

Peptid-Polymer-Hybridnanoröhren**

Julien Couet, J. D. Jeyaprakash S. Samuel,
Alexey Kopyshchev, Svetlana Santer und
Markus Biesalski*

Seit der Entdeckung von Kohlenstoffnanoröhren^[1] steigt das Interesse an organischen Röhrenstrukturen mit sehr kleinen Dimensionen. Damit wächst auch die Zahl der möglichen Anwendungen dieser Strukturen in den Bereichen Mikroelektronik,^[2,3] Separationstechnik^[4] und Biomedizin^[5] ständig. Immer mehr dieser organischen Nanoröhren und -fasern werden dabei durch so genannte Bottom-up-Strategien hergestellt.^[6] Interessante Beispiele sind die Selbstorganisation von amphiphilen Molekülen (niedermolekularen Lipiden,^[7] di-,^[8] tri-^[9] und Coil-Ring-Coil^[10]-Blockcopolymeren), Foldamere^[11] und die Selbstorganisation von cyclischen Peptiden zu „Peptidnanoröhren“.^[12–14]

Cyclische Peptide aus einer gleichen Zahl von alternierenden D- und L-Aminosäuren zeigen ein ausgeprägtes Verhalten zur Selbstorganisation in röhrenartigen Strukturen, die aus einer sehr großen Zahl an wasserstoffverbrückten molekularen Bausteinen bestehen.^[12–14] Aufgrund ihrer Design-Prinzipien liegen diese cyclischen Peptide in einer flachen Konformation vor, in der alle Amidgruppen senkrecht zur Molekülebene liegen und mit anderen Ