen beim Aufbau hierarchischer Strukturen genutzt. Neben elektrostatischen bzw. ionischen Wechselwirkungen sind das vor allem Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte sowie entropiegetriebene, hydrophobe Wechselwirkungen^[142].

Um andere Sekundärwechselwirkungen zwischen den Nanobändern zu arrangieren, müssen die Oberflächen der Nanobänder definiert mit funktionalen Gruppen versehen werden. Dies kann erreicht werden, in dem die Primärstruktur der Peptidsegmente der PEO-Peptid-Konjugate variiert wird. Unter der Voraussetzung eines ähnlichen Aggregationsmechanismus für alle PEO-Peptid-Konjugate, können die entstehenden Nanobänder so konzipiert werden, dass beidseitig genau definierte funktionelle Gruppen präsentiert werden. Die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren bieten eine Auswahl an polaren, ionischen oder metallkoordinierenden Seitenkettenfunktionalitäten. Allerdings sollte bei Variationen der Aminosäuresequenz eine hohe Tendenz zur Ausbildung des antiparallelen β -Faltblattmotivs beibehalten werden, da dies die Triebkraft zur Bildung der Nanobandstrukturen darstellt. Hierfür sollten Aminosäuren gewählt werden, die bevorzugt in β -Faltblattstrukturen auftreten. Des Weiteren ist das Hinzufügen einzelner Aminosäuren mit gewünschter Funktion zu der bekannten Valin-Threonin-Sequenz möglich. Die Grundstruktur einer alternierenden Sequenz aus polaren und unpolaren Seitenketten sollte in beiden Fällen beachtet werden. Diese Anordnung der Aminosäuren unterstützt die β -Faltblattbildung und sorgt dafür, dass sich jede zweite Aminosäure auf der gleichen Seite der entstehenden Bandstruktur befindet (siehe Kapitel 2.3.1.).

5.1. Imidazolfunktionalisierte PEO-Peptid-Nanobänder

Für die Oberflächenfunktionalisierung der Nanobänder bieten sich Imidazolgruppen an, die durch den Einbau von Histidinen in die Peptidstränge zugänglich sind. Die somit auf der Oberfläche präsenten Imidazolgruppen sind für Koordinationsmöglichkeiten mit Metallionen bekannt, können als positiv geladene Gruppen aber auch ionenvermittelte Komplexe ausbilden.

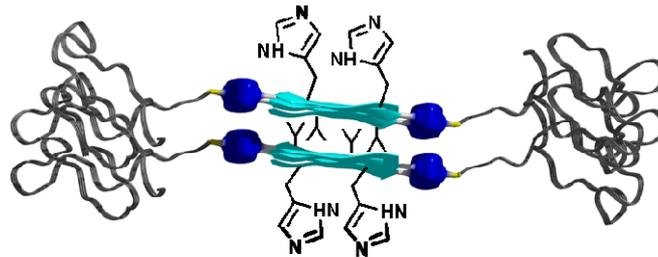


Abb. 5.1. Idealisierte, schematische Darstellung eines PEO-Peptid-Nanobandes (Seitenansicht), die die Oberflächenfunktionalisierung mit Imidazolgruppen verdeutlicht (Die Anzahl der Aminosäureseitenketten wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit reduziert.).

Komplexe von Metallionen mit Imidazolgruppen sind für verschiedene katalytische Zentren in Enzymen, in der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)^[143] und für synthetische, α -helikale Peptide^[144] beschrieben worden. Nachfolgend sollen daher die Synthese und die Charakterisierung von PEO-Peptid-Konjugaten, in die Histidine integriert wurden, beschrieben sowie das Komplexierungsverhalten der entstehenden PEO-Peptid-Nanobänder untersucht werden.

5.1.1. Synthese imidazolfunktionalisierter PEO-Peptid-Konjugate

Aus den vorangehend dargelegten Gründen wurde für die Synthese der imidazolfunktionalisierten PEO-Peptid-Konjugate eine alternierende Sequenz aus Valin und Histidin gewählt. Histidin besitzt ähnlich wie Threonin eine starke Tendenz zur Ausbildung von β -Faltblattmotiven. Im Gegensatz zu der Aminosäuresequenz aus zwei Wiederholungseinheiten Valin-Threonin wurden die Peptidstränge der imidazolfunktionalisierten Konjugate um eine Wiederholungseinheit auf (Val-His)₃ verlängert. Mit der Verwendung von Histidinseitenketten werden, im Gegensatz zu den PEO-Peptid(VT)-Konjugaten, deutlich polarere, besser wasserlösliche und vor allem kationische Imidazolgruppen in die Konjugate integriert.

Bei der Ausbildung der Sekundärstruktur würde somit eine β -Faltblattseite entstehen, die eine relativ hohe Ladungsdichte aufweist. Um diesen destabilisierenden Effekt auszugleichen wurde die Aminosäuresequenz um zwei Aminosäuren verlängert. Dies ermöglicht dem System mehr Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden, was zur Stabilisierung der β -Faltblattstruktur beiträgt. Da diese Verlängerung der Aminosäuresequenz möglicherweise mit einer zu starken, kinetisch kontrollierten Aggregation einhergeht, wurde das zweite Konjugat so gewählt, dass es dynamischer bezüglich der β -Faltblattbildung ist. Dazu wurde der Peptidstrang um ein Histidin verkürzt. Dadurch entsteht ein System, welches ein ausgeglichenes Verhältnis polarer, ionischer Gruppen (vier Valine + zwei *N,N*-Dimethylglycine) zu unpolaren Gruppen (sechs Valine) besitzt. Die Anzahl der Valinseitenketten wurde konstant gehalten, um nur Einflüsse der vorhandenen Imidazolgruppen untersuchen zu können.

Die in Abbildung 5.2. dargestellten PEO-Peptid-Konjugate **(dmGly-His-Val-His-Val-His-Val)₂NH-Templat-PEO₇₂ = VH1** (a) und **(dmGly-Val-His-Val-His-Val)₂NH-Templat-PEO₇₂ = VH2** (b) wurden auf Grundlage dieser Überlegungen synthetisiert.

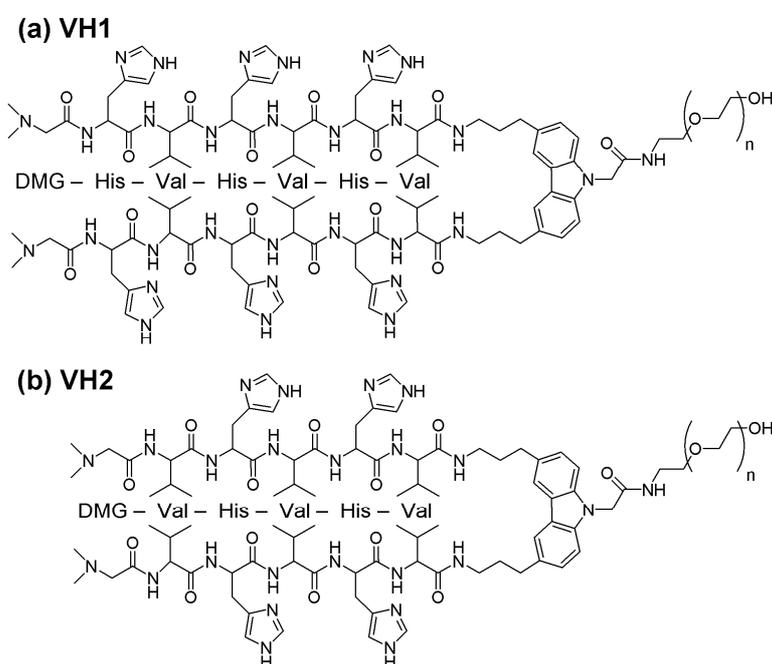


Abb. 5.2. Chemische Struktur der imidazolfunktionalisierten PEO-Peptid-Konjugate **VH1** und **VH2**, die sich durch eine alternierende Valin-Histidin-Sequenz auszeichnen.

Im Anschluss wurde die Aggregationstendenz und das Komplexierungsverhalten in Bezug zur Länge der Peptidstränge und zur Dichte der funktionellen Gruppen anhand der in Abbildung 5.2. gezeigten PEO-Peptid-Konjugate untersucht.

Der Aufbau der Konjugate **VH1** und **VH2** erfolgte grundsätzlich analog zur Synthese der PEO-Peptid(VT)-Konjugate (siehe Kapitel 2.5.1.). Das Templatmolekül 3,6-Bis(3-[*N*-[tert-Butoxycarbonyl]-amino]propyl)-carbazol-9-essigsäure wurde durch Mehrfachkupplungen (im Allgemeinen 3 bis 4) mit PyAOP/HOBT in DFM an ein PEO-funktionalisiertes TentaGel[®] PAP Harz ($M_{n(\text{PEO})} \sim 3200$ g/mol) gekuppelt. Die Assemblierung des Peptides erfolgte vollautomatisiert an einem ABI 433a Peptidsynthesizer nach Standard Fmoc-Protokollen. Nach den jeweils ersten drei Aminosäuren (Valin-Histidin-Valin) wurde der Prozess nach jeder Kupplung unterbrochen. Kaiser-Tests an entnommenen Harzproben bestätigten die vollständige Kupplung jeder weiteren Aminosäure. Der *N*-Terminus der PEO-Peptid-Konjugate wurde mit *N,N*-Dimethylglycin versehen. Unter stark sauren Bedingungen (99% TFA + 1% TMBS (v/v)) wurden **VH1** und **VH2** innerhalb von 6 h vom Harz abgespalten. Die Rohprodukte wurden aus Ether gefällt und anschließend durch Dialyse gegen Wasser (MWCO ~ 1000) und Gefriertrocknung gereinigt.

Die Ausbeuten der PEO-Peptid-Konjugate bezogen auf den Beladungsgrad des Harzes (0.44 mmol/g; 0.1 mmol Ansatz) betragen 61% (**VH1**) und 65% (**VH2**). Diese Werte sind vergleichbar mit den Ausbeuten des PEO-Peptid(VT)-Konjugates (bis zu 49%).

Mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden beide Konjugatmoleküle eindeutig identifiziert. Es wurde jeweils nur eine homologe Reihe an Signalen detektiert, die den Produkten **VH1** mit $[M + K]^+ = 5135.7$ Da ($n_{\text{PEO}} = 72$; $M_{\text{theor.}} = 5135.7$ Da) und **VH2** mit $[M + H]^+ = 4822.1$ Da ($n_{\text{PEO}} = 72$; $M_{\text{theor.}} = 4822.6$ Da) zugeordnet werden konnten. Die Differenz der Signale beträgt 44 Da, entsprechend einer Wiederholungseinheit des PEO-Blocks. Weder Auslassungssequenzen, Konjugate mit fehlender PEO-Kette noch freie PEO-Ketten konnten detektiert werden, was innerhalb der Genauigkeit der Methode einen fehlerfreien Syntheseverlauf belegt. NMR-spektroskopisch wurde die Reinheit der Verbindungen nachgewiesen. Eine Integration der Protonensignale der Peptidseitenketten (z.B. Methylgruppen der Valine, Imidazolgruppen der Histidine) und des Templatmoleküls gibt Aufschluss über die Verhältnisse der beteiligten Gruppen zueinander. So kann die Möglichkeit von Fehlsequenzen ausgeschlossen werden. Beim Messen der NMR-Spektren von **VH1** in Wasser fiel auf, dass die Peptidsignale (insbesondere die Imidazol-Protonensignale) nur schlecht detektiert werden konnten. Dies legt eine Aggregation von **VH1** in Wasser nahe, die mit einer Abschirmung der Peptidseitenketten einhergeht. Dieser erste Hinweis auf das Vorhandensein aggregierter Moleküle konnte in den nachfolgenden Untersuchungen bestätigt werden.

5.1.2. Aggregationsverhalten der PEO-Peptid-Konjugate VH1 und VH2

Die PEO-Peptid-Konjugate wurden speziell hinsichtlich ihrer Aggregation in Lösung untersucht. Dabei wurden polare, protische Lösungsmittel wie Wasser und Methanol verwendet. Da das Entstehen der stäbchenförmigen Nanobänder direkt mit der Ausbildung von β -Faltblattstrukturen zusammenhängt, werden nachfolgend zunächst die Ergebnisse der Circular dichroismus(CD)-Messungen beschrieben. Mit der Ausbildung von Sekundärstrukturen kommt es zur spezifischen Kopplung von UV-Chromophoren, so dass für jede Peptidsekundärstruktur ein charakteristisches CD-Spektrum erhalten wird. Messungen von CD-Spektren sind daher eine geeignete Methode, um Aussagen über die Bildung eines β -Faltblattmotivs in den Lösungen der PEO-Peptid-Konjugate zu treffen.

Die gefriergetrocknete Verbindung **VH1** wurde mit einer Konzentration von 0.5 mg/mL in Wasser oder Methanol gelöst und innerhalb von 1 h CD-spektroskopisch untersucht (Abb. 5.3 a, b).

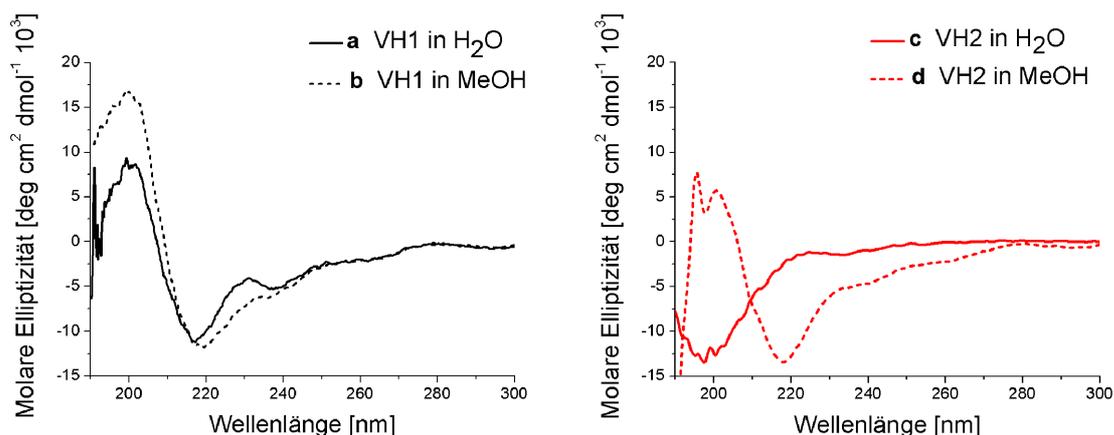


Abb. 5.3. CD-Spektren des PEO-Peptid-Konjugates **VH1** (schwarz) in Wasser (a) und Methanol (b) sowie **VH2** (rot) in Wasser (c) und Methanol (d), welche die Sekundärstrukturbildungstendenz der Peptidstränge veranschaulichen.

In beiden Lösungsmitteln zeigten die CD-Spektren (Abb. 5.3 a, b) den charakteristischen Verlauf für β -Faltblattstrukturen, mit Minima bei 217 nm (H₂O) bzw. 219 nm (MeOH) und Maxima bei 199 nm (H₂O, MeOH). In Wasser wurde ein zusätzliches Minimum bei 237 nm beobachtet. Vermutlich kann dies entweder auf Einflüsse der Imidazolgruppen oder des Templatmoleküls zurückgeführt werden. Ein Minimum bei ähnlichen Wellenlängen wurde auch in den CD-Spektren der PEO-Peptid(VT)-Konjugate beobachtet, was den Beitrag ähnlich positionierter Carbazolsysteme nahe legt.

Beim Vermessen der Lösungen nach 1 Woche konnten keine Veränderungen in Art oder Intensität der Spektren festgestellt werden. Die Bildung der Sekundärstruktur scheint somit in beiden Lösungsmitteln innerhalb einer Stunde abgeschlossen zu sein.

CD-Spektren von **VH2** wurden bei gleicher Konzentration (0.5 mg/mL) ebenfalls in Wasser und Methanol aufgenommen. In diesem Fall wurden nur in MeOH β -Faltblattstrukturen gebildet, ersichtlich durch das typische Minimum bei 218 nm und das Maximum bei 199 nm (Abb. 5.3 c). In Wasser lag ein Minimum bei 199 nm vor, welches auf das Vorhandensein einer ungeordneten, statistischen Knäuelstruktur hindeutet (Abb. 5.3 d). Die im Verlauf einer Woche gemessenen CD-Spektren zeigten keine Veränderungen der Sekundärstrukturen an.

Aus der Proteinfaltung sind verschiedene Triebkräfte für die Ausbildung von Sekundärstrukturen bekannt. In der vorliegenden Untersuchung sind die bestimmenden Kräfte, die zu einer Stabilisierung der β -Faltblattstrukturen der **VH1**- und **VH2**-Konjugate führen, der hydrophobe Effekt, Wasserstoffbrückenbindungen und die Ladungsdichte der PEO-Peptid-Konjugate. Die **VH1**-Konjugate erzeugen bei der Aggregation eine β -Faltblattseite mit einer hohen Ladungsdichte. Diesem destabilisierenden Effekt wirken die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen entgegen. Deren Anzahl reicht aus, um die Sekundärstruktur so gut zu stabilisieren, dass sowohl in Wasser als auch in Methanol stabile β -Faltblätter beobachtet werden können. Die Verkürzung der Peptidstränge um eine Aminosäure in den **VH2**-Konjugaten reicht offensichtlich aus, die Aggregationstendenz so zu beeinflussen, dass nur in Methanol stabile β -Faltblattstrukturen ausgebildet werden.

Für die strukturelle Charakterisierung der gebildeten Aggregate wurden AFM-Messungen durchgeführt. Dafür wurden die Lösungen, die ein charakteristisches β -Faltblatt CD-Spektrum aufwiesen, auf eine Konzentration von 0.1 mg/mL verdünnt und durch *spin-coating* auf MICA-Oberflächen aufgebracht.

Die **VH1**-Konjugate bilden direkt nach dem Lösen in MeOH kurze, faserartige Aggregate aus. Indessen konnten trotz der nachweislich ausgebildeten β -Faltblattstrukturen weder in der wässrigen Lösung von **VH1** noch in der methanolischen Lösung von **VH2** definierte Strukturen gefunden werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die Ausbildung der Sekundärstruktur in Lösung kinetisch kontrolliert ist und eine Aggregation zu ausgedehnten Bandstrukturen nicht ablaufen kann. FTIR-Spektren der Feststoffe beider gefriergetrockneter Verbindungen belegen, dass β -Faltblattstrukturen bereits im Feststoff vorhanden sind. Es treten die für β -Faltblätter charakteristischen Amid-I (1631 cm^{-1} (**VH1**); 1628 cm^{-1} (**VH2**)) und Amid-II (1551 cm^{-1}) Schwingungsbanden auf.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei den PEO-Peptid(VT)-Konjugaten gemacht. In der vorangegangenen Arbeit wurde der Aufbau stäbchenförmiger PEO-Peptid(VT)-Nanobänder durch eine vollständige Denaturierung durch TFA und einer anschließenden, langsamen Reaggregation durch Austausch des Lösungsmittels von Methanol zu Wasser (siehe Kap. 2.5.) erreicht. Dieses Verfahren eines De-/Reaggregationszyklus wurde grundsätzlich auf die imidazolfunktionalisierten Konjugate übertragen.

Bei den **VH1**-Konjugaten wurden unterschiedliche Methoden zur Deaggregation und Reaggregation getestet. Das angesprochene Verfahren (Deaggregation mit TFA, Reaggregation durch Lösungsmitteltausch von MeOH nach H₂O) führte nicht zum gewünschten Ergebnis, da bereits in Methanol eine Aggregationstendenz der Konjugate vorliegt. Weiterhin wurde eine wässrige Lösung von **VH1** mit chaotropen Salzen (LiBr, Guanidinhydrochlorid) versetzt, wodurch das Aufbrechen der Sekundärstruktur durch Blockierung der Wasserstoffbrückenbindungen erreicht werden sollte. Dies führte jedoch nicht zur vollständigen Aufgabe der β -Faltblattstruktur. Das Erhitzen einer Lösung der **VH1**-Konjugate für 3 h auf 90 °C und langsames Abkühlen auf RT über einen Zeitraum von 6-10 h stellte sich als beste Methode heraus. Einen ersten Hinweis auf den kontrollierten Strukturaufbau gaben CD-spektroskopische Messungen (Abb. 5.4 a, b).

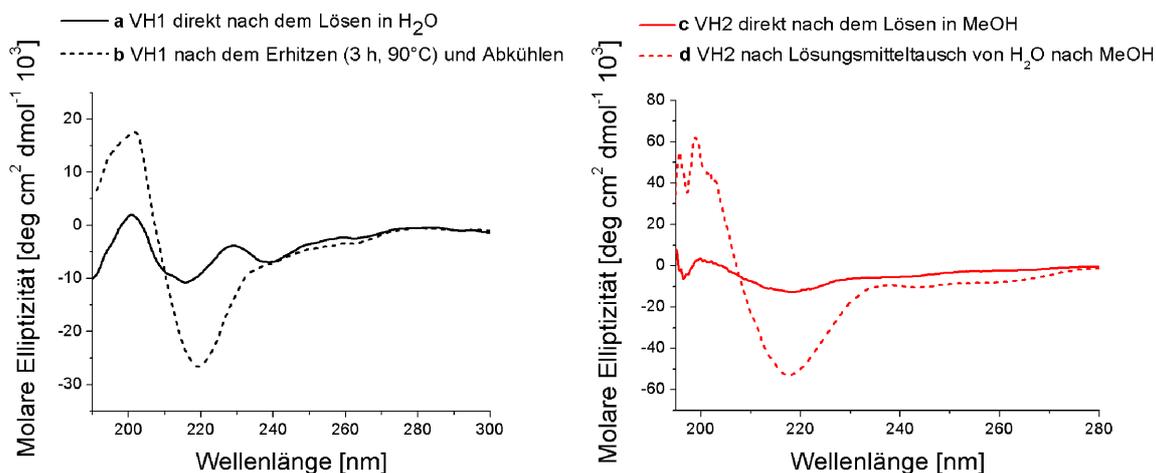


Abb. 5.4. CD-Spektren des PEO-Peptid-Konjugates **VH1** (schwarz) direkt nach dem Lösen in Wasser (a) und nach dem Erhitzen auf 90 °C und langsamen Abkühlen (b) sowie **VH2** (rot) direkt nach dem Lösen in Methanol (c) und nach der Dialyse von Wasser zu Methanol (d). Die intensivere Ausprägung des Minimums bei 219 nm in beiden Fällen nach der Reaggregation gibt Hinweise auf einen kontrollierten Strukturaufbau und eine Ausdehnung der β -Faltblattstruktur.

Bei gleicher Konzentration der **VH1**-Konjugate wird nach dem Temperaturzyklus ein deutlich intensiveres Minimum bei 219 nm detektiert. Die so behandelte Lösung wurde 3 Tage gegen Wasser dialysiert (MWCO ~3500) und erneut mittels AFM untersucht. Durch dieses Verfahren konnten gleichförmige PEO-Peptid-Nanobänder gebildet werden. Eine genaue strukturelle Analyse dieser Objekte soll im nächsten Kapitel erfolgen.

Vergleichbare PEO-Peptid-Nanobänder der **VH2**-Konjugate konnten durch langsamen Lösungsmitteltausch gebildet werden. Beim Lösen der **VH2**-Konjugate in Wasser tritt keine β -Faltblattbildung auf (siehe Abb. 5.3 c), so dass die Konjugatmoleküle vollständig deaggregiert vorliegen. Durch Dialyse von Wasser nach Methanol wird die Tendenz zur β -Faltblattbildung deutlich erhöht und eine kontrollierte Aggregation findet statt. Der Aggregationsprozess wurde mittels CD-Spektroskopie anhand der steigenden Intensität des Minimums bei 219 nm verfolgt. Wiederum zeigt das CD-Spektrum nach dem kontrollierten Strukturaufbau ein deutlich intensiveres Minimum im Vergleich mit dem CD-Spektrum vor dem Aggregationszyklus (Abb. 5.4 c, d)

5.1.3. Charakterisierung der **VH1** und **VH2** PEO-Peptid-Nanobänder

Für die Charakterisierung der gebildeten Aggregate wurden vorwiegend mikroskopische Techniken (AFM und TEM) eingesetzt. Die AFM- und TEM-Aufnahmen der PEO-Peptid(**VH1**)-Nanobänder in Wasser sowie der PEO-Peptid(**VH2**)-Nanobänder in Methanol sind in Abbildung 5.4. gegenübergestellt. In beiden Systemen ($c_{\text{Konjugat}} = 0.1 \text{ mg/mL}$) werden ausgedehnte, faserartige Aggregate mit polydispenser Längenverteilung gefunden.

Die **VH1**-Nanobänder in Wasser (Abb. 5.5 a) zeichnen sich durch sehr einheitliche Höhen von $1.4 \pm 0.2 \text{ nm}$ und maximale Längen von $1.5 - 2 \text{ }\mu\text{m}$ aus. In Analogie zu den AFM-Aufnahmen zeigen die TEM-Aufnahmen nach negativer Kontrastierung mit Uranylacetat (Abb. 5.5 c) gleichförmige, langgestreckte Objekte. Die Breite der **VH1**-Nanobänder wurde an parallel nebeneinander liegenden Strukturen ausgemessen und beträgt $16 \pm 1 \text{ nm}$. Das negative Anfärben mit Uranylacetat bewirkt eine Erhöhung des Elektronenkontrastes des Hintergrundes. Es ist jedoch bekannt, dass Uranylacetat auch von PEO-Ketten gut absorbiert wird (Kronenethereffekt)^[145], so dass im vorliegenden Beispiel nur der Peptidkern keinen Elektronenkontrast liefert. Für die theoretische Breite des Peptidkerns wurde ein Wert von 3.4 nm berechnet. Der aus den TEM-Aufnahmen bestimmte Wert mit $4 \pm 1 \text{ nm}$ stimmt innerhalb der Fehlergrenzen der Messmethode mit diesem überein.

Werden die Dimensionen der PEO-Peptid(**VH1**)-Nanobänder mit denen der PEO-Peptid(**VT**)-Nanobänder verglichen, können ähnliche Größenordnungen in Höhen, Breiten und Längen gefunden werden. Aufgrund der um zwei Aminosäuren verlängerten Sequenz sollte der Peptidkern der **VH1**-Nanobänder 0.7 nm breiter sein, als der Peptidkern der **VT**-Nanobänder. Diese Abweichung liegt innerhalb der Messfehler der gewählten Messmethoden und konnte nicht eindeutig detektiert werden.

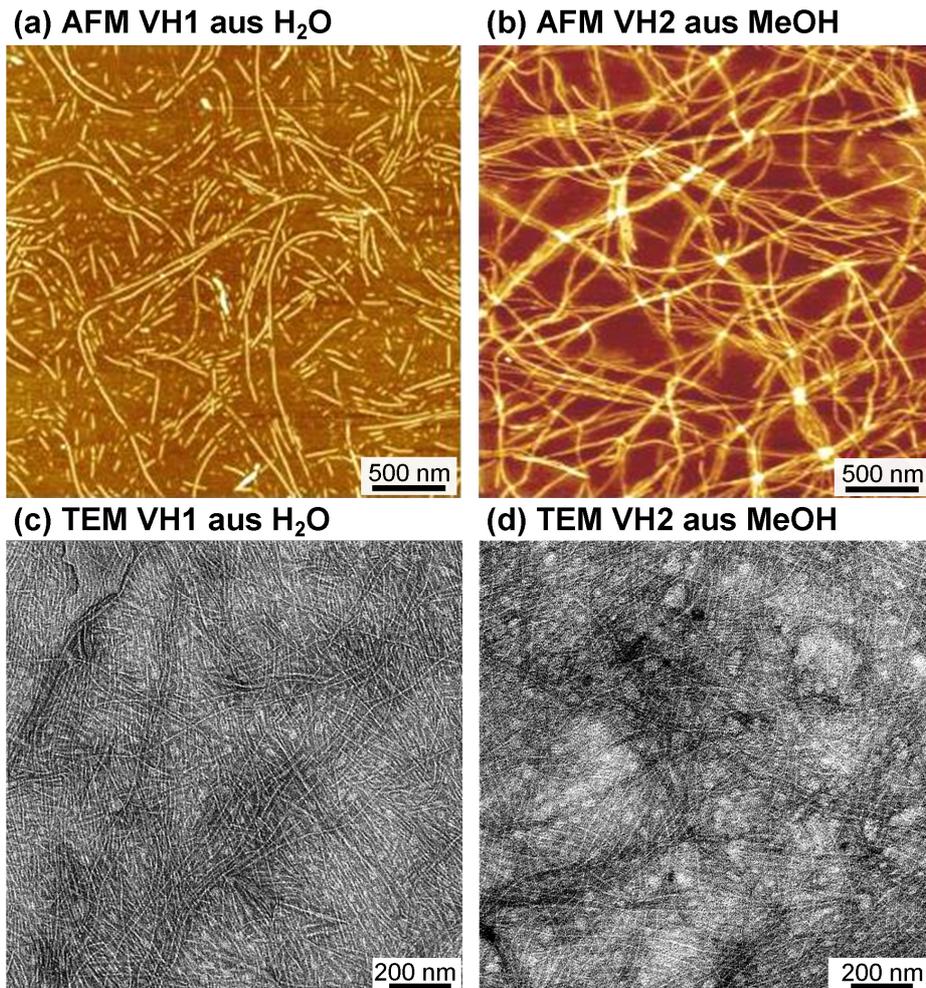


Abb. 5.5. Gegenüberstellung der AFM- und TEM-Aufnahmen der PEO-Peptid(**VH1**)-Nanobänder (a, c) in Wasser und der PEO-Peptid(**VH2**)-Nanobänder (b, d) in Methanol.

Die Mehrzahl der durch Lösungsmitteltausch erhaltenen **VH2**-Nanobänder in Methanol (Abb. 5.4 b) ist länger als die **VH1**-Nanobänder. Durchschnittlich bilden die AFM-Aufnahmen Nanobandstrukturen mit Längen von $\sim 3 \mu\text{m}$ ab. Außerdem können deutlich weniger kurze Faseraggregate gefunden werden. Die Höhe einzelner PEO-Peptid(**VH2**)-Nanobänder beträgt $1.6 \pm 0.1 \text{ nm}$.

Bei der Präparation der AFM-Proben aus methanolischen Lösungen durch *spin-coating* findet eine Aufkonzentration der Proben statt, da im Gegensatz zu Wasser eine größere Menge Methanol verdampft. Durch diese Präparationsartefakte liegen die **VH2**-Nanobänder auf der Oberfläche dichter gepackt (Bündelbildung) und häufiger übereinander vor (Abb. 5.5 b). Dieses Verhalten tritt bei der Abscheidung der Nanobänder auf die TEM-Analysenträger nicht auf.

Mittels TEM-Messungen können separiert vorliegende, bandartige Nanostrukturen beobachtet werden (Abb. 5.5 d), deren Enden oberhalb der Längenskala der Aufnahme liegen. Die Breite der Strukturen liegt bei 15 ± 1 nm, wobei der innere, elektronenkontrastarme Bereich 3-4 nm einnimmt, was mit dem, für die Breite des Peptidkerns, theoretisch bestimmten Wert von 3.0 nm recht gut übereinstimmt.

Die Aggregation der PEO-Peptid(**VH1**)-Konjugate in Methanol (Abb. 5.6) wies im Gegensatz zu den anderen imidazolfunktionalisierten PEO-Peptid-Konjugaten eine Besonderheit auf. Analog zu den **VH1**-Konjugaten in Wasser wurde ein Temperaturzyklus zur kontrollierten Aggregation der Konjugate in Methanol eingesetzt. Dazu wurde eine Lösung der PEO-Peptid(**VH1**)-Konjugate (2 mg/mL in MeOH) für 3 h auf 60 °C erhitzt und anschließend 3 Tage gegen Methanol (MWCO ~3500) dialysiert. AFM-Messungen bestätigten die Ausbildung ausgedehnter, stäbchenartiger Strukturen mit maximalen Längen von ~700 nm. Die Höhe der gefundenen Strukturen beträgt allerdings nur 0.7 ± 0.1 nm und ist damit nur halb so groß wie bisher für andere PEO-Peptid-Nanobänder bestimmt. An Höhenmaxima parallel liegender Strukturen wurde eine Breite von 13 ± 1 nm ausgemessen.

AFM VH1 aus MeOH

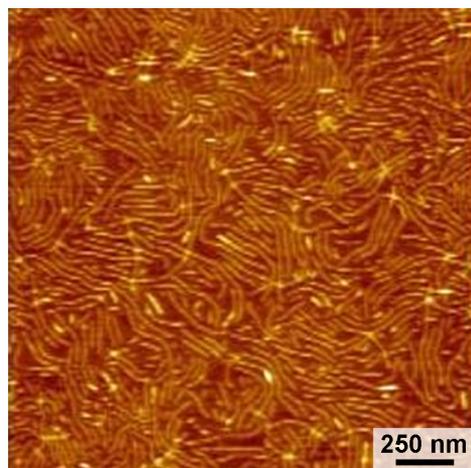


Abb. 5.6. Die AFM-Aufnahme der einfachen PEO-Peptid(**VH1**)-Tapes in Methanol bildet nach der Aggregation dicht gepackte, Faserstrukturen mit einer Höhe von 0.7 ± 0.1 nm ab.

Der Mechanismus für die Bildung der Nanobandstrukturen schlägt eine entropiegetriebene, durch die faziale Amphiphilie der β -Faltblatt-Tapes ausgelöste, Bildung von Doppeltape-Strukturen (Bändern) vor. In Methanol ist der hydrophobe Effekt, der zur Zusammenlagerung der β -Faltblatt-Tapes unter Abschirmung der unpolaren Valinseitenketten führt, kaum vorhanden. Dies würde das Vorhandensein von einfachen β -Faltblatt-Tapes in Methanol erklären.

Dennoch wurden bei den PEO-Peptid(**VH2**)-Konjugaten auch in Methanol Doppeltape- bzw. Bandstrukturen mit Höhen von ~ 1.5 nm beobachtet. Offensichtlich beeinflusst hierbei ein weiterer Effekt die Strukturbildung. Die **VH1**- β -Faltblatt-Tapes besitzen mit acht positiven Ladungen im Verhältnis zu sechs unpolaren Gruppen eine höhere Ladungsdichte als die **VH2**- β -Faltblatt-Tapes, bei denen sechs positive Ladungen auf sechs unpolare Gruppen kommen. Die Annäherung der primär entstehenden **VH1**- β -Faltblatt-Tapes könnte durch die hohe Ladungsdichte erschwert werden, was die Ausbildung von Doppeltape-Strukturen verhindert.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Synthese der PEO-Peptid-Konjugate (**VH1** und **VH2**), mit einer alternierenden Valin-Histidin-Sequenz, erfolgreich durchgeführt werden konnte. Während die **VH1**-Konjugate in Methanol nur recht flache Aggregate (einfache β -Faltblatt-Tapes) mit einer Höhe von 0.7 nm bilden, konnten Doppeltape-Strukturen der PEO-Peptid(**VH1**)-Konjugate in Wasser und der PEO-Peptid(**VH2**)-Konjugate in Methanol nach kontrollierter Aggregation nachgewiesen werden. Aufgrund der gleichen molekularen Struktur zu den PEO-Peptid(VT)-Konjugaten wird in diesen Fällen von einem identischen Aggregationsprozess ausgegangen. Durch die Zusammenlagerung zweier β -Faltblatt-Tapes unter Abschirmung der unpolaren β -Faltblattseite entstehen die beschriebenen imidazolfunktionalisierten Nanobandstrukturen, was mit der Bildung ausgedehnter β -Faltblattstrukturen (siehe Abb. 5.4) korreliert. Einhergehend damit zeichnen sich auch die PEO-Peptid(**VH1**)- und PEO-Peptid(**VH2**)-Nanobänder durch eine Kern-Schale-Architektur (vergleiche Kap. 2.5.) aus. Auf der Oberfläche der Bandstrukturen befinden sich in definierten Abständen die Imidazolgruppen der Histidinseitenketten. Daher sollen nachfolgend die Komplexierungseigenschaften und die Möglichkeiten zur Vernetzung der imidazolfunktionalisierten Nanobänder (**VH1** in Wasser und **VH2** in Methanol) besprochen werden.

5.1.4. Koordination von Nickelionen durch VH1- und VH2-PEO-Peptid-Nanobänder

Die Komplexierung von Metallionen bietet sich wegen der flexiblen, aber starken koordinativen Bindungen als Vernetzungsmöglichkeit für die Nanobänder an. Viele Beispiele für koordinierte Metallionen lassen sich in den katalytisch aktiven Zentren von Enzymen finden^[146]. Als Liganden in den beteiligten Proteinen treten vor allem Carboxylat- (Glutaminsäure, Asparaginsäure), Thiol- (Cystein, Methionin) und Imidazolgruppen (Histidin) auf. Imidazolringe von Histidinseitenketten tragen zur Koordination verschiedener Metalle bei.

So besetzt eine Imidazolgruppe die 6. Koordinationsstelle des Eisenions im Hämoglobin. Imidazolgruppen binden außerdem u.a. Zinkionen in Carboanhydrasen und Zinkfingerproteinen sowie Kupferionen in Hämocyaninen und Superoxid-Dismutasen.

Die Bindungsaffinität der Imidazolgruppen gegenüber Nickelionen wird in der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)^[143] ausgenutzt. Diese dient als Standardverfahren zur Aufreinigung expressierter Peptide und Proteine aus z.B. Zellflüssigkeiten. Die Proteine sind dazu an einem Ende mit einer Sequenz aus 6-10 aufeinander folgenden Histidinen, einem sogenannten *his-tag*, versehen. Dieser *his-tag* bindet während der Chromatographie an auf der Chromatographiesäule immobilisierten Nickelionen. Nach der Elution von Nebenprodukten ohne *his-tag* werden größere Mengen an Imidazol hinzugegeben, so dass es zu einem reversiblen Ligandenaustausch kommt und die gebundenen Proteine eluiert werden.

Aus der Literatur sind außerdem synthetische Peptid-Metallionen-Komplexe mit koordinierenden Histidinseitenketten bekannt. So wurden von Kokschi *et al.*^[144] Histidinreste, die die Bindung von Kupfer- und Zinkionen ermöglichen sollen, in Peptide eingebaut, die α -helikale *coiled coil-Motive* (Zusammenlagerung zweier α -Helices über die hydrophoben Seitenketten)^[147] einnehmen. Die Koordination der Metallionen wurde ausgenutzt, um die Konformationsänderung der Sekundärstruktur von einer α -Helix zu einem β -Faltblatt zu schalten.

Im ersten Abschnitt wird nun auf die Versuche der Koordination von Nickelionen an die synthetisierten **VH1**-Nanobänder in wässrigem Medium und an die **VH2**-Nanobänder in Methanol eingegangen. Die Lösungen der PEO-Peptid-Nanobänder wurden dazu mit Nickelchlorid versetzt. In einem typischen Experiment wurden zu 100 μ L einer wässrigen Lösung der **VH1**-Aggregate (1 mg/mL) 1.5 Äq. NiCl_2 (3 μ L, 0.01 mol/L) bezogen auf ein Konjugatmolekül hinzugefügt. Dies entspricht einem Imidazol- Ni^{2+} -Verhältnis von 4:1.

Das Gemisch wurde 24 h unter leichtem Schütteln equilibriert und anschließend mittels AFM ($c_{\text{Nanobänder}} = 0.1 \text{ mg/mL}$) untersucht. Die Endkonzentrationen an Nanobändern und Metallsalz sind vergleichbar mit anderen Studien, die zur Untersuchung der Metallionenbindung an Peptiden durchgeführt wurden.

Beim Vergleich der AFM-Aufnahmen vor (Abb. 5.5 a) und nach hinzugefügtem Nickelchlorid (Abb. 5.7 a) lassen sich praktisch keine Abweichungen in der Faserstruktur beobachten. Es sind keine Veränderungen der Höhen, Breiten oder Längen auffällig.

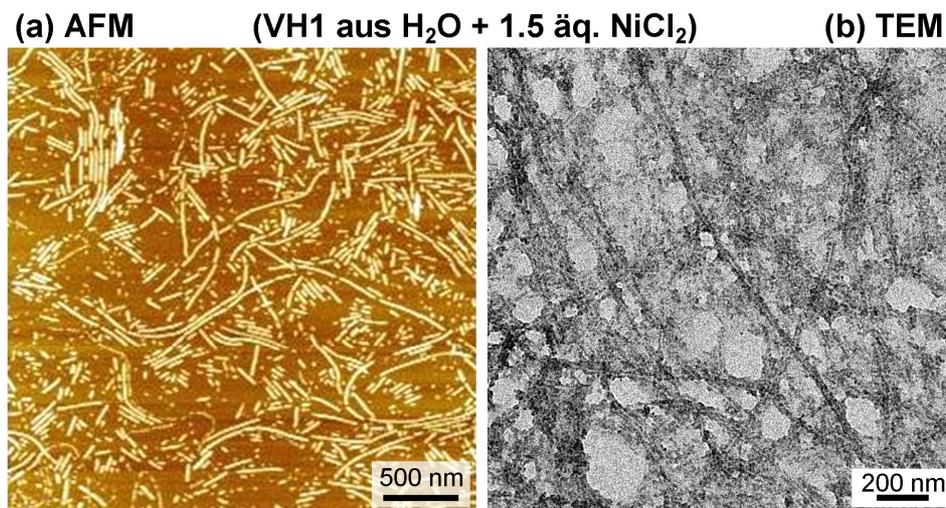
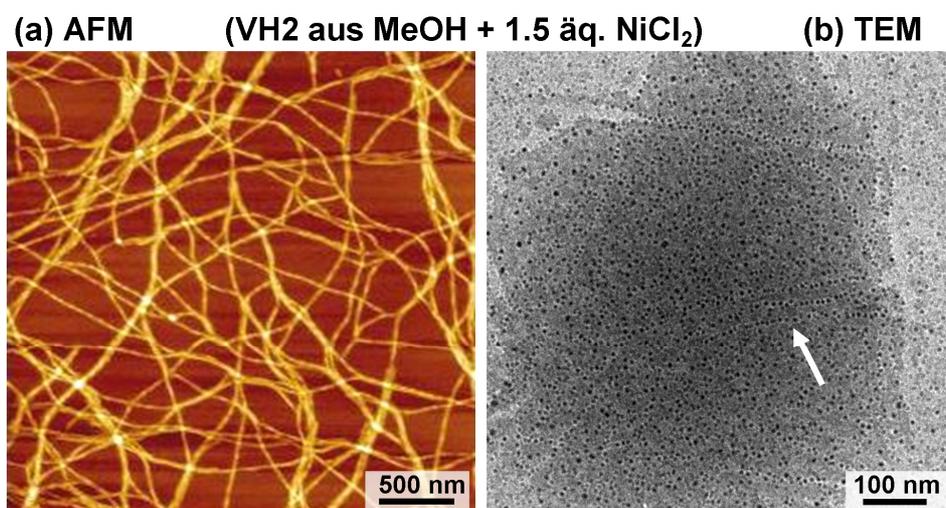


Abb. 5.7. Analyse des Komplexierungsverhaltens der **VH1**-Nanobänder bezüglich Nickelionen in wässrigem Medium. AFM-(a) und TEM-(b)-Aufnahmen nach dem Hinzufügen einer wässrigen Nickelchloridlösung.

Eine Erhöhung der Metallsalzkonzentration auf 3, 6 oder 15 Äq. hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die PEO-Peptid(**VH1**)-Nanobänder. Die TEM-Messungen (Abb. 5.7 b) der mit Nickelchlorid versetzten Lösungen wurden an nicht kontrastierten Proben durchgeführt. Sollte eine Anreicherung von Nickelionen auf den Oberflächen der Nanobänder statt gefunden haben, müsste sich deren Elektronenkontrast deutlich erhöhen. Auf den Aufnahmen können vereinzelt dünne Nanofaserstrukturen mit einer Breite von $12 \pm 1 \text{ nm}$ gefunden werden. Es wird jedoch ähnlich zu einer Kontrastierung mit Uranylacetat eher der Hintergrund angefärbt. Außerdem werden die Metallionen von den PEO-Schalen gebunden und nicht primär wie erwartet von den funktionalen Peptidkernen. Im Anschluss an die Abscheidung der Nanobänder auf der Oberfläche des Analysenträgers werden die Metallionen aus der Lösung abgeschieden und lagern sich ein bevorzugt auf den PEO-Ketten der Nanobänder und an Kreuzungspunkten von übereinanderliegenden Strukturen an.

Es wird daher angenommen, dass in Lösung die Koordination von Nickelionen nicht stattfindet oder sich ein sehr dynamisches Gleichgewicht einstellt. Dies wurde mit UV/VIS- und NMR-Spektroskopie bestätigt. Das UV/VIS-Spektrum eines Gemisches der **VH1**-Nanobänder mit 3 Äq. NiCl_2 zeigt keine zusätzlichen charge-transfer-Banden, die auf eine Komplexierung hindeuten würden, sondern lediglich eine Überlagerung der UV/VIS-Spektren der Einzelkomponenten. Die NMR-Spektren in Wasser zeigen nach der Zugabe von NiCl_2 eine leichte Verschiebung (20-40 Hz) der aromatischen Signale der Imidazol-Protonen, was auf eine schwache Komplexbildung hinweisen könnte oder eventuell von der Polaritätsänderung des Lösungsmittels hervorgerufen wird. Eine gezielte Vernetzung oder Überstrukturbildung konnte in keinem Experiment beobachtet werden.

Als zweite Versuchsreihe wurden die **VH2**-Nanobänder in Methanol bezüglich der Koordination von Metallionen untersucht. Hierbei wurden ebenfalls 1.5 Äq. NiCl_2 in Bezug zu einem Konjugatmolekül eingesetzt, was in diesem Fall einem Imidazol- Ni^{2+} -Verhältnis von 8:3 (4:1.5) entspricht. Auf den AFM-Aufnahmen in Abbildung 5.8.a sind ausgedehnte Faserstrukturen sichtbar. Im Gegensatz zu den **VH2**-Nanobändern vor der Nickelionenzugabe (Abb. 5.5 b) können leichte Veränderungen in der Anordnung der Fasern beobachtet werden. Außerdem wurde festgestellt, dass die Höhen der **VH2**-Nanobänder interessanterweise periodisch zwischen 1.6 und 2.4 nm variieren. Dies wird besonders deutlich, wenn die Höhenunterschiede entlang einer Faser untersucht werden (Abb. 5.8 c). Hierbei werden Erhebungen im Abstand von ~ 80 nm gefunden, die eine Höhe von 0.8 ± 0.1 nm einnehmen. Auf der MICA-Oberfläche befinden sich keine Partikel einer solchen Größenordnung.



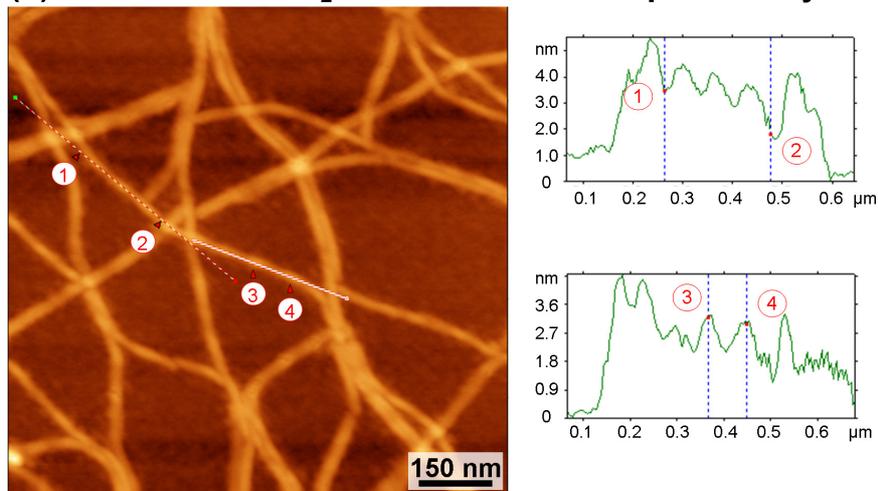
(c) AFM VH2 + NiCl₂ aus MeOH - Höhenprofilanalyse

Abb. 5.8. Analyse des Komplexierungsverhaltens der **VH2**-Nanobänder bezüglich Nickelionen in Methanol. Die AFM-Aufnahmen (a, Höhenprofilanalyse c) und die TEM-Aufnahmen (b) nach dem Hinzufügen einer methanolischen Nickelchloridlösung deuten auf die Bindung kolloidal gelöster Nickelpartikel auf der Faseroberfläche hin.

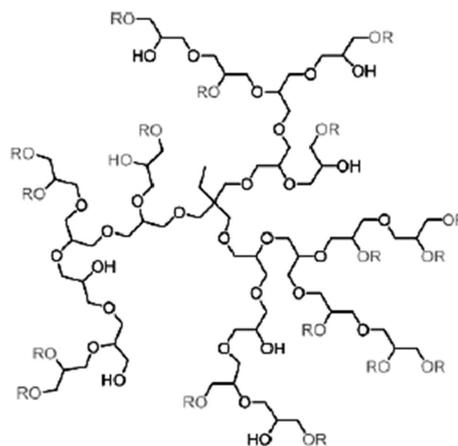
Diese Beobachtung wird von den TEM-Messungen an nicht kontrastierten Proben (Abb. 5.8 b) unterstützt. Es werden zahlreiche elektronenkontrastreiche Partikel mit Durchmessern von 2-7 nm abgebildet. Es wird daher angenommen, dass das Nickelchloridsalz in Form kolloidaler Teilchen in der methanolischen Lösung vorliegt. In einigen Bereichen (Abb. 5.8 b, Pfeil) liegen viele dieser Partikel linear aufgereiht vor. Scheinbar existieren attraktive Wechselwirkungen zwischen den **VH2**-Nanobändern und den Nickelchlorid-Clustern. AFM- und TEM-Messungen geben Hinweise darauf, dass die Metallpartikel auf den Faseroberflächen angereichert werden. Aus diesen Messungen können jedoch keine eindeutigen Aussagen über das Verhalten der Komponenten in Lösung gezogen werden. Zwischen den oberflächengebundenen Imidazolgruppen und den Nickelionen scheint keine präferenzielle Komplexierung stattzufinden, so dass die angestrebte gerichtete Vernetzung der imidazolfunktionalisierten Nanobänder durch eine Koordination mit Nickelionen in keinem Experiment erreicht werden konnte.

5.1.5. Komplexierung der VH1- und VH2-PEO-Peptid-Nanobänder mit hyperverzweigten Polyglycerolen

Daher soll sich der nächste Abschnitt mit dem Versuch des Aufbaus rein organischer Komposite beschäftigen. Hierfür sollten ionische Wechselwirkungen zwischen den kationischen Imidazolresten und anionischen Gruppen von Polymeren oder Tensiden genutzt werden^[148]. Grundlegende Prinzipien sind aus der physikalischen Vernetzung von Polymeren über ionische Wechselwirkungen abgeleitet. Polyelektrolytkomplexe^[149, 150], die durch elektrostatische Anziehung kationischer (z.B. Polyethylenimin, Polyvinylpyridin) und anionischer (z.B. Polyacrylate, Polysaccharide) Polymere gebildet werden, zeichnen sich durch interessante Eigenschaften aus. So können u.a. mit Hilfe der *Layer-by-Layer*-Technik^[151] definierte, funktionale Oberflächenschichten aufgebaut werden. Außerdem werden in der Literatur häufig Anwendungen in der nicht-viralen Gentherapie (DNA-Polyplexe^[152]) oder als Drug-Delivery-Systeme^[153, 154] diskutiert.

Mit einem pKs-Wert von 6 liegen die Histidinseitenketten bei pH-Werten kleiner als sechs vorwiegend als Imidazoliumkationen vor. Als positiv geladenen Gruppen könnten diese ionische Wechselwirkungen mit Anionen oder Polyanionen eingehen und Ionenpaarkomplexe bilden.

Als organische Vernetzungsmoleküle wurden hyperververzweigte Polyglycerole verwendet, deren Endgruppen carboxylat- bzw. sulfonatfunktionalisiert waren (Abb. 5.9). Diese wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um R. Haag *et al.*^[155] (FU Berlin) zur Verfügung gestellt.



- (a) Polyglycerolsulfonat, $R = \text{SO}_3\text{Na}^+$, $M = 12300 \text{ g/mol}$
 (b) Polyglycerolcarboxylat, $R = \text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$, $M = 11000 \text{ g/mol}$

Abb. 5.9. Molekülstruktur der verwendeten hyperverzweigten Polyglycerole (sulfonatfunktionalisiert (a) und carboxylatfunktionalisiert (b), entnommen aus Lit.^[155]).

In der ersten Versuchsreihe wurden die **VH1**-Nanobänder in Wasser mit äquimolaren Mengen des hyperverzweigten Polyglycerolsulfonats und -carboxylats gemischt. Ein Polyglycerolmolekül besitzt ungefähr 60 funktionale Gruppen und damit 60 negative Ladungen. Bezogen auf die acht positiven Ladungen (zwei permanente der *N,N*-Dimethylglycine und sechs latente der Histidine) eines PEO-Peptid-Konjugatmoleküls ergibt sich ein Ladungsverhältnis positiv:negativ von rund 1:8. Das Komplexierungsverhalten der **VH1**-Nanobänder bezüglich der Polyglycerole wurde bei einem pH-Wert von 5 untersucht. Vergleichende Messungen wurden bei einem pH-Wert von 7 durchgeführt, bei dem angenommen wird, dass die Imidazole ungeladen vorliegen. Zu 100 μL einer Lösung der **VH1**-Nanobänder (2 mg/mL) mit pH-Werten von entweder 5 oder 7 wurden 100 μL einer Lösung des Polyglycerolsulfonats (4.8 mg/mL) gegeben. In gleicher Weise wurde mit den hyperverzweigten Polyglycerolcarboxylaten (100 μL , 4.3 mg/mL) verfahren. Nach 24 h Equilibrierung bei leichtem Schütteln konnte in keinem Fall die Bildung makroskopischer Aggregate beobachtet werden, so dass alle Lösungen mittels AFM-Messungen analysiert wurden, um Hinweise auf Prozesse auf der nanoskopischen Ebene zu erhalten.

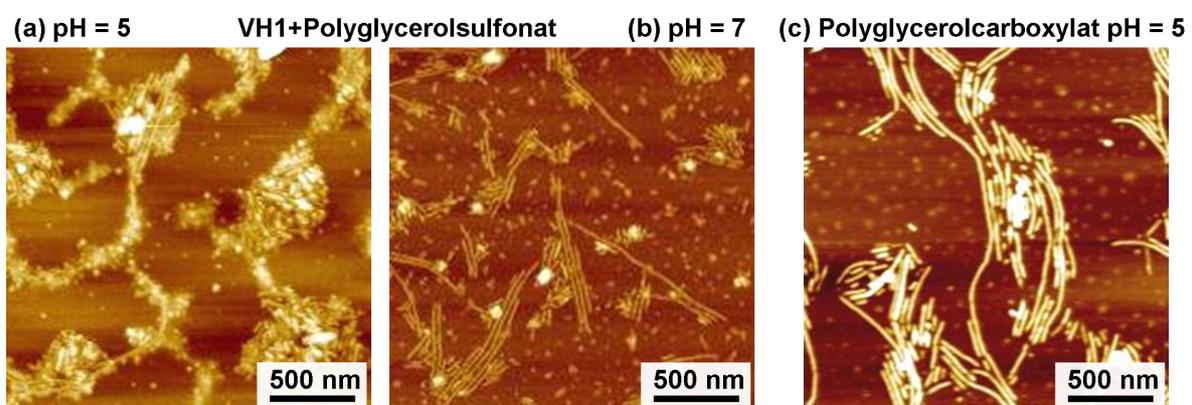


Abb. 5.10. Vergleichende Gegenüberstellung der AFM-Aufnahmen von Reaktionsgemischen der **VH1**-Nanobänder mit Polyglycerolsulfonat bei pH-Werten von 5 (a) sowie 7 (b) und mit Polyglycerolcarboxylat bei einem pH-Wert von 5 (c).

AFM-Messungen bei einem pH-Werte von 7 (Abb. 2.10 b) belegen erwartungsgemäß, dass die **VH1**-Nanobandstrukturen und die sphärischen Partikel der Polyglycerolsulfonate nebeneinander vorliegen. Die Dimensionen der Nanobänder bleiben nach der Zugabe des Polyglycerolsulfonates unverändert. Die Imidazolgruppen auf den Nanobandoberflächen sollten bei $\text{pH} = 7$ ungeladen sein, so dass spezifische Wechselwirkungen mit den Polyglycerolsulfonaten ausgeschlossen werden können.

AFM-Messungen, die von den **VH1**-Nanobänder mit Polyglycerolsulfonat bei $\text{pH} = 5$ vorgenommen wurden, deuten auf die Ablagerung der sphärischen Partikel auf und dicht neben den Nanobändern hin. Separierte Nanobandstrukturen können nicht mehr gefunden werden, so dass Höhen und Breiten Variationen aufweisen. Diese Ablagerung der Polyglycerolsulfonate auf den Nanobändern könnte präparationsbedingt auftreten. Da sowohl die MICA-Oberfläche als auch die Polyglycerolsulfonate negativ geladen sind, ist das Auftreten repulsiver Kräfte zwischen beiden wahrscheinlich. Bei der Abscheidung des Reaktionsgemisches auf die Oberfläche würden sich die Polyglycerolsulfonate dann bevorzugt auf den positiv geladenen **VH1**-Nanobandoberflächen anreichern. Um solche Oberflächeneffekte auszuschließen wurden die AFM-Messungen auf ungeladenen Graphitoberflächen wiederholt. Es konnten aber weder die Nanobänder noch die Polyglycerolsulfonate zufriedenstellend abgebildet werden, was auf die geringen Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und Probe zurückzuführen ist.

Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 5.10. c die AFM-Aufnahme einer abgeschiedenen Reaktionsmischung des Polyglycerolcarboxylats mit den **VH1**-Nanobändern in Wasser bei einem pH-Wert von 5. Hierbei lagen sphärische Partikel und Nanobandstrukturen unabhängig von einander auf der Oberfläche vor. Wechselwirkungen zwischen den **VH1**-Nanobändern und den Polyglycerolcarboxylaten konnten nicht nachgewiesen werden. Auch Untersuchungen der Reaktionsgemische bei anderen pH-Werten zeigten keine Auswirkungen bezüglich Sekundärwechselwirkungen zwischen Nanobändern und Polyglycerolcarboxylaten. Auf andere Nachweismethoden wurde aufgrund dieser Ergebnisse und der Komplexität der beteiligten Partner verzichtet.

Eine Analyse des Komplexierungsverhaltens der **VH2**-Nanobänder bezüglich der Polyglycerolcarboxylate wurde angeschlossen. Wechselwirkungen mit den sulfonat-funktionalisierten Polyglycerolen konnten wegen der geringen Löslichkeit dieser in Methanol nicht durchgeführt werden. Mittels AFM wurde eine Lösung untersucht, die durch das Zusammengeben von 100 μL einer Lösung der **VH2**-Nanobänder (2 mg/mL) mit 100 μL einer Lösung des Polyglycerolcarboxylats (4.9 mg/mL) hergestellt wurde.

In diesem Experiment wurde ein Ladungsverhältnis positiv:negativ von rund 1:10 eingestellt. Nach 24 h bei leichtem Schütteln wurde das Gemisch auf eine Konzentration von 0.2 mg/mL an **VH2**-Nanobändern verdünnt und die AFM-Analyse angeschlossen.

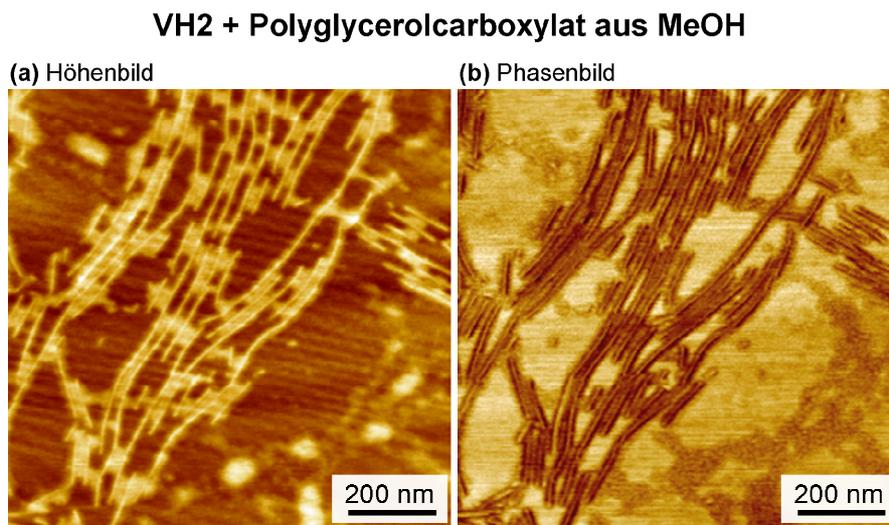


Abb. 5.11. AFM-Aufnahme eines äquimolaren Gemisches von PEO-Peptid(VH2)-Nanobändern und carboxylatfunktionalisiertem Polyglycerol in Methanol, welche die gegenseitige Beeinflussung der Komponenten veranschaulicht (Höhenbild (a) sowie Phasenbild (b)).

Es wird deutlich, dass sich zwischen den Nanobandstrukturen Partikel befinden (Abb. 5.11 a), die mit 1.3 ± 0.1 nm ähnliche Höhen wie die Nanobänder (1.6 nm) einnehmen. Die VH2-Nanobänder liegen außerdem in weiten Bereichen parallel vor. An Proben der VH2-Nanobänder ohne Polyglycerolcarboxylat wurde zwischen Höhenmaxima parallel liegender Bandstrukturen ein Abstand von ~ 22 nm bestimmt. Nach der Zugabe des Polyglycerolcarboxylats vergrößern sich die gefundenen Abstände deutlich auf 33-36 nm. Da wiederum beide Komponenten für die AFM-Messungen auf eine Oberfläche aufgebracht wurden, können oberflächenbedingte Einflüsse nicht ausgeschlossen werden. Sollten sich die VH2-Nanobänder als erste Komponente auf der Oberfläche befinden, würden sie unbeeinflusst von den Polyglycerolcarboxylaten Abstände von ~ 22 nm einnehmen. Es ist nicht anzunehmen, dass sich bei einer darauf folgenden Abscheidung der Polyglycerole die Abstände der Nanobänder so deutlich ändern würden, da diese relativ fest auf der MICA-Oberfläche anhaften. Dies deutet auf die Ausbildung attraktiver Wechselwirkungen zwischen VH2-Nanobändern und carboxylatfunktionalisierten Polyglycerolen bereits in Lösung hin. Das Phasenbild der AFM-Messung (Abb. 5.11 b) zeigt, dass sich zwischen den Nanobändern die Polyglycerole befinden. Die Partikel zwischen den Nanobänder zeichnen sich durch einen ähnlichen Phasenkontrast wie die PEO-Hülle aus. Der Peptidkern ist mit einem stärkeren Kontrast davon deutlich abgehoben.

Allerdings konnte auch in dieser Zusammensetzung von **VH2**-Nanobändern und Polyglycerolcarboxylaten der Aufbau komplexer Strukturen nicht nachgewiesen werden. In diesem Abschnitt sollten die Wechselwirkungen der imidazolfunktionalisierten Nanobandstrukturen gegenüber negativ geladenen hyperverzweigten Polyglycerolen untersucht werden. Im wässrigen Medium konnten keine Komplextendendenzen der **VH1**-Nanobänder gegenüber den hyperverzweigten Polyglycerolsulfonaten nachgewiesen werden. Da sich alle gemachten Aussagen auf die Auswertung von AFM-Messungen beziehen und die Komponenten auf Oberflächen untersucht wurden, können über Zustände der Komponenten in Lösung keine eindeutigen Angaben gemacht werden. Trotzdem ließen sich in einer Reaktionsmischung (**VH2** + Polyglycerolcarboxylat in MeOH) deutlich Tendenzen zur Bildung ionischer Komplexe finden. Sollten Wechselwirkungen zwischen den Nanobändern und den Polyglycerolmolekülen auftreten, scheinen diese relativ schwach und dynamisch zu sein, da eine Vernetzung zu großen Bündeln oder gelartigen Strukturen in keinem Experiment beobachtet werden konnten. Der Aufbau komplexer, geordneter Strukturen geht mit dem Verlust vieler Konformationsfreiheitsgrade der Komponenten einher. Die relativ steifen Nanobänder mit ihrer stäbchenartigen Architektur sollten für eine Packung in geordneten Strukturen favorisiert sein. Dennoch scheinen die vorhandenen anziehenden Kräfte dazu nicht stark genug zu sein. Eine Ursache für die wenig ausgeprägte Komplexbereitschaft der **VH1**- und **VH2**-Nanobänder könnte in der Anordnung der Imidazolgruppen auf der Bandoberfläche liegen, worauf im folgenden Kapitel näher eingegangen werden soll.

5.1.6. Analyse der **VH1** und **VH2** PEO-Peptid-Nanobandoberflächen

Da aus der Literatur Beispiele für Wechselwirkungen von Histidinseitenketten mit Metallionen und ionischen Gruppen bekannt sind^[148, 156], stellte sich die Frage aus welchen Gründen die Komplexbildung mit den angesprochenen Molekülen nur unzureichend stattfand. Imidazolgruppen sind neben den angesprochenen Komplexbildungsmöglichkeiten auch für die Tendenz zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen bekannt. In der Kristallstruktur ordnen sich die Imidazolmoleküle unter Ausbildung dieser in langen Ketten an (Abb. 5.12). Die Länge einer Wasserstoffbrückenbindung wurde mittels Röntgenstreuung an Kristallen von Imidazol bestimmt und beträgt 0.27-0.29 nm, so dass die Imidazolmoleküle ~0.52 nm von einander entfernt sind^[157].

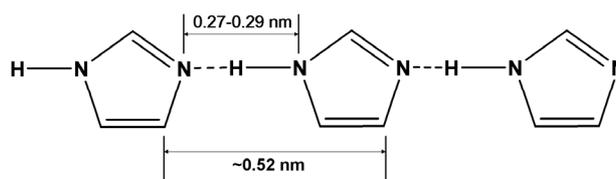


Abb. 5.12. Idealisierte Anordnung von Imidazolmolekülen im Kristallgitter.

In einer antiparallelen β -Faltblattstruktur befinden sich die Rückgrate der Peptidstränge in einem Abstand von ~ 0.47 nm^[72]. Damit befinden sich die auf den Oberflächen der Nanobänder gebundenen Imidazolgruppen in einem Abstand, der zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen geeignet ist. Um die Anordnung der Imidazolgruppen auf der Oberfläche der Nanobänder zu verdeutlichen, stellt Abbildung 5.13 a die idealisierte Anordnung zweier β -Faltblatt Peptidstränge mit einer Valin-Histidin-Sequenz dar. Der Abstand der Imidazolgruppen beträgt innerhalb des gleichen Strangs 0.69 nm, zwischen den Strängen wurde ein Abstand von 0.47 nm bestimmt. Diese Abstände der Imidazolgruppen voneinander stimmen recht genau mit den Abständen in der Kristallstruktur überein.

Die bisher in der Untersuchung der **VH1**- und **VH2**-Nanobänder erhaltenen Resultate lassen darauf schließen, dass auf die Imidazolgruppen tatsächlich untereinander Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Neben den gegebenen Abständen trägt die Möglichkeit zur freien Rotation der Imidazolgruppen zu dieser Eigenschaft bei. Einfache Kraftfeldrechnungen (hyper chem) der Dimere des **VH1**-Konjugates (Abb. 5.13 b) sowie des **VH2**-Konjugates (Abb. 5.13 c) verdeutlichen die Anordnung der Imidazolgruppen auf den Nanobandoberflächen. Vermutlich ist die Ausbildung der Wasserstoffbrücken ein weiterer Beitrag, der zur Stabilisierung der β -Faltblattstrukturen führt. Allerdings werden dadurch die Koordinationsstellen der Imidazole abgesättigt, so dass nur wenige freie Imidazolstickstoffatome für die Komplexierung mit Metallionen oder anderen Molekülen zur Verfügung stehen. Besonders an den Enden der Nanobänder, Knicken, Brüchen oder anderen unregelmäßigen Stellen würden somit Wechselwirkungen mit anderen Molekülen möglich sein, da die Imidazolgruppen nicht perfekt in die Struktur eingebaut sind und die Wasserstoffbrückenbindungen gestört werden.

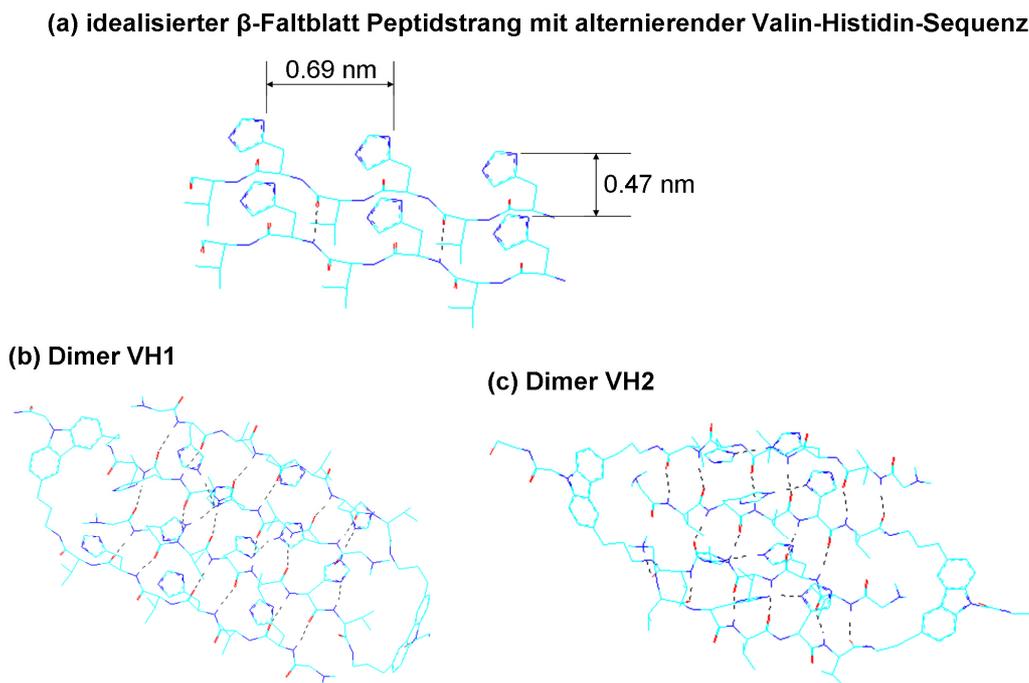


Abb. 5.13. Graphische Darstellung der berechneten Molekülstrukturen von Dimeren der PEO-Peptid(VH1)- (a) und PEO-Peptid(VH2)-Konjugate (b), die die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Imidazolresten visualisiert (alle Wasserstoffatome und die PEO-Ketten wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen).

Aus dieser Eigenschaft könnten sich andere Anwendungsmöglichkeiten für die imidazolfunktionalisierten Nanobänder, z.B. als eindimensionale Protonenleiter, ergeben. Wie beschrieben bildet Imidazol im Feststoff lange Ketten aus, in denen die Imidazole über intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft sind. Ähnlich wie Wassermoleküle können durch diese Anordnung Protonen sehr schnell geleitet werden^[158]. Daher beschäftigen sich einige Studien mit den Möglichkeiten Imidazol als Protonenleiter in Brennstoffzellen einzusetzen^[159]. Bisher wird die Protonenleitung von Polyelektrolytpolymeren (z.B. NAFION) übernommen, die in Wasser gequollen werden. Die Verwendung von Imidazol hätte gegenüber Wasser den Vorteil bei höheren Betriebstemperaturen arbeiten zu können. Mit der Immobilisierung von Imidazolgruppen an flexible Polymerrückgrate konnten Materialien erschaffen werden, die sich durch eine hohe Stabilität (Polymerrückgrat) und Protonenleitfähigkeit (Imidazolgruppen) auszeichnen^[160]. In den synthetisierten Nanobändern befinden sich die Imidazolgruppen bereits in einer idealen Anordnung zur Ausbildung von H-Brücken, gebunden an eine definierte, anisotrope Struktur. Die Histidinseitenketten sind außerdem frei drehbar, so dass der Reorientierungsschritt nach dem Protonentransfer möglich wäre.

5.2. PEO-Peptid-Nanobänder mit photoschaltbaren Spiropyranseinheiten

Photochrome Verbindungen existieren in zwei stabilen Zuständen, die sich durch Einstrahlung von Licht verschiedener Wellenlängen ineinander überführen lassen^[161]. Durch die Integration photochromer Moleküle in polymere Systeme können lichtinduzierte Änderungen der Struktur, Konformation oder Löslichkeitseigenschaften hervorgerufen werden. Diese sind ein direktes Resultat veränderter Wechselwirkungen der photochromen Einheiten mit der Polymerkette, den Lösungsmittelmolekülen oder Polymer-Seitenkettengruppen. Als Beispiele für photochrome Verbindungen seien Azobenzole, Trityl-Derivate, Fulgide und die in Abbildung 5.14. gezeigten Spiropyran-Verbindungen genannt. Die photochemische Umwandlung des farblosen Spiropyranderivates in das gefärbte Merocyaninderivat geht mit einer C-O-Bindungsspaltung des Spiropyranringes einher.

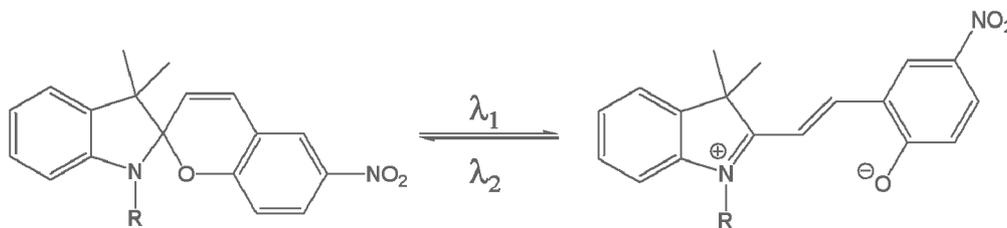


Abb. 5.14. Darstellung der photochemischen Reaktion, die zum photochromen Verhalten der Spiropyranmoleküle führt (links = geschlossene Spiropyranform, rechts = offene Merocyaninform, $\lambda_1 = 366 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 560 \text{ nm}$).

Die ionische Merocyaninform besitzt eine große Tendenz sich zu stapelartigen Aggregaten zusammenzulagern^[162]. Je nach Ausrichtung der Moleküldipolmomente wird zwischen J-Aggregaten (parallel) und H-Aggregaten (antiparallel) unterschieden. Diese Dimerisierungstendenz wurde z.B. von Pieroni *et al.*^[163] zur Sekundärstrukturinduktion in Homopolypeptiden (Poly-L-Glutaminsäure^[164], Poly-L-Lysin) genutzt. Hierbei wurde der Übergang von ungeordneten, statistischen Knäueln zu α -helikalen Strukturen beobachtet. Im Dunklen oder nach UV-Bestrahlung liegt die photochrome Einheit in der Merocyaninform vor. Die Merocyaninmoleküle dimerisieren und verhindern auf diese Weise die Ausbildung einer definierten Sekundärstruktur. Wurden die Polypeptide dem Sonnenlicht ausgesetzt, bildete sich die Spiropyranform, was zur Auflösung der Aggregate und zur Einnahme der α -helikalen Sekundärstruktur führte.

Andere Arbeiten beschäftigen sich mit der Beeinflussung des kolloidalen Verhaltens von Spiropyran-Methylmethacrylat-funktionalisierten Silikapartikeln. Die Silikapartikel wurden mit Polymethylmethacrylatbürsten versehen, die variable Mengen an Spiropyran enthielten^[165]. Diese Kern-Schale-Kolloide bilden in Toluol stabile Suspensionen, wenn die geschlossene Spiropyranereinheit vorliegt. Die UV-induzierte Photoumwandlung zur offenen Merocyaninform verursacht eine schnelle Aggregation der Partikel^[166].

Die Funktionalisierung von PEO-Peptid-Nanobändern mit photochromen Spiropyranmolekülen sollte die Möglichkeit bieten, eine photoinduzierte Vernetzung der Nanobänder zu Überstrukturen zu erreichen. Voraussetzungen dafür schafft die hohe Dimerisierungstendenz der Merocyanineinheiten.

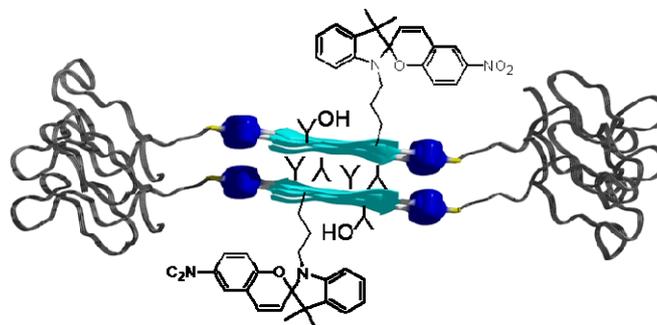


Abb. 5.15. Idealisierte, schematische Darstellung eines PEO-Peptid-Nanobandes (Seitenansicht), welche die Integration der Spiropyranereinheit in die Peptidstränge und die erwartete Anordnung auf der Nanobandoberfläche darstellt. (Die Anzahl der Aminosäureseitenketten wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit reduziert.).

Ein Ziel der im Folgenden beschriebenen Analysen sollte dementsprechend die Synthese und Charakterisierung spiropyran-/merocyaninfunktionalisierter PEO-Peptid-Konjugate sein. Weiterhin sollte das photochemisch induzierte Komplexierungsverhalten gebildeter PEO-Peptid-Nanobänder untersucht werden.

5.2.1. Synthese spiropyranfunktionalisierter PEO-Peptid-Konjugate

Eine hohe Aggregationstendenz der PEO-Peptid-Konjugate und die Ausbildung stabiler β -Faltblattmotive sollte durch die bekannte alternierende Valin-Threonin-Sequenz gewährleistet werden. Zusätzlich dazu musste in den Peptidstrang eine Aminosäure integriert werden, die die Anbindung der photochromen Gruppe erlaubt. In Analogie zu den erwähnten Arbeiten über spiropyranfunktionalisierte Poly-L-Lysine sollte eine Verknüpfung der Spiropyranereinheit über die ϵ -Aminofunktion eines Lysinmoleküls durchgeführt werden.

Das Spiropyranereinheit wurde dazu über eine kurze Alkylkette mit einer Carboxylatgruppe versehen, die unter Amidbindungsbildung mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins umgesetzt werden kann (Abb. 5.16). Die Spiropyran-carbonsäure 1-(β -Carboxyethyl)-3',3'-dimethyl-6-nitrospiropyran (SP-COOH) wurde nach Pieroni *et al.*^[167] aus 2,3,3-Trimethylindolin, 3-Iodpropansäure und 5-Nitrosalicylaldehyd synthetisiert und NMR-spektroskopisch sowie massenspektrometrisch charakterisiert.

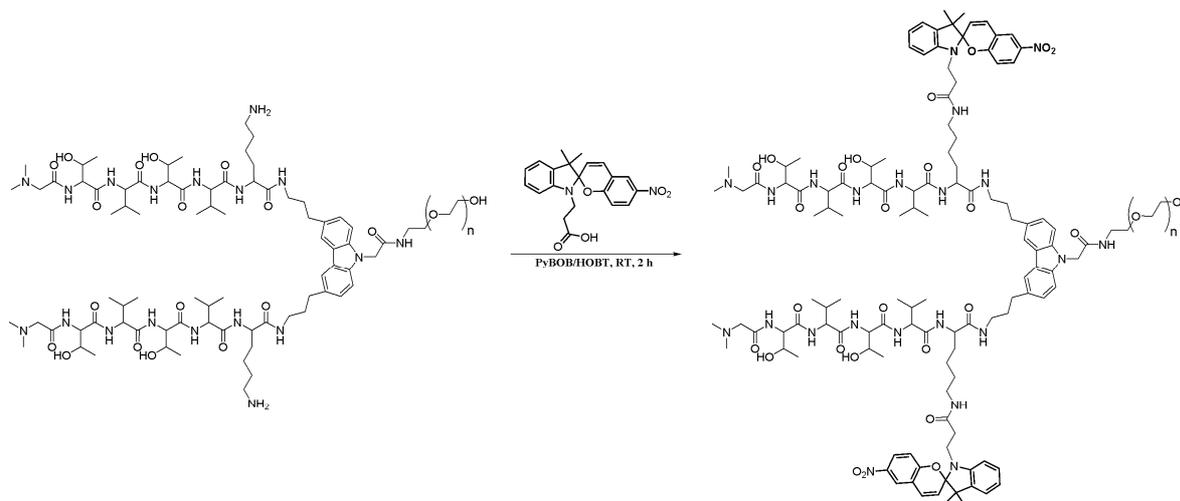


Abb. 5.16. Reaktion des lysinfunktionalisierten PEO-Peptid-Konjugates mit der Spiropyran-carbonsäure unter Amidbindungsbildung, die nach Standardbedingungen der Peptidsynthese durchgeführt wurde und im spiropyranfunktionalisierten PEO-Peptid(SP-VT)-Konjugat resultiert.

Um eine zu hohe Dichte an funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der zu bildenden Nanobänder zu vermeiden, wurde eine Aminosäuresequenz gewählt, die pro Peptidstrang nur eine Kupplungsmöglichkeit für das Spiropyranmolekül bietet. Die am Templatmolekül aufgebaute Sequenz ist demnach Lys-Val-Thr-Val-Thr-DMG.

Die Integration von Lysin bietet neben der Möglichkeit zur Anknüpfung des Spiropyrans über eine Amidbindung den Vorteil, dass das Spiropyranmolekül über einen langen, flexiblen Spacer mit dem Konjugatmolekül verbunden ist. Dadurch sollte eine freie Rotation der Spiropyrane gewährleistet sein und die Nanobänder müssten sich bei einer Dimerisierung der Merocyanineinheiten nicht zu stark annähern.

Die Synthese des spiropyranfunktionalisierten PEO-Peptid-Konjugates (**dmGly-Thr-Val-Thr-Val-Lys(SP)₂NH-Templat-PEO₇₈ = SP-VT**) (Abb. 5.16) wurde analog zu dem bekannten Syntheschema der bereits beschriebenen PEO-Peptid-Konjugate durchgeführt. Nach der Kupplung des Templatmoleküls an das Tentagel[®] PAP-Harz ($M_{n(\text{PEO})} \sim 3200$ g/mol) wurde die Aminosäuresequenz Lys-Val-Thr-Val-Thr nach Standard Fmoc-Protokollen am Peptidsynthesizer (Doppelkupplungen mit 35 min) aufgebaut. Die Kupplung der *N*-terminalen Endgruppe *N,N*-Dimethylglycin erfolgte per Hand in einem Glasreaktor. Nachfolgend wurden die semipermanenten Seitenkettenschutzgruppen des Lysins (Boc) und der Threonine (*tert*-Butylether) mit 30% TFA in DCM abgespalten. Auf diesem Weg wurde die ϵ -Aminogruppe des Lysins zu Kupplung mit der Spiropyran-carbonsäure freigesetzt. Die Amidbindung wurde unter Standardbedingungen der Peptidsynthese (Aktivierungsreagenzien = PyBOP/HOBT) gebildet (Doppelkupplung, jeweils 2 h) (Abb. 5.16). Die Abspaltung des PEO-Peptid-Konjugates **SP-VT** erfolgte mit 99% TFA + 1% TMBS (v/v) für 6 h. Das Produkt wurde aus Ether gefällt, 3 Tage gegen Wasser dialysiert (MWCO ~ 1000) und gefriergetrocknet.

Das PEO-Peptid-Konjugat **SP-VT** wurde mittels NMR-Spektroskopie eindeutig identifiziert. Anhand der aromatischen Protonensignale der Spiropyran-einheit im Vergleich zu den Peptidsignalen kann auf einen vollständigen Umsatz aller Lysinaminogruppen mit SP-COOH geschlossen werden. Ein MALDI-Massenspektrum konnte nur von der Vorstufe des Konjugatmoleküls ohne Spiropyran angefertigt werden. Damit konnte aber der fehlerfreie Aufbau der Peptidsequenz bestätigt werden, da sich von **SP-VT** kein aufgelöstes Massenspektrum erhalten ließ. Wie auch bei den imidazolfunktionalisierten PEO-Peptid-Konjugaten treten im Feststoff FTIR-Spektrum von **SP-VT** die charakteristischen Amid-I (1628 cm^{-1}), Amid-II (1547 cm^{-1}) und PEO-Ether (1099 cm^{-1}) Schwingungsbanden auf.

5.2.2. Charakterisierung der spiropyranfunktionalisierten PEO-Peptid-Konjugate

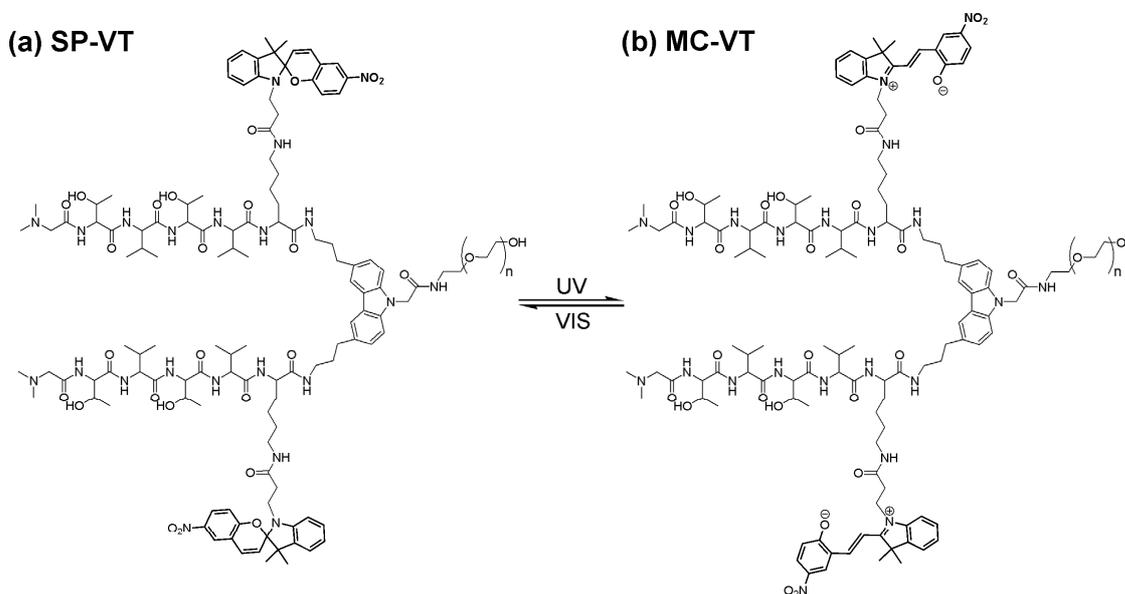


Abb. 5.17. Darstellung des Photoschaltprozesses am PEO-Peptid-Konjugat. Die Umwandlung des SP-VT-Konjugates (a) in das MC-VT-Konjugat (b) erfolgt mit UV-Strahlung einer Wellenlänge von 366 nm, die Rückreaktion im sichtbaren Bereich des Lichtes.

Der photochemische Prozess kann in Analogie zu ungebundenen Spiropyranmolekülen (Abb. 5.14) durch Bestrahlung mit UV-Licht oder durch längeres Stehen im Dunklen ausgelöst werden. Die Rückreaktion der Merocyanin- zu Spiropyranenheiten erfolgt im sichtbaren Bereich des Lichtes. Dabei hängt die Stabilität der jeweils vorliegenden Spezies vom umgebenden Lösungsmittel ab.

Die weitere Analyse des synthetisierten Konjugates untersuchte die Photoschaltbarkeit der an den Peptidstrang gekuppelten Spiropyranenheit. Mit Hilfe der UV/VIS-Absorptionsspektren sollte geklärt werden, ob die photolytische Bindungsspaltung zur Umwandlung der unpolaren Spiropyran- in die ionische Merocyanineinheit auch im Konjugat stattfindet. Lösungen des SP-VT-Konjugates wurden mit einer Konzentration von 1 mg/mL in Wasser und Methanol hergestellt und mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm bestrahlt.

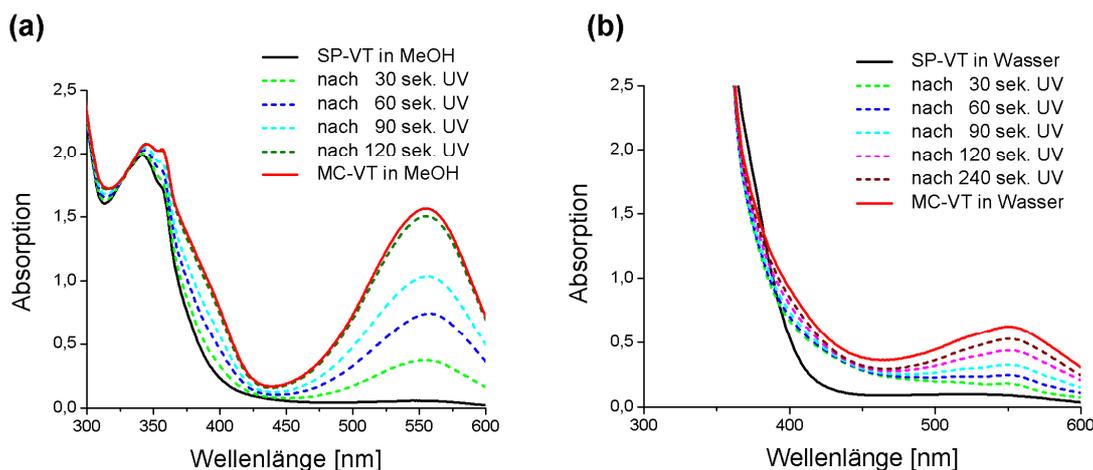


Abb. 5.16. UV/VIS-Absorptionsspektren des **SP-VT**-Konjugates in Methanol (a) und Wasser (b), die die Umwandlung der Spiropyran- in die Merocyaninspezies anhand des Aufbaus einer zusätzlichen Absorptionsbande bei 552 nm belegen.

Die erste Kurve (Abb. 5.18 a, b (schwarz)) in beiden Grafiken stellt das Spektrum des Spiropyranfunktionalisierten Konjugates vor der Bestrahlung dar. Alle weiteren Spektren wurden nach jeweils 30 Sekunden UV-Bestrahlung aufgenommen. Dabei wird der kontinuierliche Aufbau einer Absorptionsbande bei 552 nm in beiden Lösungsmitteln detektiert. Das Maximum dieser Absorptionsbande wird nach 5 Minuten Bestrahlung erreicht. Somit werden die jeweils letzte Kurven (Abb. 5.18 a, b (rot)) als die Spektren des Merocyaninkonjugates angesehen. Anhand des Aufbaus dieser für die Merocyanine charakteristischen UV/VIS-Absorptionsbande kann der Schaltprozess verfolgt werden.

Nachdem die Photoschaltbarkeit der Spiropyranereinheit bestätigt wurde, erfolgte die Untersuchung der Aggregationstendenz des PEO-Peptid-Konjugates **SP-VT**. Gemessene CD-Spektren wiesen auf die Bildung einer β -Faltblatt Sekundärstruktur in den beiden Lösungsmitteln Wasser (Abb. 5.19 a) und Methanol (Abb. 5.19 c) hin. Das für β -Faltblätter typische Minimum bei 218 nm wurde in beiden Fällen beobachtet. Dies unterstützt die Annahme, dass zusätzlich zu einer bestehenden Val-Thr-Sequenz eine weitere Aminosäure in die Peptidstränge eingebaut werden kann, ohne die Sekundärstrukturbildung dramatisch zu stören. Nach der Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) wurden die CD-Spektren des **MC-VT**-Konjugates aufgenommen (Abb. 5.19 b (Wasser); Abb. 5.19 d (MeOH)). Es konnten ebenfalls in beiden Lösungsmitteln die charakteristischen β -Faltblatt-Spektren nachgewiesen werden. Der Schaltvorgang hat weder in Wasser noch in Methanol einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der β -Faltblattstruktur.

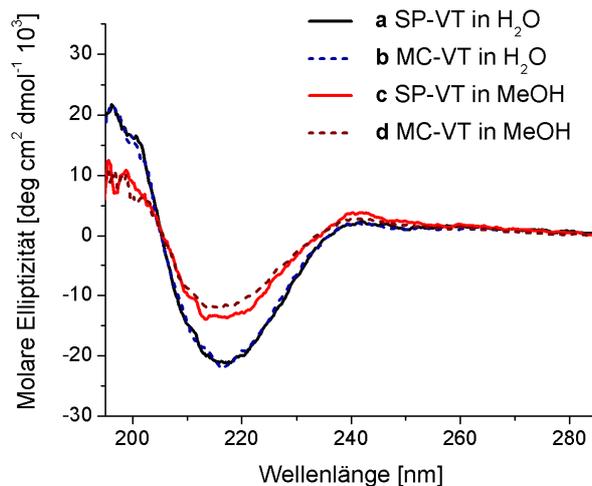


Abb. 5.19. CD-Spektren der PEO-Peptid-Konjugate in Wasser und Methanol in Abhängigkeit vom Zustand der photochromen Einheit.

Das Vorhandensein der β -Faltblatt Sekundärstruktur unabhängig von Zustand der photoschaltbaren Spiropyranereinheit bietet die Voraussetzung für die Ausbildung von einheitlichen Nanobandstrukturen und deren Vernetzung. Im nächsten Abschnitt soll daher auf die AFM-Untersuchungen zur Charakterisierung der sich bildenden spiropyranfunktionalisierten PEO-Peptid-Nanobänder eingegangen werden. Dabei sollte vor allem untersucht werden, welche Auswirkungen der Schaltprozess auf die Nanofaserstrukturen hat. Als erstes sollten dabei natürlich die Dimensionen der sich bildenden Nanobandstrukturen ermittelt werden.

Die SP-VT-Konjugate wurden mit einer Konzentration von 1 mg/mL in Wasser gelöst. Ein Teil dieser Lösung wurde 1 h mit sichtbarem Licht bestrahlt, um das reine Spiropyranconjugat zu erhalten. Der andere Teil wurde zur vollständigen Umwandlung in das ionische Merocyaninconjugat 1 h mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm bestrahlt. Die Ergebnisse der AFM-Messungen dieser auf die MICA-Oberfläche aufgetragenen Lösungen sind in Abbildung 5.20. gezeigt.

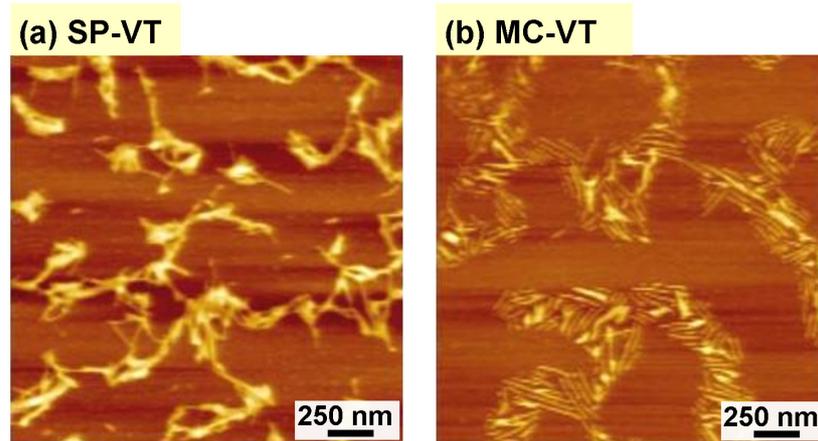


Abb. 5.20. AFM-Aufnahmen der PEO-Peptid-Nanobänder direkt nach dem Lösen der Konjugate in Wasser visualisieren die gebildeten Strukturen jeweils vor (Spiropyranform, a) und nach dem photochemischen Schalten (Merocyaninform, b).

Bei Vorhandensein der Spiropyranereinheit (Abb. 5.20 a) werden kurze, stäbchenartige Strukturen gefunden, die eine Höhe von 1.6 ± 0.2 besitzen. Die AFM-Aufnahmen der merocyaninfunktionalisierten Konjugate (Abb. 5.20 b) zeigen ebenfalls Nanobänder mit einer Länge von bis zu 300 nm und einer Höhe von 1.6 ± 0.2 nm. Beim Vergleich der Nanobänder in den beiden Schaltzuständen fällt auf, dass die Spiropyran-Nanobänder sehr dicht zusammen und teilweise übereinander liegen, während die Merocyanin-Nanobänder in sehr regelmäßigen Abständen von ~ 25 nm vorkommen.

Im Gegensatz zur Annahme, dass Sekundärwechselwirkungen zwischen den PEO-Peptid-Nanobändern über eine Aggregation der Merocyaninmoleküle verursacht würden, belegen diese Beobachtungen eher eine Tendenz zur Bündelbildung in der Merocyaninform. Die ionische Merocyaninform liegt im polaren Medium Wasser vermutlich solvatisiert vor, so dass intermolekulare Wechselwirkungen mit Überwindung der Solvationsenergie einhergehen müssten. Die regelmäßige Anordnung der Merocyanin-Nanobänder wird durch einen klassischen, physikalischen Effekt hervorgerufen. Steife, stäbchenartige Strukturen neigen sehr stark zur Bündelbildung und bilden leicht nematisch geordnete Phasen aus.

Die unpolaren Spiropyran-Nanobänder zeigen dagegen eine Art „Klebrigkeit“, so dass keine regelmäßige Anordnung gefunden wird. Diese „Klebrigkeit“ wird vermutlich durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen zwei Spiropyranereinheiten bzw. zwischen den Spiropyrangruppen und den PEO-Ketten hervorgerufen und führt zu einer Stabilisierung und Zusammenlagerung der Nanobänder. Außerdem weisen diese spontan, unter kinetischer Kontrolle gebildeten Nanobandstrukturen viele Fehlstellen auf.

An diesen unregelmäßigen Stellen treten Wechselwirkungen zwischen nicht perfekt in die Strukturen integrierten Spiropyranen, sowie laterale Wechselwirkungen zwischen Spiropyranen und PEO bevorzugt auf.

In weiteren Versuchen konnte die Länge der Nanobänder durch eine kontrollierte Aggregation deutlicher gesteigert werden. Hierbei wurden die Lösungen der **SP-VT**-Konjugate in Wasser in gleicher Weise wie die der **VH1**-Konjugate für 3 h auf 90 °C erwärmt, langsam auf RT abgekühlt und anschließend 3 Tage gegen Wasser dialysiert. Während Höhe und Breite konstant bleiben, konnte die Länge der Nanobänder von durchschnittlich ~300 nm auf ~800 nm erhöht werden (Abb. 5.21).

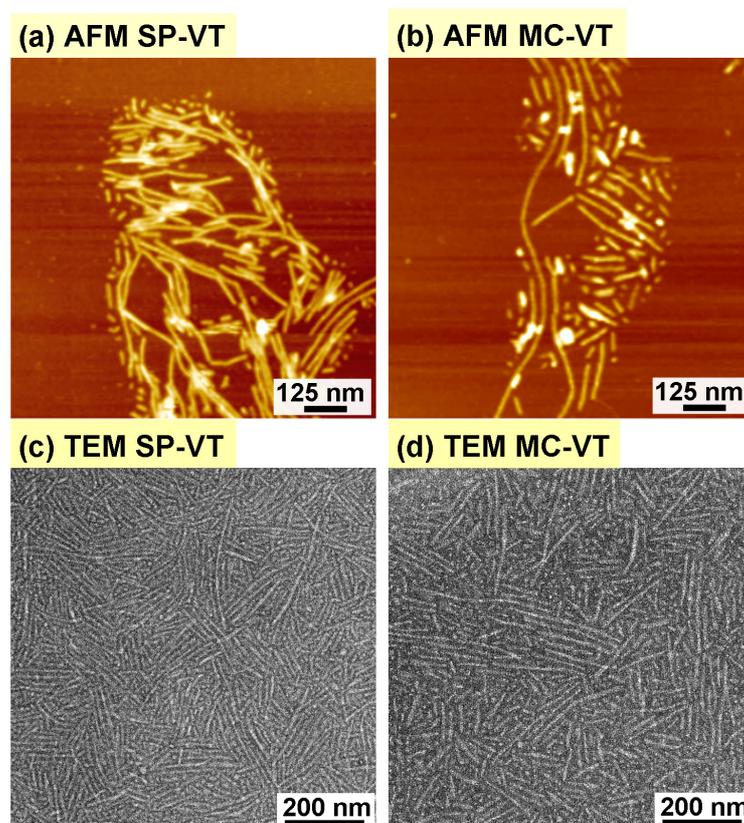


Abb. 5.21. PEO-Peptid-Nanobänder nach thermischer Deaggregation und Reaggregation durch Abkühlen. AFM-Aufnahmen (oben) und TEM-Aufnahmen (unten) der Spiropyranespezies (a, c) im Vergleich mit der Merocyaninspezies (b, d).

AFM-Messungen der abgeschiedenen Nanobänder nach der kontrollierten Aggregation zeigen, dass im Spiropyranzustand (Abb. 5.21 a) die Tendenz zur „Klebrigkeit“ der Nanobänder noch vorhanden ist. Dieser Effekt ist aber wesentlich schwächer ausgeprägt als bei den kurzen, durch direktes Auflösen erhaltenen **SP-VT**-Nanobändern.

Bei den merocyaninfunktionalisierten Konjugaten werden weiterhin separierte, parallel vorliegende Nanobänder detektiert (Abb. 5.21 b). Mit dem Zuwachs an Faserlänge ist eine Erhöhung des Querschnittverhältnisses und damit der Steifigkeit der Nanobänder verbunden. Diese besitzen demnach eine größere Tendenz zur Ausbildung von Bündeln und nematischen Anordnungen. Die Zusammenlagerung der spiropyranfunktionalisierten Nanobänder aufgrund des hydrophoben Effekts ist damit bei den kurzen Objekten (Abb. 5.20 a) wahrscheinlicher als bei den längeren Nanobändern (Abb. 5.21 b).

Die TEM-Aufnahmen von **SP-VT** (Abb. 5.21 c) und **MC-VT** (Abb. 5.21 d) nach der Reaggregation zeigen anisotrope Objekte mit Längen von 600 – 800 nm. Die Breite der Strukturen stimmt mit 14 ± 2 nm innerhalb der Fehlergrenzen mit den AFM-Messungen überein. Wesentliche Unterschiede in der Anordnung der PEO-Peptid-Nanobänder können vor und nach der UV-Bestrahlung nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ausgedehnte, steife PEO-Peptid-Nanobänder dargestellt wurden. Diese zeigten jedoch in Wasser in keinem Schaltzustand die Tendenz supramolekulare Aggregate zu bilden oder eine Vernetzungsreaktion einzugehen.

Daher sollten nachfolgend durch Variation des Lösungsmittels versucht werden die Dimerisierungstendenz der Merocyanine zu erhöhen, um damit die gerichtete Vernetzung der Nanobänder auszulösen. Dazu wurden AFM-Messungen als eine Art schnelle Screening-Methode genutzt. Dies erlaubt zwar keine Strukturanalyse der Lösungsstrukturen, wie z.B. über Lichtstreuung, Kleinwinkelröntgenstreuung oder Kleinwinkelneutronenstreuung (SANS) möglich wäre, sollten sich jedoch aufgrund sekundärer Wechselwirkungen Aggregate bilden, würden sich diese auch auf Oberflächen nachweisen lassen.

In Methanol findet die Aggregation zu stäbchenförmigen Nanobändern nach dem Lösen der PEO-Peptid(**SP-VT**)-Konjugate innerhalb von 48 h statt. Die in Abbildung 5.22. gezeigten Nanobänder haben durchschnittlich eine Länge zwischen 600 nm und 1 μm .

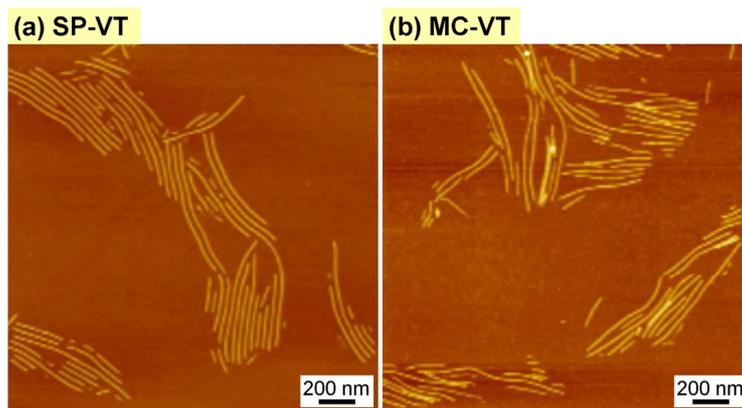


Abb. 5.22. AFM-Aufnahmen der spiropyran- (a) und merocyaninfunktionalisierten (b) PEO-Peptid-Nanobänder in Methanol.

Beim Vergleich der Nanobänder vor (Abb. 5.22 a) und nach (Abb. 5.22 b) der Bestrahlung kann festgestellt werden, dass sich die abgebildeten Strukturen nur minimal voneinander unterscheiden. Sowohl spiropyran- als auch merocyaninfunktionalisierte Nanobänder sind durch Höhen von 1.6 ± 0.1 nm und Breiten von 15 ± 3 nm gekennzeichnet. In beiden Fällen liegt die Mehrzahl der Fasern in einer parallel gepackten Anordnung vor. Die geringen Unterschiede in der Faseranordnung sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass beide photochromen Spezies in Methanol eine vergleichbare Stabilisierung erfahren. Da MeOH sowohl die zwitterionische Merocyaninform als auch die unpolare Spiropyranform stabilisieren kann, sind intermolekulare Wechselwirkungen zu gering, um Aggregate zu favorisieren.

Weitere Versuche wurden mit Lösungsmittelgemischen durchgeführt. Dabei wurden die verwendeten Lösungsmittel so gewählt, dass β -Faltblattmotive und Nanobandstrukturen erhalten bleiben. In unpolarerem Medium (50% MeOH / 50% Toluol) sollte die Tendenz zur Dimerisierung der ionischen Merocyanineinheiten erhöht werden. Dagegen wird mit Zunahme der Polarität des Lösungsmittels (50% MeOH / 50% HFP) die Dimerisierung der unpolaren Spiropyraneeinheiten wahrscheinlicher. Nach dem Lösen der **SP-VT**-Konjugate in Methanol wurden entsprechende Mengen Toluol und HFP hinzugefügt. Nach jeweils 1 h der Equilibrierung unter Bestrahlung mit sichtbarem Licht oder UV-Licht wurden die Nanobänder ($c_{\text{Konjugat}} = 0.1$ mg/mL) aus der Lösung abgeschieden und analysiert (Abb. 5.23).

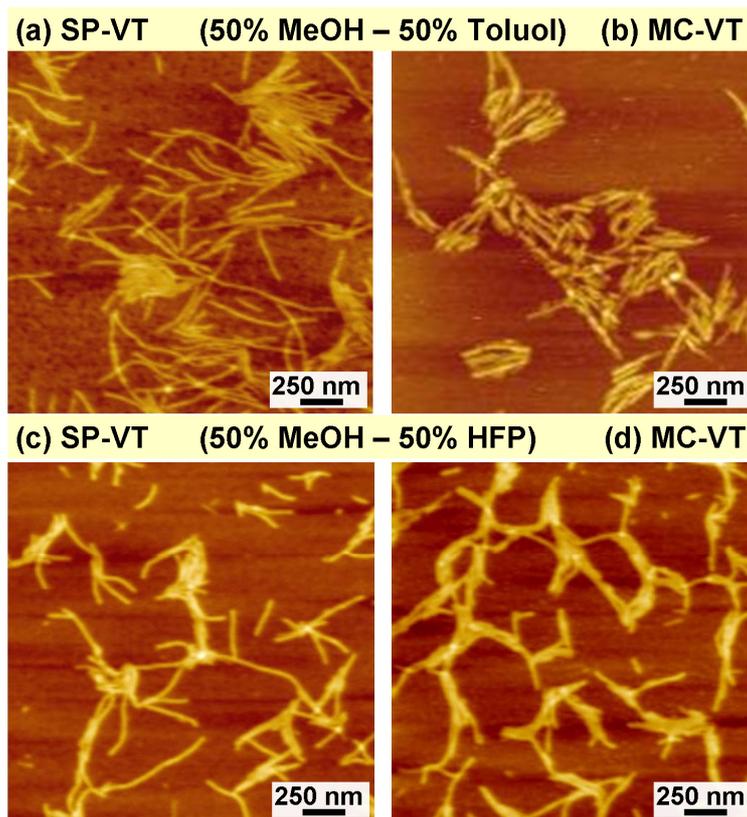


Abb. 5.23. AFM-Aufnahmen der PEO-Peptid-Nanobänder aus verschiedenen Lösungsmittelgemischen (50% Methanol / 50% Toluol (oben; a, b) sowie 50% Methanol / 50% Hexafluoroisopropanol (unten; c, d)), welche den Einfluss des Zustandes der Chromophore auf die Nanobandanordnungen zeigen.

Im Allgemeinen wird beobachtet, dass der strukturelle Aufbau der PEO-Peptid-Nanobänder unverändert bleibt. Unabhängig vom gewählten Lösungsmittel zeichnen sich die **SP-VT**- bzw. **MC-VT**-Nanobänder durch eine Höhe von 1.6 ± 0.2 nm aus. Auch die Längen der Nanobänder bleiben annähernd konstant. Die Breite wurde wenn möglich an Höhenmaxima parallel liegender Bänder bestimmt und beträgt 16-20 nm.

In 50% MeOH / 50% Toluol (v/v) liegen die spiropyranfunktionalisierten PEO-Peptid-Nanobänder (Abb. 5.23 a) in einer Mischung aus separierten und gebündelten Nanofasern vor. Die Mehrzahl der Merocyanin-Nanobänder wird als von einander getrennte Bündel mehrerer Nanobänder aufgefunden (Abb. 5.23 b). Auch wenn noch keine größeren, makroskopischen Bündel beobachtet werden konnten, deutet dieses Ergebnis in die richtige Richtung. Wie auch in der Literatur beschrieben erhöht sich die Dimerisierungstendenz der Merocyanineinheiten in unpolaren Lösungsmitteln. Somit sollte in Toluol die Aggregation der Merocyanine besonders ausgeprägt sein.

Die Untersuchung der Nanobänder in reinem Toluol zeigte jedoch, dass die Nanobänder unabhängig vom Zustand der Chromophore zu mikroskopisch großen Bündeln aggregieren. Dieses Verhalten kann vermutlich mit unspezifischen Wechselwirkungen zwischen den polaren β -Faltblattseiten erklärt werden, die auch für andere PEO-Peptid-Nanobänder (z.B. **VH2**) beobachtet wurden.

Die Zugabe von HFP zu den methanolischen Lösungen der Nanobänder sollte die Wechselwirkungstendenz zwischen den unpolaren Spiropyranenheiten erhöhen. Aber auch in diesem Fall treten eher die ionischen Merocyanin-Nanobänder (Abb. 5.23 d) gebündelt auf. Jeweils 3-4 Nanobänder schließen sich dabei zu Aggregaten zusammen. Dieses Verhalten kann bei den Spiropyran-Nanobändern in reduziertem Ausmaß ebenfalls gefunden werden (Abb. 5.23 c). Jedoch ist der Anteil an vereinzelt vorliegenden Nanofasern erheblich größer. Scheinbar ist die Dimerisierungstendenz der Merocyaninmoleküle bei dieser Lösungsmittelzusammensetzung größer als die der Spiropyranenheiten. Bei weiterer Erhöhung der HFP-Konzentration auf 90% sollte demnach eine Verstärkung der Dimerisierungstendenz der Merocyaninmoleküle eintreten. Obwohl HFP die Sekundärstrukturbildung nicht stören sollte, scheinen die Nanobandstrukturen nach Zugabe von HFP zu kollabieren. AFM-Messungen konnten in keinem Schaltzustand die PEO-Peptid-Nanobandstrukturen detektieren.

Im letzten Kapitel wurde die Synthese spiropyranfunktionalisierter PEO-Peptid-Konjugate beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die photochemische Schaltung an den Konjugatmolekülen möglich ist und dass in beiden Zuständen β -Faltblattstrukturen ausgebildet werden. Nanoskopische Bandstrukturen konnten in Wasser, Methanol und Methanol/Toluol- bzw. Methanol/HFP-Gemischen nachgewiesen werden. Die Bildung makroskopischer Überstrukturen wurde jedoch in keinem Fall durch Umwandlung der chromophoren Spezies hervorgerufen.

In Wasser konnte die Tendenz zur Ausbildung von intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den unpolaren spiropyranfunktionalisierten Nanobändern beobachtet werden. Diese war vor allem bei kurzen Strukturen, vermutlich aufgrund einer nicht perfekten Anordnung der Konjugate in den Nanobändern, ausgeprägt vorhanden. In reinem Methanol existieren dagegen keine Unterschiede im Verhalten der PEO-Peptid-Nanobänder. Durch Zugabe von HFP (50%) konnte in der Merocyaninform die Bildung von kleineren Aggregaten hervorgerufen werden.

Diese Beobachtungen stimmen grundsätzlich mit den Untersuchungen von Pieroni *et al.*^[167] zu spiropyranfunktionalisierten Poly-L-Lysinen überein. In reinem Methanol und in HFP/Methanol-Gemischen mit mehr als 40% Methanol fand keine Aggregation der Merocyanine statt. Dagegen dimerisierten in Mischungen mit nur 10% Methanol die Merocyanineinheiten, so dass unter UV-Bestrahlung *random coil* Strukturen und im sichtbaren Licht α -helikale Strukturen gefunden wurden.

Obwohl die photoinduzierte Kontrolle der Organisation der Nanobänder zu höheren Hierarchieebenen nicht erreicht werden konnte, bieten die synthetisierten PEO-Peptid(SP-VT)-Nanobänder mit den chromophoren Einheiten interessante Einsatzmöglichkeiten für die Modifizierung von Oberflächenpolaritäten oder -funktionen, die reversibel photoschaltbare Bindung von Metallen oder durch die Photoschaltung ausgelöste Kristallisationsprozesse.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die exzellenten Materialeigenschaften biologischer Konstruktionsmaterialien sind das Resultat einer hierarchischen Ordnung der Bausteine und dem definierten Zusammenwirken der Komponenten sowie Materialgrenzflächen auf allen Hierarchieebenen, von nanoskopischen bis hin zu makroskopischen Größenordnungen. Knochen sind z.B. deshalb ein Hochleistungsmaterial, weil mechanische Belastungen registriert und die Knochenstruktur an stark beanspruchten Stellen verstärkt werden kann. Viele dieser Konstruktionsmaterialien sind faserverstärkte oder fasergeleitete Komposite, in denen starre, keramische Komponenten mit weichen, polymeren Komponenten gezielt vereint werden. Meeresorganismen wie Glasschwämme bauen einzigartige, käfigartige Strukturen aus Silikakompositnadeln auf, die die Sprödigkeit des Hauptkonstruktionsmaterials Glas durch die Integration lamellarer Proteinschichten überwinden.

Inspiziert von natürlichen Konstruktionsmaterialien beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem Aufbau hierarchischer Kompositmaterialien durch die gerichtete Organisation funktionaler PEO-Peptid-Nanobandstrukturen.

In einer vorangestellten Arbeit wurde ein Konzept zur Synthese von Polyethylenoxid-Peptid-Konjugaten (PEO-Peptid-Konjugaten) und deren Aggregation zu ausgedehnten, nanoskopischen Bandstrukturen vorgestellt. Diese nanoskopischen PEO-Peptid-Bänder zeichnen sich durch die Existenz eines β -Faltblatt Peptidkerns und einer PEO-Schale aus, die die Bänder vor lateraler Aggregation bewahrt. Entlang des Peptidkerns entsteht eine Oberfläche, die in definierten Abständen mit funktionellen Gruppen besetzt ist.

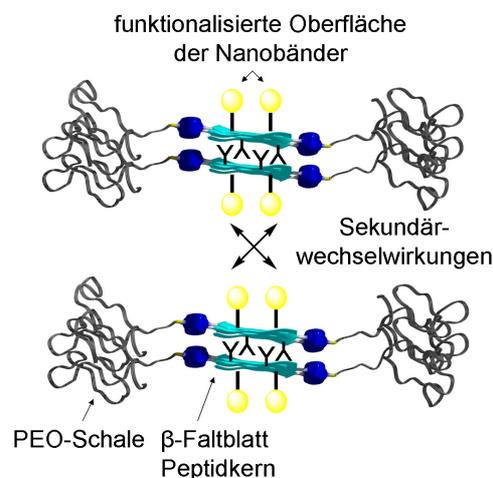


Abb. 6.1. Schematische Darstellung der PEO-Peptid-Nanobänder und deren gerichtete Organisation unter Ausbildung sekundärer Wechselwirkungen zwischen den funktionalen Oberflächen.

Durch die Variation der Aminosäuresequenz können die Nanobandoberflächen gezielt mit funktionellen Gruppen (Abb. 6.1) versehen werden. Der Aufbau hierarchisch, strukturierter Kompositmaterialien sollte mittels einer gerichtete Organisation der Nanobänder erfolgen. Die Materialeigenschaften der entstehenden Komposite können über die Art der eingesetzten Sekundärwechselwirkungen oder Co-Materialien beeinflusst werden.

Im ersten Abschnitt der Arbeit wurde die gerichtete Vernetzung hydroxyfunktionalisierter PEO-Peptid(VT)-Nanobänder in einer kontrollierten Silifizierungsreaktion beschrieben. Die Nanobandstrukturen ahmten dabei die Funktion biologischer Silika Morphogeneseproteine nach. So konnten in einer peptidgelenkten Silikakondensationsreaktion makroskopische, bioorganisch-anorganische Kompositfasern mit sechs strukturellen Hierarchieebenen erzeugt werden (Abb. 6.2).

Wurde eine Lösung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder in Ethanol unter intensivem Schütteln mit dem Silikaprecursor (hydrolysiertes Tetramethoxysilan) versetzt, fielen innerhalb weniger Sekunden makroskopische Fasergeflechte aus dem Reaktionsgemisch aus. Diese spontan gebildeten Kompositfasergeflechte zeichneten sich durch eine sehr definierte innere Feinstruktur aus. Rasterelektronenmikroskopie belegte den Aufbau aus einheitlichen, submikrometer großen Strukturelementen mit Durchmessern von ~ 95 nm, den sogenannten Protokompositfasern. Eine Analyse der Porenstruktur nach dem Calcinieren des Kompositmaterials erlaubte indirekt Aussagen über die Anordnung und Orientierung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder innerhalb der Protokompositfasern zu treffen. Anhand von Transmissionselektronenmikroskopie an durch Calcinieren erhaltenen, porösen Silikafasern ließen sich hochorganisierte, über weite Bereiche parallel in Hauptfaserrichtung liegende Poren identifizieren. Eine systematische Variation der Reaktionsparameter (insbesondere Alterungszeiten und Silikaprecursormengen) bestätigte die Annahme eines Hybridprozesses, der peptidgeleitete Silifizierung und Selbstorganisation miteinander verband.

Der vorgeschlagene Organisationsmechanismus der Kompositfaserbildung folgt biologischen Prinzipien. Demnach findet eine Anreicherung der Kieselsäure auf den funktionalen Oberflächen der Nanobandstrukturen statt, was in der Ausbildung einheitlicher Nanokompositbänder resultiert. Durch synergistische Prozesse zwischen den primär silifizierten, nanoskopischen Strukturelementen entstehen selbstorganisiert komplexe Kompositfasern, die sich durch das Vorhandensein definierter Hierarchieebenen auszeichnen. Die folgende Abbildung hebt alle strukturellen Hierarchieebenen der bioorganisch-anorganischen Kompositfasern hervor.

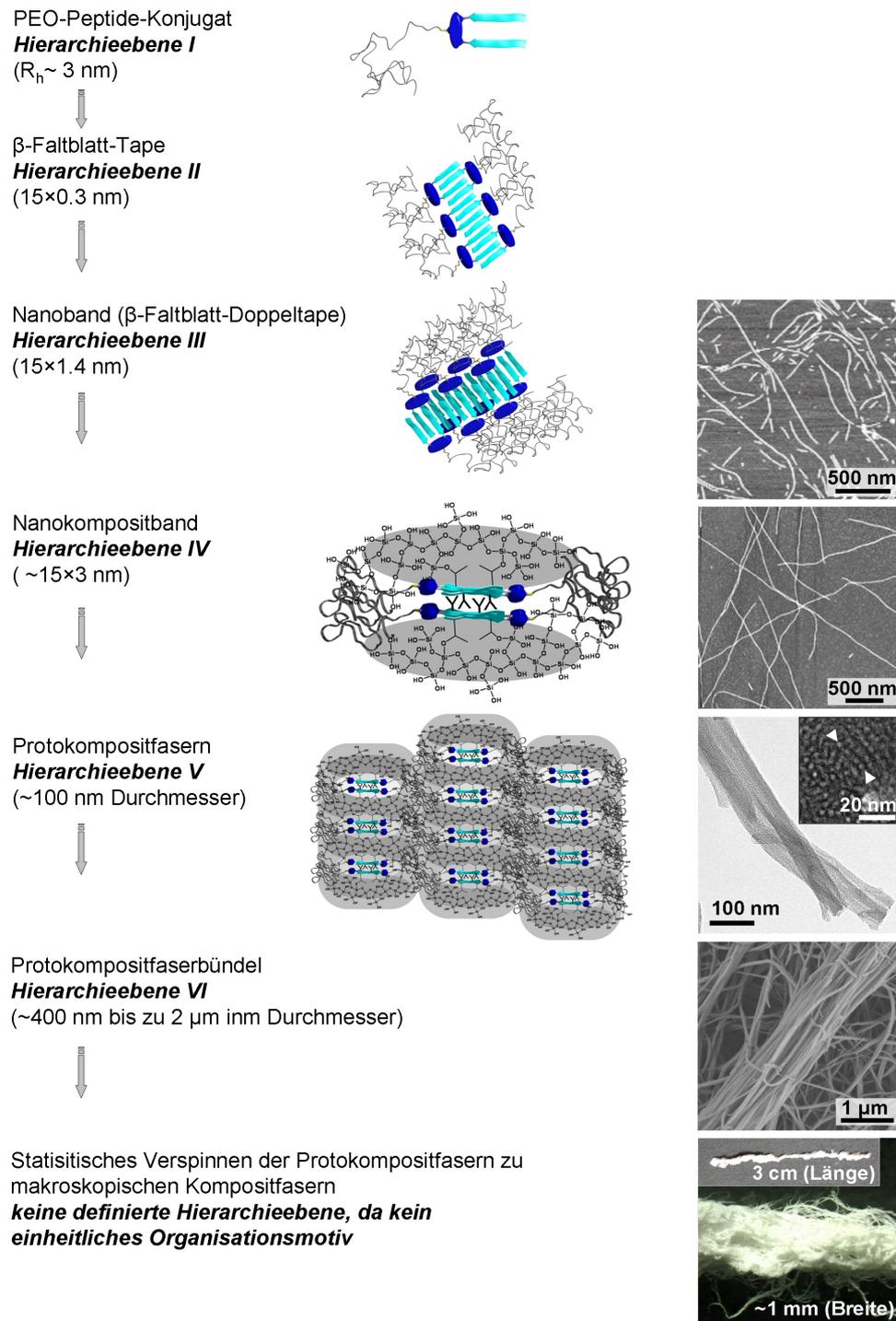


Abb. 6.2. Der biologisch inspirierte Silifizierungsprozess, in welchem durch die gerichtete Vernetzung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder mit Silika Kompositfasern mit sechs definierten Hierarchieebenen spontan gebildet werden.

Interessanterweise zeichnen sich diese spontan gebildeten Kompositfasern durch exzellente Materialeigenschaften aus. Mit einer Nanohärte von 0.99 ± 0.2 GPa erreichen die Kompositfasern etwa ein Drittel der Härte von Bioglasfasern, dafür wurde mit ~ 10 GPa ein reduziertes Eindrückmodul gemessen, das eine viermal höhere Elastizität in Bezug zu Bioglasfasern darstellt.

Die Analogie zu biologischen Prinzipien konnte mit der Isolierung der Nanokompositbänder als primäre Bausteine untermauert werden. Durch Reduktion der Konzentration der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder im Reaktionsgemisch und der drastischen Verringerung der Silikavorläuferkonzentration konnten nanoskopische Kompositbänder mit Längen von bis zu $5 \mu\text{m}$ isoliert werden. Hierbei wurde mit einer Kieselsäurekonzentration gearbeitet, die nur ungefähr dreimal höher ist als die Durchschnittskonzentration in den Ozeanen. Damit wurde bewiesen, dass die PEO-Peptid(VT)-Nanobänder, ähnlich wie die Proteinfilamente in Silka Morphogeneseorganismen, Kieselsäure aus sehr verdünnten Lösungen selektiv anreichern und damit die Kondensation der Silikanetzwerke kontrollieren können.

Auf Grundlage dieses Silifizierungsprozesses wurde im Rahmen dieser Arbeit weiterhin ein Plotprozess entwickelt, der die peptidkontrollierte Silifizierung mit einer Prozessierung des Kompositmaterials in beliebige zweidimensionale Formen vereinigt. Auf diesem Weg wurden definierte Objekte mit einer hierarchischen Mikrostruktur aufgebaut. Die gezielte Beeinflussung der Plotparameter erlaubte die Kontrolle der Breite der geplotteten Objekte und vor allem die Ausrichtung der submikrometer Strukturelemente des makroskopischen Netzwerkes entlang der Faserachse. Das Calcinieren dieser Kompositobjekte ermöglicht den Zugang zu mesoporösen Silikastrukturen in einstellbaren makroskopischen Formen, deren sehr regelmäßige Poren entlang der Plotrichtung ausgerichtet sind.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Synthese und Charakterisierung neuartiger, vororganisierter PEO-Peptid-Konjugate beschrieben. Hiermit sollten durch Variationen in der Aminosäuresequenz der Peptidstränge PEO-Peptid-Nanobänder mit verschiedenen funktionalisierten Oberflächen geschaffen werden, die eine Organisation der Nanobänder in hierarchischen Strukturen erlauben.

In Analogie zu *his-tags* in der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie oder der Metallkoordination in Zinkfingerproteinen sollten koordinative Wechselwirkungen zwischen Imidazolgruppen und Nickelionen zur Ausbildung von Sekundärwechselwirkungen und zur gerichteten Vernetzung der Nanobänder genutzt werden.

Nanobänder mit imidazolfunktionalisierten Oberflächen konnten durch gezielte Aggregation von Konjugaten mit Valin-Histidin-Sequenzen dargestellt werden. Dabei wurden in Abhängigkeit von der Länge der Peptidstränge definierte Nanobandstrukturen in Wasser und Methanol erhalten. Es konnte festgestellt werden, dass die Wechselwirkungen zwischen Imidazolgruppen und den Metallionen nicht für die Organisation der Nanobänder ausreichen. Weiterhin wurden anziehende Ionenwechselwirkungen der kationischen, imidazolfunktionalisierten Nanobänder gegenüber anionischen, hyperverzweigten Polyglycerolen untersucht. Der angestrebte Aufbau organischer Komposite konnte auch in diesen Experimenten nicht erreicht werden. Alle erzielten Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Imidazolgruppen nicht für Wechselwirkungen zur Verfügung stehen. Die Anordnung der Imidazole auf der Oberfläche der Nanobandstrukturen geschieht in ähnlichen Abständen wie in einem Kristallgitter, so dass die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Imidazolgruppen angenommen wird. Auch wenn dies eine Organisation der Nanobänder verhindert, könnten solche Eigenschaften möglicherweise für eine direktionale Protonenleitung von Interesse sein.

Des Weiteren wurden PEO-Peptid-Nanobänder mit photoschaltbaren Gruppen (Spiropyran \leftrightarrow Merocyanin) modifiziert. Diese erlauben eine reversible Schaltung zwischen der hydrophoben, neutralen Spiropyranform und der zwitterionischen, polaren Merocyaninform. Für die gezielte Vernetzung der Nanobänder sollte die bekannte Aggregationstendenz der ionischen Merocyanineinheiten ausgenutzt werden. Nach der Synthese der Konjugatmoleküle wurde die Schaltbarkeit der photochromen Einheiten nachgewiesen und die Aggregation zu Nanobandstrukturen erfolgreich durchgeführt. Anschließend wurden die Einflüsse auf die Nanobandstrukturen untersucht, die durch die Photoschaltung der unpolaren Spiropyranform in die ionische Merocyaninform auftreten.

In Wasser konnte vor allem bei kurzen Strukturen die Tendenz zur Ausbildung von intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den unpolaren, spiropyranfunktionalisierten Nanobändern beobachtet werden, während in Methanol keine Unterschiede im Verhalten der PEO-Peptid-Nanobänder existierten. Die Bildung kleiner Aggregate in der Merocyaninform der Nanobänder konnte in einem Lösungsmittelgemisch aus HFP (50%) und Methanol (50%) hervorgerufen werden.

Trotz der erzielten Ergebnisse in diesem Bereich bleibt die Suche nach effektiven Möglichkeiten zur dirigierten Vernetzung der Polymer-Peptid-Nanobänder mit dem Ziel des Aufbaus komplexer Kompositstrukturen bestehen. Die vorgestellte Arbeit trägt dabei wesentlich zum Verständnis der Organisationsprinzipien von β -Faltblatt PEO-Peptid-Konjugaten bei. Es konnte gezeigt werden, dass die Nanobandoberflächen gezielt funktionalisiert werden können, indem zusätzlich zu Valin-Threonin-Sequenzen einzelne Aminosäuren in die Peptidstränge integriert werden oder alternierende Sequenzen funktionaler Aminosäuren mit Valin aufgebaut werden.

Für die Vernetzung der Nanobänder darf die Dichte an funktionellen Gruppen auf der Oberfläche nicht zu hoch sein. Des Weiteren müssen wahrscheinlich stärkere Triebkräfte, wie die Einbettung in ein anorganisches Netzwerk, sinnvoll zur Organisation der Nanobänder eingesetzt werden. Die spontane Bildung der hierarchisch, strukturierten Silikakompositfasern zeigt jedoch, dass bei Vorhandensein starker Wechselwirkungen die PEO-Peptid-Nanobandstrukturen ideale Bausteine für den Aufbau von Kompositmaterialien darstellen.

Auf Grundlage der beschriebenen Synthesestrategie könnten durch das Zusammenwirken verschiedenartiger harter und weicher Silikanetzwerke die Materialeigenschaften der Kompositfasern gezielt beeinflusst werden. Die Einbettung der steifen und harten Nanokompositbänder in ein weiches, gummiartiges Material wie Polydimethylsiloxan würde in einem Selbstorganisationsprozess zu neuartigen, faserverstärkten Materialien führen, die sehr gute Materialeigenschaften aufweisen. In Verbindung mit einem verbesserten Plotprozess, der eventuell sogar das Plotten von dreidimensionalen Objekten erlauben könnte, wäre die Herstellung spezialisierter Funktionsmaterialien möglich.

7. Anhang

7.1. Experimenteller Teil

Die verwendeten Aminosäurederivate (Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH, IRIS Biotech), 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU, IRIS Biotech), Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP, NovaBiochem), N-Hydroxybenzotriazol (HOBT, IRIS Biotech) und das TentaGel[®] PAP-Harz (Beladung: 0.22 mmol/g, $M_n = 3200$, Rapp Polymere GmbH) wurden vor der Verwendung bei -18 °C gelagert und ohne weitere Aufreinigung direkt eingesetzt. N-Methylpyrrolidon (NMP, 99.9+%, Peptidsynthese Grad) wurde über Aluminiumoxid (sauer, basisch, neutral) und Kieselgel filtriert. Diisopropylethylamin (DIPEA, Acros), Trifluoressigsäure (TFA, Acros), Dichlormethan (DCM, IRIS Biotech, über CaH_2 getrocknet) and N,N-Dimethylformamid (DMF, Aldrich, 99+%) wurden vor dem Gebrauch destilliert. N,N-Dimethylglycin (DMG, Aldrich, 97%), Piperidin (Acros, Peptid Grad), Tetramethoxysilan (TMOS, Aldrich, 98%), Salzsäure (Maßlösung 0.1M, Riedel-de Haën) sowie alle anderen verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden wie erhalten eingesetzt.

7.1.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften

AA1 Beladung eines TentaGel[®] PAP-Harzes mit 3,6-Bis(3-[N-[tert-Butyloxy-carbonyl]-amino]propyl)-carbazol-9-essigsäure (Templatmolekül)

Die Kupplung des Boc-geschützten Templatmoleküls an das verwendete TentaGel[®] PAP-Harzes (0.22 mmol/g) erfolgte nach einer Vorschrift von Eckhard^[10]. Dazu wurden 2.0 g (0.44 mmol) des Harzes in einem Handreaktor 30 min in DMF gequollen. 0.28 g (0.53 mmol, 1.2 Äq.) des Templates, 0.33 g (0.63 mmol, 1.43 Äq.) PyAOP und 0.16 g (1.27 mmol, 2.88 Äq.) DIPEA wurden getrennt von einander in möglichst wenig DMF gelöst und anschließend vereinigt. Dieses Reaktionsgemisch wurde kurz geschüttelt (2-5 min) und anschließend auf das Harz gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurden die überschüssigen Reagenzien durch Waschen mit DMF (viermal jeweils 5 mL) entfernt. Es wurden drei weitere Kupplungen mit jeweils 0.75 Äq. Templat durchgeführt.

Der Kaiser-Test auf freie Amine war nach der vierten Kupplung mit jeweils frischen Reagenzien eindeutig negativ. Um lineare Peptidsequenzen ohne Templat zu vermeiden, wurde eine Capping-Reaktion durchgeführt. Dazu wurden 0.40 g (2.96 mmol) HOBT, 9.5 mL Essigsäureanhydrid und 4.5 mL DIPEA in einem Maßkolben gegeben und auf 50 mL mit DMF aufgefüllt. Die Cappinglösung wurde auf das Harz gegeben und 30 min geschüttelt. Anschließend wurde das Harz fünf- bis sechsmal mit jeweils 5 mL DMF und DCM gewaschen.

Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppen vom Harz-gebundenen Templat wurden 15 mL einer Lösung aus 30% TFA in Dichlormethan (v/v) auf das trockene Harz gegeben und für 30 min geschüttelt. Die Abspatlösung wurde entfernt, das PAP-Harz durch Waschen mit Dichlormethan und einer Lösung von DIPEA in DCM (30% v/v) neutralisiert. Ein Kaiser-Test zeigte bereits ohne Erwärmen deutlich die Anwesenheit von Aminen an.

AA2 Kupplung der Aminosäuresequenzen

Der Aufbau der Aminosäuresequenzen erfolgte über die Festphasen-Peptidsynthese nach Standardprotokollen der Fmoc-Chemie. Im Allgemeinen wurde diese vollautomatisiert an einem Peptidsynthesizer ABI 433a (Applied Biosystems) durchgeführt. Es wurden jeweils 0.1 mmol Ansätze gewählt. Die Aktivierung der Aminosäuren erfolgt mit HBTU/HOBT in NMP. Alle Kupplungen der Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden als Doppelkupplungen mit einer verlängerten Kupplungszeit von 35 min durchgeführt. Das Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen wird mit 20% Piperidin in NMP (v/v) erreicht, wobei die UV-Absorption des entstehenden Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes detektiert und als Maß für eine erfolgreiche Abspaltung verwendet wird.

AA3 Abspaltung der Polymer-Peptid-Konjugate vom Harz

Die Abspaltung der PEO-Peptid-Konjugate vom TentaGel[®] PAP-Harz erfolgte nach einer Standardvorschrift. Dazu wurde ein Gemisch aus 99% TFA und 1% Trimethylbromsilan (v/v) (20 mL pro 1 mmol Harz) auf das getrocknete Harz gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 6 h bei RT wurden die Harzkügelchen abfiltriert und mit TFA sowie DCM gründlich gewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum stark eingeeengt und die gewünschten Produkte aus Diethylether gefällt. Durch Zentrifugation wurden die Rohprodukte abgetrennt und anschließend getrocknet.

Zur weiteren Aufreinigung wurden die erhaltenen farblosen Feststoffe in Wasser gelöst, 2-3 Tage gegen Wasser dialysiert (Dialyseschlauch; regenerierte Cellulose; MWCO ~1000) und gefriergetrocknet.

AA4 Kaiser-Test auf freie Amine

Nach der Kupplung wurden einige Harzkügelchen entnommen und jeweils drei- bis viermal mit DCM und Diethylether gewaschen. Zu der getrockneten Harzprobe wurden jeweils 2 Tropfen der Kaiser-Test-Lösungen A, B und C (nach Lit.^[79] hergestellt) gegeben. Das Gemisch wurde anschließend 3-5 Minuten auf 80 °C erhitzt und im Abstand von 30 Sekunden auf Farbveränderungen geprüft. Trat in dieser Zeit eine Blaufärbung der Harzkügelchen oder eine andere deutliche Verfärbung der Lösung gegenüber einer Referenzprobe auf, wurde der Kaiser-Test als positiv auf das Vorhandensein freier Aminogruppen gewertet. Die Kupplungen wurden darauf hin bis zu einem negativen Kaiser-Test (keine Verfärbung der Harzkügelchen oder Lösung) wiederholt.

AA5 Analytischer Fmoc-Test zur Bestimmung des Beladungsgrades eines Harzes

2 mg eines gewaschenen und getrockneten Harzes wurden in einer UV-Küvette (d = 1 cm) mit 3 mL einer Lösung aus 20% Piperidin in DMF (v/v) versetzt. Innerhalb einer Reaktionszeit von 30 min wurden die Harzkügelchen mehrmals mit einer Pipette vorsichtig durchmischt. Anschließend wurde die UV-Absorption der Probe bei 290 nm gegen eine Referenzlösung ohne Harz gemessen. Die Berechnung des Beladungsgrades des Harzes erfolgte nach folgender Gleichung auf Grundlage des Extinktionskoeffizienten des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes von 5253 M⁻¹:

Beladung [mmol/g] = (Absorption der Probe) / (1.75 [mmol⁻¹ 10⁻³] Einwaage Harz [mg]).

7.1.2. Synthesen der PEO-Peptid-Konjugate

7.1.2.1. Synthese von $(dmGly-His-Val-His-Val-His-Val)_2NH$ -Templat- PEO_{72} (**VH1**)

0.23 g (0.1 mmol) des templatvorbeladenen TentaGel[®] PAP-Harzes (Beladung = 0.44 mmol/g) wurden nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppen (*AA1*) in den Reaktor des Peptidsynthesizers überführt. Die Aminosäuresequenz (Val-His)₃ wurde automatisiert am Peptidsynthesizer nach *AA2* gekuppelt. Dabei wurde nach den ersten drei Aminosäuren jeder nachfolgende Kupplungsschritt mit einem Kaiser-Test (*AA4*) auf Vollständigkeit überprüft. Alle Kaiser-Tests erwiesen sich als eindeutig negativ. Das *N*-terminale Ende der Peptidstränge wurde mit *N,N*-Dimethylglycin umgesetzt. Dazu wurde das Harz nach der letzten Fmoc-Abspaltung mit DMF gewaschen und in einen Handreaktor überführt. Anschließend wurden 0.10 g (1.0 mmol, 10 Äq.) DMG, 0.62 g (1.2 mmol, 12 Äq.) PyBOP, 0.16 g (1.2 mmol, 12 Äq.) HOBT und 0.26 g (2.0 mmol, 20 Äq.) DIPEA gegebenenfalls mit Hilfe von Ultraschall in DMF gelöst, gemischt und auf das Harz gegeben. Unter leichtem Schütteln wurde das Harz für 1.5 h bei RT belassen. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit je 5 mL DMF gewaschen und die Kupplung mit frischen Reagenzien wiederholt. Ein Kaiser-Test nach der zweiten Kupplung verlief negativ. Die Abspaltung des PEO-Peptid(**VH1**)-Konjugates wurde nach *AA3* durchgeführt. **VH1** wurde als farbloses Pulver in einer Ausbeute von 61% bezogen auf den Beladungsgrad des Harzes erhalten.

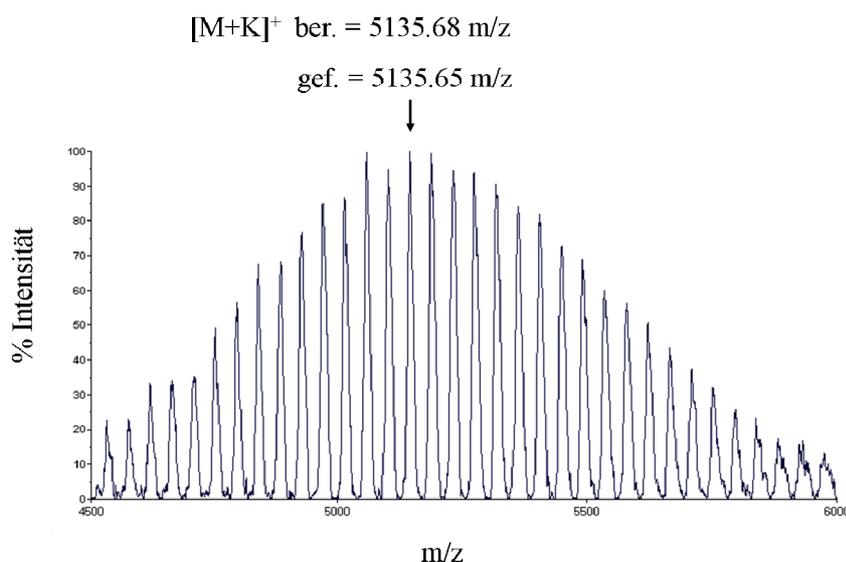


Abb. 7.1. MALDI-TOF-Massenspektrum der Verbindung $(dmGly-His-Val-His-Val-His-Val)_2NH$ -Templat- PEO_{72} (**VH1**).

¹H-NMR (400 MHz, MeOD, RT, ppm)

δ = 0.94 (bs, 36H, CH₃-Val), 1.90 (t, 4H, CH₂-Templat), 2.04 (m, 6H, CH-Val), 2.81 (t, 4H, CH₂-Templat), 2.89 (s, 12H, CH₃-DMG), 3.13 (m, 4H, CH₂-Templat), 3.22 (m, 6H, CH₂-His), 3.40 (m, 6H, CH₂-His), 3.62 (m, 288H, CH₂-PEO), 3.79 (bs, 4H, CH₂-DMG), 4.00 (m, 6H, α -CH-Val/His), 4.12 (m, 6H, α -CH-Val/His), 4.99 (s, 2H, CH₂-Carbazol), 7.28 (d, 4H, CH-Templat arom.), 7.34 (m, 6H, CH-Imidazol-His), 7.90 (s, 2H, CH-Templat arom.), 7.69 (d, 6H, CH-Imidazol-His)

FTIR-ATR (ν in cm⁻¹): 3265 (w), 2876 (m), 1669 (w), 1631 (m, Amid-I), 1551 (w, Amid-II), 1466 (w), 1342 (m), 1279 (m), 1240 (w), 1202 (w), 1104 (s, PEO-Ether), 962 (m), 841 (m), 719 (w)

TGA: T₁ = 225.0 °C, T₂ = 334.4 °C, T_{3(max. Abbau)} = 425.0 °C

DSC: T_{m1} = 49.7 °C, T_{m2} = 54.2 °C

Der De-/Reaggregationszyklus wurde in folgender Weise durchgeführt. 5 mg des gefriergetrockneten PEO-Peptid(**VH1**)-Konjugates wurden in einem 10 mL-Rundkolben in 2.5 mL Wasser gelöst (c = 2 mg/mL). Die Lösung wurde unter Rühren für 3 h auf 90 °C erhitzt und anschließend über einen Zeitraum von 6 h auf RT abgekühlt. Anschließend wurde die so behandelte Lösung 3 Tage gegen Wasser dialysiert (MWCO ~3500).

7.1.2.2. Synthese von (dmGly-Val-His-Val-His-Val)₂NH-Templat-PEO₇₂ (**VH2**)

Die Synthese des PEO-Peptid(**VH2**)-Konjugates wurde in gleicher Weise wie unter 7.1.2.1. beschrieben durchgeführt. **VH2** wurde auf diese Weise als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 65% bezogen auf den Beladungsgrad des Harzes synthetisiert.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, RT, ppm)

δ = 0.84 (bs, 36H, CH₃-Val), 1.79 (m, 4H, CH₂-Templat), 1.95 (bs, 6H, CH-Val), 2.74 (bs, 4H, CH₂-Templat), 2.79 (s, 12H, CH₃-DMG), 2.94 (m, 4H, CH₂-Templat), 3.04 (m, 6H, CH₂-His), 3.25 (m, 6H, CH₂-His), 3.52 (m, 288H, CH₂-PEO), 3.69 (bs, 4H, CH₂-DMG), 3.93 (m, 6H, α -CH-Val/His), 4.67 (m, 6H, α -CH-Val/His), 4.97 (s, 2H, CH₂-Carbazol), 7.25 (m, 6H, CH-Imidazol-His), 7.40 (d, 2H, CH-Templat arom.), 7.87 (m, 6H, CH-Imidazol-His), 8.18 (s, 2H, CH-Templat arom.), 8.47 (d, 3H, NH-Imidazol-His), 8.66 (d, 2H, CH-Templat arom.), 8.79 (bs, 3H, NH-Imidazol-His)

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 3267 (w), 2876 (m), 1668 (w), 1628 (m, Amid-I), 1551 (w, Amid-II), 1466 (w), 1342 (m), 1279 (w), 1240 (w), 1202 (w), 1099 (s, PEO-Ether), 960 (m), 841 (m), 719 (w)

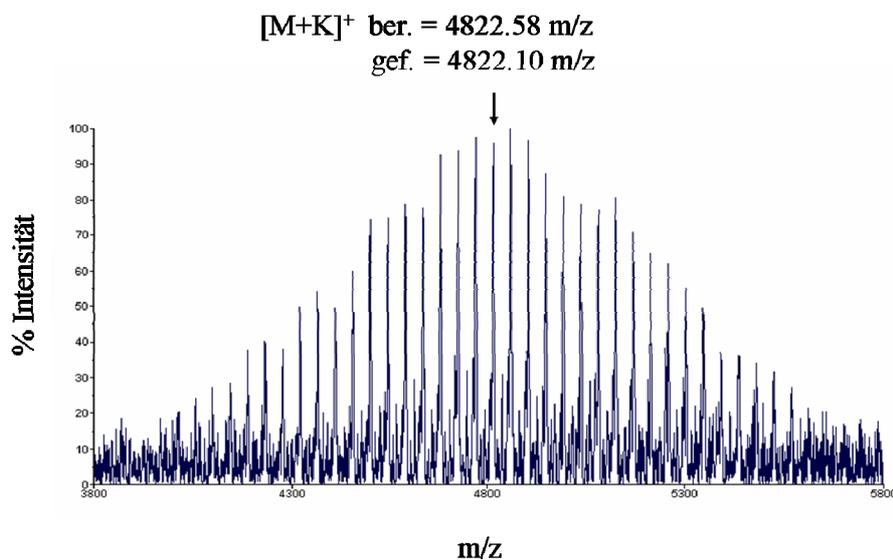


Abb. 7.2. MALDI-TOF-Massenspektrum der Verbindung $(\text{dmGly-Val-His-Val-His-Val})_2\text{NH-Templat-PEO}_{72}$ (**VH2**).

Die Aggregation der PEO-Peptid(**VH2**)-Konjugate zu den PEO-Peptid(**VH2**)-Nanobändern wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt. Dazu wurden 50 mg der gefriergetrockneten Verbindung **VH2** in 10 mL Wasser gelöst und in einen Dialyseschlauch (MWCO ~3500) überführt. Anschließend wurde das Lösungsmittel langsam (Erhöhung des Methanolanteil um 10% pro 12 h) gegen Methanol getauscht. Die resultierende Lösung der **VH2**-Nanobänder hatte eine Konzentration von 2.8 mg/mL.

7.1.2.3. Synthese von 1-(β -Carboxyethyl)-3',3'-dimethyl-6-nitrospiro(indolin2',2[2H-1]benzopyran)

Die Spiropyran-carbonsäure (*SP-COOH*) wurde nach einer Vorschrift von Pieroni *et al.*^[167] synthetisiert. Die Ausbeuten der Einzelschritte lagen bei 93% und 63% (Lit. 75% und 78%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, RT, ppm)

δ = 1.03 (s, 3H, CH₃), 1.18 (s, 3H, CH₃), 2.50 (m, 2H, CH₂-COOH), 3.41 (2 m, 2H, CH₂-N), 5.98 (d, 1H, CH-aromat.), 6.62-6.87 (m, 3H, CH-aromat.), 7.12-7.22 (m, 3H, CH-aromat.), 8.00 (d×d, 1H, CH-olefin.), 8.21 (d, 1H, CH-olefin.)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, RT, ppm)

δ = 20.0 (s, CH₃), 26.1 (s, CH₃), 33.7 (s, CH₂-aliph.), 52.9 (s, C-quart.), 107.1 (s, C-Spiro), 116.0 (s, C-O-Spiro), 119.7 (s, C-aromat.(NO₂)), 122.3 (s, CH-aromat.), 123.3 (s, CH-aromat.), 126.2 (s, CH-olefin.), 128.1 (s, CH-aromat.), 128.7 (s, CH-aromat.), 136.2 (s, CH-olefin.), 141.1 (s, C-aromat.), 146.6 (s, C-aromat.), 159.6 (s, C-N-Spiro), 173.3 (s, C-Carbonyl)

7.1.2.4. Synthese von (dmGly-Thr-Val-Thr-Val-Lys(Spiropyran)₂NH-Templat-PEO₇₈) (SP-VT)

Die ersten beiden Aminosäuren der Sequenz Fmoc-L-Lysin(Boc) und Fmoc-L-Valin wurden nach AA2 am Peptidsynthesizer, mit Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe des Valins, gekuppelt. Die weiteren beiden Aminosäuren Threonin und Valin wurden in Form des Pseudoprolinderivates Fmoc-Val-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH in einer Handkupplung aufgebaut. Nach Überführung des Harzes in den Glasreaktor wurde zu diesem ein Gemisch aus 0.24 g (0.5 mmol, 5 Äq.) Fmoc-Val-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH, 0.26 g (0.5 mmol, 5 Äq.) PyBOP, 0.08 g (0.5 mmol, 5 Äq.) HOBT und 0.13 g (1.0 mmol, 10 Äq.) DIPEA in DMF hinzugefügt. Unter leichtem Schütteln wurde das Harz 2 h bei RT mit den Reagenzien umgesetzt. Die Kupplung wurde mit frischen Reagenzien einmal mit 5 Äq. Pseudoprolin (0.24 g, 0.5 mmol) und ein weiteres Mal mit 2.5 Äq. Pseudoprolin (0.12 g, 0.25 mmol) wiederholt. Anschließend wurde das Harz mit DMF und NMP gewaschen und in den Reaktor des Peptidsynthesizers zurück überführt. Hier wurde Fmoc-L-Threonin(tBu) gekuppelt und entschützt. Das Cappen der N-terminalen Endgruppe mit N,N-Dimethylglycin erfolgte wie unter 7.1.2.1. beschrieben.

10% der Menge des Harzes (0.02 g) wurden entnommen und das PEO-Peptid-Konjugat (dmGly-Thr-Val-Thr-Val-Lys)₂NH-Templat-PEO₇₂ ohne Spiropyran zur Analyse vom Harz abgespalten und aufgereinigt.

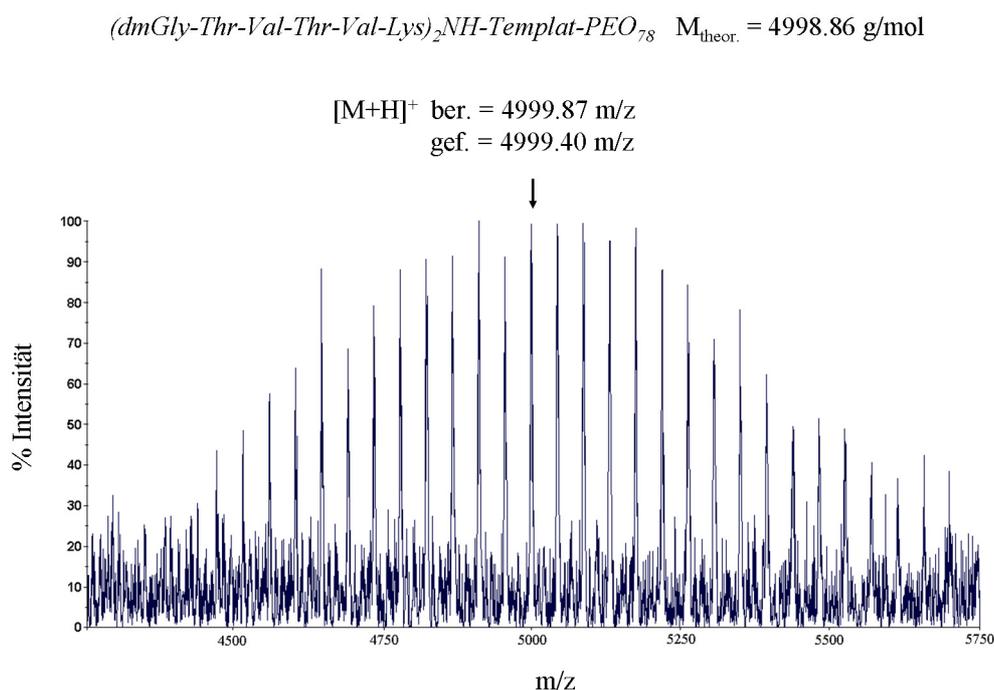


Abb. 7.3. Das MALDI-TOF-Massenspektrum der Verbindung $(dmGly-Thr-Val-Thr-Val-Lys)_2NH-Templat-PEO_{78}$, bestätigte den Aufbau der Peptidstränge ohne Fehlsequenzen.

Am restlichen Harz wurden im nächsten Schritt die Boc-Schutzgruppen am Lysin sowie die *Tert*-Butylgruppen am Threonin mit 10 mL einer Lösung aus 30% TFA in DCM (v/v) abgespalten. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wurde die TFA-Lösung entfernt, das Harz fünf- bis sechsmal mit je 10 ml DCM gewaschen und getrocknet. Vor der Kupplung der Spiropyran-carbonsäure wurde das Harz 10 min in DMF gequollen. 0.34 g SP-COOH (0.9 mmol, 10 Äq.), 0.47 g (0.9 mmol, 10 Äq.) PyBOP, 0.14 g (0.9 mmol, 10 Äq.) HOBT und 0.23 g (1.8 mmol, 20 Äq.) DIPEA wurden separat in DMF gelöst, vereinigt und kurz geschüttelt (1-2 min). Die dunkelviolette Lösung wurde auf das Harz gegeben. Es wurden zwei Kupplungen mit einer Reaktionszeit von jeweils 2 h durchgeführt. Die Abspaltung des PEO-Peptid(SP-VT)-Konjugates erfolgte nach *AA3*. SP-VT wurde als violetter Feststoff in einer Ausbeute von 59% bezogen auf den Beladungsgrad des Harzes isoliert.

(dmGly-Thr-Val-Thr-Val-Lys(Spiro))₂NH-Templat-PEO₇₈

Ein hochaufgelöstes MALDI-MS-Spektrum konnte nicht erhalten werden.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD, RT, ppm)

δ = 0.98 (m, 24H, CH₃-Val), 1.14 (s, 3H, CH₃-Spiro), 1.18 (s, 3H, CH₃-Spiro), 1.26 (m, 12H, CH₃-Thr), 1.49 (m, 8H, CH₂-Lys), 1.72 (m, 4H, CH₂-Lys), 1.82 (m, 4H, CH₂-Templat), 2.03 (bs, 4H, CH-Val), 2.17 (m, 4H, CH-Thr), 2.43 (m, 4H, CH₂-Spiro aliph.), 2.52 (m, 4H, CH₂-Spiro aliph.), 2.93 (m, 4H, CH₂-Templat), 2.98 (m, 4H, CH₂-Templat), 3.06 (s, 12H, CH₃-DMG), 3.40 (m, 4H, CH₂-DMG), 3.51 (m, 4H, CH₂-Lys), 3.73 (m, 312H, CH₂-PEO), 4.21-4.51 (3×m, 10H, α-CH-Val/Thr/Lys), 5.18 (s, 2H, CH₂-Carbazol), 5.92 (d, 2H, CH-Spiro aromat.), 6.66-6.86 (m, 6H, CH-Spiro aromat.), 7.02-7.14 (m, 6H, CH-Spiro aromat.), 7.35 (d, 4H, CH-Templat aromat.), 7.94 (d, 2H, CH-Spiro olefin.), 8.01 (d, 2H, CH-Spiro olefin.), 8.07 (s, 2H, CH-Templat aromat.)

FTIR-ATR (ν in cm⁻¹): 3269 (m), 3079 (w), 2871 (m), 1628 (m), 1547 (w), 1466 (w), 1341 (m), 1276 (w), 1241 (w), 1099 (s), 947 (m), 840 (m), 802 (w)

7.1.3. Synthesen der anorganisch-bioorganischen Kompositfasern

7.1.3.1. Hydrolyse von Tetramethoxysilan

Im Allgemeinen wurden 0.4 g Tetramethoxysilan (TMOS, 2.6 mmol) mit 0.2 g Salzsäure (0.1 M, pH = 1.06) gemischt und in einem geschlossenen 15 mL Schnappdeckelglas 1 h bei RT intensiv gerührt. Eine Vergrößerung bzw. Verkleinerung der Ansätze ist möglich, wenn ein Massenverhältnis TMOS:HCl von 2:1 eingehalten wird.

7.1.3.2. Synthese der Nanokompositbänder

Die wässrige Lösung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder (3 Gew.-%) wurde mit Ethanol auf eine Konzentration von 0.12 mg/mL verdünnt und für 4 h leicht schüttelt. Frisch hydrolysiertes Tetramethoxysilan wurde ebenfalls mit Ethanol im Verhältnis 1:10 (700 mM) verdünnt. In einem typischen Experiment wurden 1.2 μL dieser Stammlösung unter starkem Rühren zu 2 mL der ethanolischen Lösung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder gegeben.

Der Überschuss an Silikavorläufer betrug 2.5 Äq. in Bezug zu den Hydroxygruppen der Threoninseitenketten bzw. 10 Äq. pro PEO-Peptid-Konjugatmolekül. Nach dem Schütteln des Reaktionsgemisches für 10 s wurde die Reaktion abgebrochen, indem die Lösung auf Analysenträger (MICA (AFM), kohlenstoffbeschichtete Kupfernetze (TEM)) getropft wurde. Die Reaktionsbedingungen, insbesondere der Überschuss an Silikaprecursor (1 Äq. – 1000 Äq.) und die Reaktionszeit (10 s, 10 min, 48 h) wurden im Verlauf der Untersuchungen variiert. Die synthetisierten Nanokompositfasern konnten durch Zentrifugation bei 6500 rpm für 10 min aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt werden.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 3268 (m), 2889 (m), 1629 (m, Amid-I), 1558 (w, Amid-II), 1456 (m), 1377 (m), 1302 (w), 1050 (s, O-Si-O), 952 (m)

7.1.3.3. *Synthese makroskopischer anorganisch-bioorganischer Kompositfasern*

40 μL einer Lösung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder (3 Gew.-%) wurden in 1 mL abs. Ethanol gelöst. Zu dieser Ethanolösung (1.2 mg/mL) wurden 30 μL des hydrolysierten Silikavorläufers gegeben und kräftig geschüttelt. Nach 3-10 s fielen makroskopische, farblose Kompositfasergeflechte aus der Lösung aus. Die Kompositfasern wurden für weitere 16 h in der Fällungslösung belassen und anschließend mit reichlich Ethanol gewaschen. Die Ausbeute der Silifizierungsreaktion in Bezug zur eingesetzten Menge an PEO-Peptid(VT)-Nanobänder beträgt 80-85%. Um den Bildungsprozess des Kompositmaterials besser zu verstehen, wurden einige Reaktionsparameter, darunter die Menge an hydrolysiertem Silikavorläufer (10 – 2400 Äq.), die Hydrolysezeit (45 min – 6 h), die Alterungszeit (10 min – 48 h) und das Lösungsmittel, systematisch variiert.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 3267 (m), 2872 (m), 1689 (w), 1629 (m, Amid-I), 1555 (w, Amid-II), 1456 (w), 1350 (w), 1047 (s, O-Si-O), 943 (m), 793 (w)

TGA: $T_1 = 53.0\text{ }^\circ\text{C}$, $T_{2(\text{max. Abbau})} = 328.0\text{ }^\circ\text{C}$

DSC (erste Aufheizkurve): $T_m = 45\text{-}110\text{ }^\circ\text{C}$

7.1.3.4. Prozessierung der Kompositfasern (Plotprozess)

Das Plotten der Kompositobjekte wurde in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm und einer Höhe von 1.5 cm durchgeführt. Die Petrischalen wurden mit einer Mischung (0.13 mol/L) aus 20 mL abs. Ethanol und 600 μ L der frisch dargestellten Silikaprecursorlösung befüllt, was in einer Füllhöhe von 2.5 mm resultierte. Um eine konstante Ausflussgeschwindigkeit zu gewährleisten, wurde eine Kapillare (Innendurchmesser = 250 μ m) mit einer Spritzenpumpe verbunden. Die Lösung der PEO-Peptid(VT)-Nanobänder (20 mg/mL) wurde nun mit einer Geschwindigkeit von 0.2 mL/min in die ethanolische Silikavorläuferlösung injiziert. Dabei wurden etwa 4 mg an Nanobändern pro Minute verbraucht. Die Kapillare wurde in der Lösung wenig unterhalb der Oberfläche entweder per Hand oder mit Hilfe einer kontrollierten mechanischen Bewegung geführt. Konstante, ausgewählte Geschwindigkeiten zwischen 0.5 und 2 m/min und eine geradlinige Bewegung konnten erzeugt werden, indem die Kapillare mit einer computergesteuerten Drehbank verbunden wurde. 30-60 s nach der Injektion konnte die Bildung der farblosen Kompositobjekte beobachtet werden. Diese wurden für 24 h in der Kieselsäurelösung belassen und anschließend unter Ethanol aufbewahrt oder luftgetrocknet.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 3271 (s), 2920 (m), 1628 (m, Amid-I), 1556 (w, Amid-II), 1462 (w), 1352 (w), 1052 (s, O-Si-O), 957 (m), 800 (w)

TGA: $T_1 = 48.6 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_2 = 253.9 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_{3(\text{max. Abbau})} = 338.5 \text{ }^\circ\text{C}$

7.1.3.5. Calcinieren der Kompositfasern

Alle luftgetrockneten Kompositobjekte wurden auf Glasträger gebracht und in einem digitalen Ofen bei 100 $^\circ\text{C}$ für 48 h belassen. Anschließend wurde die Temperatur mit einer Heizrate von 2 K/min schrittweise auf 550 $^\circ\text{C}$ erhöht, wobei 2 h isotherm bei 350 $^\circ\text{C}$ und 1 h isotherm bei 450 $^\circ\text{C}$ geheizt wurde. Nach 1-6 h bei 550 $^\circ\text{C}$ wurden die Fasern langsam auf RT abgekühlt und analysiert. Ein FTIR-Spektrum wies das vollständige Entfernen aller organischen Bestandteile nach.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 1045 (s, O-Si-O), 802 (m)

7.2. Methoden

7.2.1. Circular dichroismus-Spektroskopie (CD)

Für Messungen des Circular dichroismus stand ein J 715 Spektrometer von Jasco zur Verfügung. Die Messungen wurden bei Probenkonzentrationen zwischen 0.3 mg/mL und 1 mg/mL in Quarzküvetten mit 1 mm Schichtdicke in einem Messbereich von 300-190 nm durchgeführt (Parameter: Auflösung: 0,2 nm, Aufnahmegeschwindigkeit: 50 nm/min, Antwortzeit: 2 s, Bandbreite: 1nm). Jedes Spektrum wurde aus 10 Einzelmessungen akkumuliert, um das Spektrum des reinen Lösungsmittels korrigiert und auf die molare Größenordnung umgerechnet.

7.2.2. HyperChem – Simulation

Die Berechnung erfolgte mit dem Programm HyperChem 7.5 der Firma HyperCube Inc. Vier Moleküle wurden nach Strukturvorschlägen aus der Literatur in einer antiparallelen β -Faltblattstruktur angeordnet. Die Partialladungen an den Atomen dieser Startstrukturen wurden mittels der semiempirische Methode PM3 berechnet. Anschließend wurden mit dem Kraftfeld Bio+ (CHARMM27) die Geometrien der Moleküle molekülmechanisch optimiert.

7.2.3. Infrarotspektroskopie (IR)

IR-Spektren von Feststoffen wurden an einem BioRad FTS6000 Spektrometer aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit abgeschwächter Totalreflexion unter Verwendung einer sogenannten Golden Gate Anordnung (Single Reflection Diamond ATR). Ein Bruker FT-IR Spektrometer gekoppelt mit einem A670 Hyperion Infrarot Mikroskop wurde genutzt, um Proben von gesponnenen Fasern mit polarisiertem IR-Licht vermessen zu können. Dabei wurden im Durchlichtmodus zwei Einstellungen des Polarisators, nämlich parallel polarisiert zur Faserrichtung = 0° und senkrecht polarisiert zur Faserrichtung = 90° , verwendet.

7.2.4. Kernresonanzspektroskopie (NMR)

^1H -NMR-Spektren (400 MHz) sowie ^{13}C -NMR-Spektren (100 MHz) wurden an einem Bruker DPX 400-Spektrometer bei Raumtemperatur gemessen. ^{13}C -NMR-Spektren wurden breitbandenkoppelt aufgenommen. Die Kalibrierung erfolgte intern gegen Restsignale der deuterierten Lösungsmittel oder zugesetztes Tetramethylsilan.

Zum Auswerten der Spektren wurde das Programm Win-NMR der Firma Bruker verwendet. Für die Beschreibung der Signalmuster werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Duplett, t = Triplett, m = Multipllett.

7.2.5. Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS)

Die SAXS-Messungen erfolgten mit einer Nonius Drehanode. Die Feststoffproben wurden unter Vakuum mit Röntgenstrahlung der Wellenlänge $\lambda = 0,154 \text{ nm}$ (Cu-K α) durchstrahlt.

7.2.6. Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Matrix-Assistierte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie wurde unter Verwendung eines Voyager-De STR Biospectrometry Workstation Spektrometers der Firma Perseptive Biosystems (Inc. Framingham, MA, USA) durchgeführt. Die Proben wurden in Wasser/Acetonitril (1:1 (v/v), mit 0.1% TFA) mit einer Konzentration von 0,1 mg/mL gelöst. Die gelösten Proben wurden in einem 1:1-Verhältnis mit der Matrixlösung (α -Cyano-4-hydroxizimtsäure, 10 mg/mL in Wasser/Acetonitril, 1:1 (v/v) mit 0.3% TFA) gemischt und 1 μL dieser Mischung auf eine Probenplatte aufgebracht. Nach Lufttrocknung der Probenpunkte bei 24 °C wurden diese 250 Mal mit dem Laser (20 kV Beschleunigungsspannung) beschossen und daraus ein gemittelttes Spektrum erhalten.

7.2.7. Nanomechanischer Test (Nanoindentation)

Die Nanoindentation wurde mit einem Diamantindenter (Berkovich Typ) eines TriboScope Nanohärte Testers (Hysitron) durchgeführt, der an ein Rasterkraftmikroskop (Nanoscope III, Digital Instruments, Santa Babara, CA) gekoppelt war. Die Fixierung der Fasern und das Auswerten der Messergebnisse erfolgten nach in Ref.^[141] beschriebenen Methoden. Kurz zusammenfassend wurden die Kompositfasern in Poly(methylmethacrylat) eingebettet, ein Schnitt senkrecht zur Faserrichtung durchgeführt und die entstandene Fläche poliert. Die Messungen wurden mit einer Indentationskraft von $\sim 500 \mu\text{N}$ durchgeführt. Aus der Eindringtiefe und der bekannten Geometrie des Prüfkopfes wurde nach *Oliver und Pharr* die Fläche des Abdrucks bestimmt. Diese entstehende Fläche A_c ist eine Funktion der Eindringtiefe h_c ($A_c = f(h_c)$) und in erster Näherung $A_c \sim 24.5 \cdot h_c^2$. Die Nanohärte H wurde nach $H = P_{\text{max}}/A_c$, mit P_{max} = maximale Indentationskraft berechnet. Das reduzierte Eindrückmodul bestimmt sich nach $E_r = (S \cdot \sqrt{\pi}) / (2 \cdot \sqrt{A_c})$, wobei S , die Kontaktsteifigkeit, aus dem Anstieg der Entlastungskurve ermittelt wird.

7.2.8. Optische Mikroskopie

Die Lichtmikroskopie-Aufnahmen wurden an einem digitalen Mikroskop VHX-100k von Keyence (Osaka, Japan) angefertigt. Getrocknete Proben wurden auf Glasobjektträger aufgebracht und mit Durchlicht oder einer Ringbeleuchtung vermessen. Aufnahmen von geplotteten Fasern wurden teilweise direkt während oder nach dem Plotten in Petrischalen unter Ethanol gemacht.

7.2.9. Rasterelektronenmikroskopie (SEM)

Für die Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen wurde ein Gemini 1550 der Firma Leo verwendet. Alle Proben wurden auf Glaträgern getrocknet und vor dem Messen im Hochvakuum mit Palladium bedampft.

7.2.10. Rasterkraftmikroskopie (AFM)

AFM-Messungen wurden an einem NanoScope IIIa der Firma Veeco Instruments (Santa Barbara, CA, USA) durchgeführt. Die Proben wurden im *tapping mode* unter Verwendung kommerzieller Siliciumspitzen (NCR-W, Spitzenradius < 10 nm) untersucht. Eine tip-Korrektur wurde nicht durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einem 10×10 μm e-scanner bei einer Resonanzfrequenz von 285 kHz und einer Kraftkonstanten von 42 Nm^{-1} angefertigt. Die Proben (Konzentration: 0.08-0.3 mg/mL in Wasser, Methanol oder Ethanol) wurden durch *spin-coating* auf frisch abgezogenen MICA-Substrate aufgebracht. Dazu wurden 10 μL der Lösung auf das stehende Substrat getropft und bei 4000 min^{-1} 60 s gedreht. Proben der Nanokompositfasern wurden nach dem Auftropfen für 30 s stehengelassen, zweimal mit Ethanol gewaschen und anschließend bei 4000 min^{-1} bis zur Trockne rotiert.

7.2.11. Thermogravimetrische Analyse (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Die TGA-Messungen erfolgten in einer oxidierenden Atmosphäre (O_2/N_2 -Gemisch) an einem Netzsch TG 209 Instrument in einem Temperaturbereich von 20-950 $^\circ\text{C}$ mit einer Heizrate von 20 K/min. Ein Gerät DSC 204 der Firma Netzsch wurde für die DSC-Messungen verwendet. Es wurden luftgetrocknete Kompositfaserproben oder gefriergetrocknete Proben der PEO-Peptid(VH1)-Nanobänder vermessen.

7.2.12. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Ein Elektronenmikroskop Omega 912 von Carl Zeiss wurde für die TEM Untersuchungen sowie die Elektronenbeugung (SAED), bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV, genutzt. Die Messungen wurden auf kohlenstoffbeschichteten Kupfernetzchen durchgeführt, wobei die Präparation je nach Art der zu untersuchenden Proben variierte. Wässrige oder methanolische Proben der PEO-Peptid-Nanobänder mit Konzentrationen von 0.1 mg/mL wurden durch Auftropfen auf die Analysenträger aufgebracht und dort für 60 s belassen. Anschließend wurde die überstehende Lösung mit einem Filterpapier abgezogen. Auf das noch feuchte Grid wurde zur Kontrastierung für ebenfalls 60 s ein Tropfen einer 1%-igen Uranylacetatlösung gegeben. Sofern die Bindung von Metallen untersucht werden sollte, wurde die Kontrastierung nicht durchgeführt.

TEM-Untersuchungen wurden weiterhin an calcinierten Silikafasern durchgeführt. Diese wurden gemörsert, die Fragmente in Aceton suspendiert ($c \sim 0.4$ mg/mL) und anschließend nach Auftropfen der Suspension auf die kohlenstoffbeschichteten Kupfernetze und Verdampfen des Lösungsmittels vermessen. Für eine präzisere Untersuchung der inneren Porenstruktur wurden die gemörserten Silikafasern nach Standard Protokollen in eine Polymermatrix (Spurr's Einbettmedium, harte Mischung) eingebettet^[168]. Dünnschnitte der Proben wurden mit einem Ultra Microtom produziert.

7.2.13. Stickstoff-/Kryptonadsorptionsmessungen

Die Adsorptions-/Desorptionsexperimente wurden an einem Micromeritics Tristar 3000 Gasadsorption Analysator gemacht. Vor der Messung wurden die calcinierten Faserproben in einem Micromeritics VacPrep061 Gerät im Vakuum bei 150 °C für 23 h entgast. Das Gerät Autosorb-1 wurde für Mikroporenanalysen und Kryptonadsorptionsmessungen benutzt. Die Auswertung der Sorptionsdaten erfolgte mit der Software Autosorb-1 von QUATACHROME.

7.2.14. UV/VIS-Spektroskopie

UV/VIS-Spektren wurden in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke an einem UV/VIS-Spektrometer der Firma Perkin Elmer (Conneticut, USA) in einem Bereich von 700-190 nm aufgezeichnet.

7.3. *Abkürzungsverzeichnis*

AFM	Atomic Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BrOP	Bromo-tri-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat
CD	Circulardichroismus
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMG	<i>N,N</i> -Dimethylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Dynamische Differentialkalorimetrie)
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
HATU	2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphate
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCTU	2-(1H-6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HFP	Hexafluoroisopropanol
His (H)	L-Histidin
HOBT	N-Hydroxybenzotriazol
IR	Infrarot
KLE	Poly(ethylen- <i>b</i> -butylen)- <i>block</i> -PEO
Lys (K)	L-Lysin
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NMP	2- <i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (kernmagnetische Resonanz)
PEO	Polyethylenoxid
PI	Polyisopren
ppm	parts per million

PyAOP	7-Azabenzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
PyBrOP	Bromo-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
PS	Polystyrol
SANS	Small Angle Neutron Scattering (Kleinwinkelneutronenstreuung)
SAXS	Small Angle X-ray scattering (Kleinwinkelröntgenstreuung)
SAED	Selected Area Electron Diffraction (Elektronenbeugung)
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis (Festphasenpeptidsynthese)
SEM	Scanning Electron Microscopy (Rasterelektronenmikroskopie)
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TEM	Transmission Electron Microscopy (Transmissionselektronenmikroskopie)
TEOS	Tetraethoxysilan
TFA	Trifluoroacetic Acid (Trifluoressigsäure)
TGA	Thermogravimetrische Analyse
Thr (T)	L-Threonin
TMBS	Trimethylbromsilan
TMOS	Tetramethoxysilan
TOF	Time of Flight (Flugzeit)
UV	Ultraviolet
Val (V)	L-Valin

8. Literatur

- [1] L. Stryer, Biochemie, *Spektrum Akademischer Verlag* **1996**, Heidelberg-Berlin-Oxford.
- [2] P. Fratzl, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2003**, 8, 32.
- [3] D. Mijatovic, J. C. T. Eijkel, A. van den Berg, *Lab on a Chip* **2005**, 5, 492.
- [4] S. G. Zhang, *Biotechnology Advances* **2002**, 20, 321.
- [5] E. Dujardin, S. Mann, *Advanced Materials* **2002**, 14, 775.
- [6] J. C. M. van Hest, D. A. Tirrell, *Chemical Communications* **2001**, 1897.
- [7] H. Schlaad, M. Antonietti, *European Physical Journal E* **2003**, 10, 17.
- [8] H. M. König, A. F. M. Kilbinger, *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46, 8334.
- [9] A. Aggeli, I. A. Nyrkova, M. Bell, R. Harding, L. Carrick, T. C. B. McLeish, A. N. Semenov, N. Boden, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98, 11857.
- [10] D. Eckhardt, *Dissertation, Universität Potsdam* **2005**.
- [11] D. Eckhardt, M. Groenewolt, E. Krause, H. G. Börner, *Chem. Commun.* **2005**, 2814.
- [12] N. Kroger, R. Deutzmann, M. Sumper, *Science* **1999**, 286, 1129.
- [13] T. Coradin, P. J. Lopez, *Chembiochem* **2003**, 4, 251.
- [14] D. E. Metzler, Biochemistry, **2001**, *Harcourt/Academic Press*.
- [15] P. Fratzl, R. Weinkamer, *Progress in Materials Science* **2007**, 52, 1263.
- [16] I. Soten, G. A. Ozin, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1999**, 4, 325.
- [17] F. Z. Cui, Y. Li, J. Ge, *Materials Science & Engineering R-Reports* **2007**, 57, 1.
- [18] J. Aizenberg, J. C. Weaver, M. S. Thanawala, V. C. Sundar, D. E. Morse, P. Fratzl, *Science* **2005**, 309, 275
- [19] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, R. L. Reis, *Macromolecular Bioscience* **2004**, 4, 743.
- [20] D. J. Prockop, K. I. Kivirikko, *New England Journal of Medicine* **1984**, 311, 376.
- [21] P. Fratzl, H. S. Gupta, E. P. Paschalis, P. Roschger, *Journal of Materials Chemistry* **2004**, 14, 2115.
- [22] H. S. Gupta, J. Seto, W. Wagermaier, P. Zaslansky, P. Boesecke, P. Fratzl, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, 17741.
- [23] L. L. Hench, *Journal of the American Ceramic Society* **1998**, 81, 1705.
- [24] J. L. Chen, B. Chu, B. S. Hsiao, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006**, 79A, 307.
- [25] J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Science* **2001**, 294, 1684.
- [26] J. C. Weaver, D. E. Morse, *Microsc. Res. Tech.* **2003**, 62, 356.
- [27] J. C. Weaver, J. Aizenberg, G. E. Fantner, D. Kisailus, A. Woesz, P. Allen, K. Fields, M. J. Porter, F. W. Zok, P. K. Hansma, P. Fratzl, D. E. Morse, *Journal of Structural Biology* **2007**, 158, 93.
- [28] R. E. Norris, *J. Eukaryot. Microbiol.* **1965**, 12, 589.
- [29] M. Sumper, E. Brunner, *Advanced Functional Materials* **2006**, 16, 17.
- [30] C. E. Hamm, R. Merkel, O. Springer, P. Jurkojc, C. Maier, K. Prechtel, V. Smetacek, *Nature* **2003**, 421, 841.
- [31] S. L. Suib, *Science* **2003**, 302, 1335.
- [32] M. E. Davis, *Accounts of Chemical Research* **1993**, 26, 111.
- [33] M. G. Clerici, *Topics in Catalysis* **2000**, 13, 373.
- [34] J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, J. B. Higgins, J. L. Schlenker, *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114, 10834.

- [35] G. J. Wang, Y. W. Liu, Z. X. Yang, L. Wang, M. X. Xu, *Chinese Journal of Organic Chemistry* **2007**, *27*, 471.
- [36] J. S. Jang, B. Lim, J. Lee, T. Hyeon, *Chemical Communications* **2001**, 83.
- [37] B. J. Scott, G. Wirnsberger, G. D. Stucky, *Chemistry of Materials* **2001**, *13*, 3140.
- [38] A. Walcarius, *Chemistry of Materials* **2001**, *13*, 3351.
- [39] C. Sanchez, B. Lebeau, *Mrs Bulletin* **2001**, *26*, 377.
- [40] M. M. Collinson, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **1999**, *29*, 289.
- [41] T. Coradin, J. Livage, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2001**, *21*, 329.
- [42] C. C. Harrison, N. Loton, *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* **1995**, *91*, 4287.
- [43] N. Husing, U. Schubert, *Angewandte Chemie-International Edition* **1998**, *37*, 23.
- [44] C. J. Brinker, K. D. Keefer, D. W. Schaefer, R. A. Assink, B. D. Kay, C. S. Ashley, *Journal of Non-Crystalline Solids* **1984**, *63*, 45.
- [45] S. Forster, M. Antonietti, *Advanced Materials* **1998**, *10*, 195.
- [46] T. M. H. Costa, V. Stefani, M. R. Gallas, N. M. Balzaretto, J. A. H. de Jornada, *Journal of Materials Chemistry* **2001**, *11*, 3377.
- [47] S. Heinemann, H. Ehrlich, C. Knieb, T. Hanke, *Int. J. Mater. Res.* **2007**, *98*, 603.
- [48] M. Antonietti, B. Berton, C. Goltner, H. P. Hentze, *Advanced Materials* **1998**, *10*, 154.
- [49] G. Soler-Illia, E. L. Crepaldi, D. Grosso, C. Sanchez, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2003**, *8*, 109.
- [50] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Froba, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 3216.
- [51] A. Monnier, F. Schuth, Q. Huo, D. Kumar, D. Margolese, R. S. Maxwell, G. D. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, B. F. Chmelka, *Science* **1993**, *261*, 1299.
- [52] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, *Nature* **1992**, *359*, 710.
- [53] G. S. Attard, J. C. Glyde, C. G. Goltner, *Nature* **1995**, *378*, 366.
- [54] H. P. Hentze, E. Kramer, B. Berton, S. Forster, M. Antonietti, M. Dreja, *Macromolecules* **1999**, *32*, 5803.
- [55] C. G. Goltner, M. Antonietti, *Advanced Materials* **1997**, *9*, 431.
- [56] S. A. Bagshaw, E. Prouzet, T. J. Pinnavaia, *Science* **1995**, *269*, 1242.
- [57] D. Y. Zhao, Q. S. Huo, J. L. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 6024.
- [58] D. Y. Zhao, J. L. Feng, Q. S. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Science* **1998**, *279*, 548.
- [59] S. Polarz, M. Antonietti, *Chemical Communications* **2002**, 2593.
- [60] C. G. Goltner, B. Berton, E. Kramer, M. Antonietti, *Chemical Communications* **1998**, 2287.
- [61] C. G. Goltner, S. Henke, M. C. Weissenberger, M. Antonietti, *Angewandte Chemie-International Edition* **1998**, *37*, 613.
- [62] E. Kramer, S. Forster, C. Goltner, M. Antonietti, *Langmuir* **1998**, *14*, 2027.
- [63] G. Schottner, *Chemistry of Materials* **2001**, *13*, 3422.
- [64] J. Y. Wen, G. L. Wilkes, *Chemistry of Materials* **1996**, *8*, 1667.
- [65] T. Ogoshi, Y. Chujo, *Composite Interfaces* **2005**, *11*, 539.
- [66] H. C. Schroder, D. Brandt, U. Schlossmacher, X. H. Wang, M. N. Tahir, W. Tremel, S. I. Belikov, W. E. G. Muller, *Naturwissenschaften* **2007**, *94*, 339.
- [67] M. M. Tomczak, D. D. Glawe, L. F. Drummy, C. G. Lawrence, M. O. Stone, C. C. Perry, D. J. Pochan, T. J. Deming, R. R. Naik, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12577.

- [68] F. Rodriguez, D. D. Glawe, R. R. Naik, K. P. Hallinan, M. O. Stone, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 261.
- [69] J. N. Cha, G. D. Stucky, D. E. Morse, T. J. Deming, *Nature* **2000**, *403*, 289.
- [70] F. Vollrath, D. P. Knight, *Nature* **2001**, *410*, 541.
- [71] L. Pauling, R. B. Corey, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, *37*, 235.
- [72] C. L. Nesloney, J. W. Kelly, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, *4*, 739.
- [73] L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, *37*, 205.
- [74] H. Lodish, A. Beck, K. C., *6th edition* **2008**, Palgrave Macmillan; Freeman.
- [75] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Annual Review of Biochemistry* **1978**, *47*, 251.
- [76] O. Hiroyuki, K. Yamada, R. Katakai, *Biopolymers* **2008**, *89*, 270.
- [77] E. Fischer, E. Fourneau, *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1901**, *34*, 2868.
- [78] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149.
- [79] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, **2000**, Oxford.
- [80] H.-D. Jakubke, *Peptide*, Spektrum Akademischer Verlag **1996**, Heidelberg-Berlin-Oxford.
- [81] M. Bergmann, L. Zervas, *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1932**, *65*, 1192.
- [82] L. A. Carpino, G. Y. Han, *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92*, 5748.
- [83] C. G. Fields, D. H. Lloyd, R. L. Macdonald, K. M. Otteson, R. L. Noble, *Peptide Research* **1991**, *4*, 95.
- [84] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 9678.
- [85] A. Halperin, M. Tirrell, T. P. Lodge, *Advances in Polymer Science* **1992**, *100*, 31.
- [86] H. A. Klok, S. Lecommandoux, *Advanced Materials* **2001**, *13*, 1217.
- [87] X. J. Zhao, S. G. Zhang, in *Polymers for Regenerative Medicine*, **2006**, pp. 145.
- [88] A. K. Mohanty, M. Misra, G. Hinrichsen, *Macromolecular Materials and Engineering* **2000**, *276*, 1.
- [89] C. Burger, B. S. Hsiao, B. Chu, *Annual Review of Materials Research* **2006**, *36*, 333.
- [90] H. G. Borner, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2007**, *208*, 124.
- [91] H. Rettig, E. Krause, H. G. Borner, *Macromolecular Rapid Communications* **2004**, *25*, 1251.
- [92] L. Ayres, M. R. J. Vos, P. Adams, I. O. Shklyarevskiy, J. C. M. van Hest, *Macromolecules* **2003**, *36*, 5967.
- [93] M. G. J. ten Cate, H. Rettig, K. Bernhardt, H. G. Borner, *Macromolecules* **2005**, *38*, 10643.
- [94] M. L. Becker, J. Q. Liu, K. L. Wooley, *Chemical Communications* **2003**, 180.
- [95] M. G. J. ten Cate, N. Severin, H. G. Borner, *Macromolecules* **2006**, *39*, 7831.
- [96] J. F. Lutz, H. G. Borner, K. Weichenhan, *Macromolecular Rapid Communications* **2005**, *26*, 514.
- [97] T. S. Burkoth, T. L. S. Benzinger, D. N. M. Jones, K. Hallenga, S. C. Meredith, D. G. Lynn, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 7655.
- [98] T. S. Burkoth, T. L. S. Benzinger, V. Urban, D. G. Lynn, S. C. Meredith, P. Thiyagarajan, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 7429.
- [99] I. W. Hamley, A. Ansari, V. Castelletto, H. Nuhn, A. Rosler, H. A. Klok, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1310.

-
- [100] A. Roesler, H.-A. Klok, I. W. Hamley, V. Castelletto, O. O. Mykhaylyk, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 859.
- [101] J. Weiss, E. Jahnke, H. Frauenrath, *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, *29*, 330.
- [102] J. M. Smeenk, M. B. J. Otten, J. Thies, D. A. Tirrell, H. G. Stunnenberg, J. C. M. van Hest, *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, 1968.
- [103] A. Rosler, H. A. Klok, I. W. Hamley, V. Castelletto, O. O. Mykhaylyk, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 859.
- [104] J. Hentschel, H. G. Borner, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 14142.
- [105] Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Chemical Communications* **2004**, 124.
- [106] J. Hentschel, E. Krause, H. G. Borner, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 7722.
- [107] E. Jahnke, I. Lieberwirth, N. Severin, J. P. Rabe, H. Frauenrath, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 5383.
- [108] E. Jahnke, A. S. Millerieux, N. Severin, J. P. Rabe, H. Frauenrath, *Macromolecular Bioscience* **2007**, *7*, 136.
- [109] J. Hentschel, M. G. J. ten Cate, H. G. Borner, *Macromolecules* **2007**, *40*, 9224.
- [110] H. A. Lashuel, S. R. LaBrenz, L. Woo, L. C. Serpell, J. W. Kelly, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 5262.
- [111] K. Janek, J. Behlke, J. Zipper, H. Fabian, Y. Georgalis, M. Beyermann, M. Bienert, E. Krause, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8246.
- [112] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Physical Review Letters* **1986**, *56*, 930.
- [113] Bild von Th. Schimmel <http://www.rz.uni-karlsruhe.de/~bc/apnet/forschung-de.html>.
- [114] E. Ruska, *Reviews of Modern Physics* **1987**, *59*, 627.
- [115] Bild von <http://www.hmi.de/bereiche/info/dualismus/elektronenmikroskop.html>.
- [116] J. C. Weaver, D. E. Morse, *Microscopy Research and Technique* **2003**, *62*, 356.
- [117] J. E. Meegan, A. Aggeli, N. Boden, R. Brydson, A. P. Brown, L. Carrick, A. R. Brough, A. Hussain, R. J. Ansell, *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14*, 31.
- [118] H. Maeda, M. Nakajima, T. Hagiwara, T. Sawaguchi, S. Yano, *Journal of Materials Science* **2006**, *41*, 5646.
- [119] Y. J. Zhang, Y. F. Shen, D. X. Han, Z. J. Wang, J. X. Song, L. Niu, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 4592.
- [120] W. Shenton, T. Douglas, M. Young, G. Stubbs, S. Mann, *Advanced Materials* **1999**, *11*, 253.
- [121] E. G. Bellomo, P. Davidson, M. Imperor-Clerc, T. J. Deming, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 9101.
- [122] R. E. Hecky, K. Mopper, P. Kilham, E. T. Degens, *Mar. Bio.* **1973**, *19*, 323.
- [123] K. D. Lobel, J. K. West, L. L. Hench, *Marine Biology* **1996**, *126*, 353.
- [124] Y. Wan, D. Y. Zhao, *Chemical Reviews* **2007**, *107*, 2821.
- [125] T. Buffeteau, E. Le Calvez, S. Castano, B. Desbat, D. Blaudez, J. Dufourcq, *Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 4537.
- [126] J. E. Gordon, G. Jeronimidis, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* **1980**, *294*, 545.
- [127] B. Smarsly, S. Polarz, M. Antonietti, *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 10473.
- [128] K. Shimizu, D. E. Morse, E. Baeuerlein, *Biomineralization: from biology to biotechnology and medical application.* **2000**, 207.
- [129] S. Mann, G. A. Ozin, *Nature* **1996**, *382*, 313.

- [130] O. Ragueneau, P. Treguer, A. Leynaert, R. F. Anderson, M. A. Brzezinski, D. J. DeMaster, R. C. Dugdale, J. Dymond, G. Fischer, R. Francois, C. Heinze, E. Maier-Reimer, V. Martin-Jezequel, D. M. Nelson, B. Queguiner, *Glob. Plan. Change* **2000**, *26*, 317.
- [131] J. Pickett-Heaps, M. Schmid A-M, L. A. Edgar, *Round, F. E. and D. J. Chapman (Ed.). Progress in Phycological Research, Vol. 7. Ix+330p. Biopress Ltd.: Bristol, England, Uk. Illus* **1990**, 1.
- [132] V. M. Yuwono, J. D. Hartgerink, *Langmuir* **2007**, *23*, 5033.
- [133] J. F. Smith, T. P. J. Knowles, C. M. Dobson, C. E. MacPhee, M. E. Welland, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 15806.
- [134] A. M. Yousefi, C. Gauvin, L. Sun, R. W. DiRaddo, J. Fernandes, *Polymer Engineering and Science* **2007**, *47*, 608.
- [135] L. Geng, W. Feng, D. W. Hutmacher, Y. S. Wong, H. T. Loh, J. Y. H. Fuh, *Rapid Prototyping Journal* **2005**, *11*, 90.
- [136] R. Landers, R. Mulhaupt, *Macromolecular Materials and Engineering* **2000**, *282*, 17.
- [137] T. H. Ang, F. S. A. Sultana, D. W. Hutmacher, Y. S. Wong, J. Y. H. Fuh, X. M. Mo, H. T. Loh, E. Burdet, S. H. Teoh, *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **2002**, *20*, 35.
- [138] E. B. Duoss, M. Twardowski, J. A. Lewis, *Advanced Materials* **2007**, *19*, 3485.
- [139] N. Baccile, D. Grosso, C. Sanchez, *Journal of Materials Chemistry* **2003**, *13*, 3011.
- [140] B. Bhushan, X. D. Li, *International Materials Reviews* **2003**, *48*, 125.
- [141] M. Sarikaya, H. Fong, N. Sunderland, B. D. Flinn, G. Mayer, A. Mescher, E. Gaino, *Journal of Materials Research* **2001**, *16*, 1420.
- [142] R. J. Mart, R. D. Osborne, M. M. Stevens, R. V. Ulijn, *Soft Matter* **2006**, *2*, 822.
- [143] E. Sulkowski, *Trends in Biotechnology* **1985**, *3*, 1.
- [144] K. Pagel, T. Vagt, T. Kohajda, B. Koksich, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3*, 2500.
- [145] D. Y. Yan, Y. F. Zhou, J. Hou, *Science* **2004**, *303*, 65.
- [146] J. J. Villafranca, *Bond, G. C., P. B. Wells and F. C. Tompkins (Ed.). Proceedings of the Sixth International Congress on Catalysis, Vols. 1 and 2. London, England, July 12-16, 1976. Xxviii+610p. (Vol. 1); Xxiv+523p. (Vol. 2). Illus. Chemical Society: London, England. Isbn 0-85186-188-1* **1977**, 66.
- [147] A. Pinero, A. Villa, T. Vagt, B. Koksich, A. E. Mark, *Biophysical Journal* **2005**, *89*, 3701.
- [148] A. N. Zelikin, E. S. Trukhanova, D. Putnam, V. A. Izumrudov, A. A. Litmanovich, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 13693.
- [149] M. A. C. Stuart, B. Hofs, I. K. Voets, A. de Keizer, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2005**, *10*, 30.
- [150] Y. Wang, A. S. Angelatos, F. Caruso, *Chemistry of Materials* **2008**, *20*, 848.
- [151] P. T. Hammond, *Advanced Materials* **2004**, *16*, 1271.
- [152] L. Hartmann, S. Haefele, R. Peschka-Suess, M. Antonietti, H. G. Borner, *Chemistry-a European Journal* **2008**, *14*, 2025.
- [153] Y. Kakizawa, K. Kataoka, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 203.
- [154] C. S. Peyratout, L. Dahne, *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43*, 3762.
- [155] H. Turk, R. Haag, S. Alban, *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*, 162.
- [156] M. Casolaro, S. Bottari, A. Cappelli, R. Mendichi, Y. Ito, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1325.
- [157] G. Will, *Zeitschrift Fur Kristallographie Kristallgeometrie Kristallphysik Kristallchemie* **1969**, *129*, 211.

-
- [158] W. Munch, K. D. Kreuer, W. Silvestri, J. Maier, G. Seifert, *Solid State Ionics* **2001**, *145*, 437.
- [159] M. F. H. Schuster, W. H. Meyer, M. Schuster, K. D. Kreuer, *Chemistry of Materials* **2004**, *16*, 329.
- [160] H. G. Herz, K. D. Kreuer, J. Maier, G. Scharfenberger, M. F. H. Schuster, W. H. Meyer, *Electrochimica Acta* **2003**, *48*, 2165.
- [161] R. Exelby, R. Grinter, *Chemical Reviews* **1965**, *65*, 247.
- [162] G. Berkovic, V. Krongauz, V. Weiss, *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 1741.
- [163] O. Pieroni, A. Fissi, N. Angelini, F. Lenci, *Accounts of Chemical Research* **2001**, *34*, 9.
- [164] A. Fissi, O. Pieroni, N. Angelini, F. Lenci, *Macromolecules* **1999**, *32*, 7116.
- [165] M. Piech, T. M. Long, G. M. Jamison, C. S. Yun, N. S. Bell, *Macromolecules* **2006**, *39*, 6313.
- [166] N. S. Bell, M. Piech, *Langmuir* **2006**, *22*, 1420.
- [167] A. Fissi, O. Pieroni, G. Ruggeri, F. Ciardelli, *Macromolecules* **1995**, *28*, 302.
- [168] A. R. Spurr, *Journal of Ultrastructure Research* **1969**, *26*, 31.

Danksagung

An dieser Stelle möchte allen Menschen danken, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Markus Antonietti für die Möglichkeit am MPI promovieren zu können, seinen fachlichen Rat, das Interesse an der Arbeit und die kreative Atmosphäre die er am MPI schafft.

Meinem Betreuer Dr. Hans Börner danke ich ganz herzlich für alle seine tausend Ideen, für das spannende Thema und die Freiheiten bei der Bearbeitung des selbigen, dafür dass er immer an mich und meine Projekte geglaubt hat, für seine immer offene Tür, seinen Optimismus, für die Durchsicht der Arbeit und für noch viel mehr.

Ich danke allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Börner für das entspannte Arbeitsklima, ihre Hilfsbereitschaft sowie ihre Bereitschaft bei sämtlichen Problemen und Fragen zu helfen. Es hat Spaß gemacht mit Euch zu arbeiten.

Ein großer Dank geht an Katharina Ostwald und Jessica Brandt für die Unterstützung im Labor, für Bestellungen und all die anderen kleinen Dinge, die einem das Leben und Arbeiten erleichterten, für aufmunternde Worte in allen Lebenslagen, für lustige Mittagspausen, für Tee und Kekse, dafür dass sie mich immer unterstützt haben und besonders natürlich für ihre Freundschaft.

Für die schnelle und zuverlässige Bearbeitung meiner Proben möchte ich allen TechnikerInnen des Instituts Dank aussprechen: Olaf Niemeyer für NMR-Messungen, Irina Shekova für TGA- und DSC-Messungen, Regina Rothe für Sorptionsmessungen, Annemarie Martins und Petra Leibner für die Nanoindentationsmessung. Besonders danke ich hiermit Anne Heilig für die Bereitschaft zur Erklärung des AFM und die Unterstützung wann immer Fragen zu Messungen auftauchten. Rona Pitschke und Heike Runge danke ich für die Präparation und Messung zahlreicher TEM- und SEM-Proben meiner Fasern, manche davon in letzter Minute. Außerdem danke ich Dr. Eberhard Krause und Heike Stephanowitz für die Messung der MALDI-Massenspektren.

Ich danke Dr. Arne Thomas für Diskussionen über Silikastrukturen sowie die Bereitschaft einige Zeit mit TEM-Messungen meiner Proben zu verbringen. Dr. Bernd Smarsly danke ich für Röntgenmessungen und deren Auswertung.

Ein großes Dankeschön geht weiterhin an: Heike (für ihre Freundschaft und hilfreiche Kommentare zur Arbeit), Harald (für skurrile und aufschlussreiche Gespräche sowie seine Hilfsbereitschaft), Tina (für die Hilfe im Labor und nette Gespräche), Esther und Florian (die im Rahmen von Praktika ihren Teil zur Arbeit beigetragen haben), Thomas Pfohl und Sarah Köster (für zwei interessante Tage am Max-Planck-Institut für Dynamik und Selbstorganisation in Göttingen, spannende Experimente und Inspiration für einige Versuche), Stephan Hauschild (für seine zahlreichen Versuche die PEO-Peptid-Nanobänder im ink-jet-Verfahren zu drucken), Prof. Rainer Haag (für die Überlassung der funktionalen Polyglycerole), Günter Haseloff (für den Umbau der Drehbank, sämtliche andere mechanische Arbeiten und seine Geduld und Ausdauer beim Plotten der Fasern) sowie allen, die die Zeit am MPI bereichert haben: Laura, Jens, Nancy, Andreas, Anja, Emre, Matthias, Jens, Julia, Pantea, Farnoosh, Dennis, Ines, Florian, Christina, Christine, Jens, Kirstin, Katrin und alle die ich vergessen habe.

Ganz besonders möchte ich auch meiner Familie danken, die immer hinter mir gestanden und mich in allen Belangen unterstützt hat sowie für die Motivation, Zuversicht und Geduld während der Entstehung der Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und der zitierten Literatur angefertigt zu haben.

Potsdam, 14.04.2008

Stefanie Kessel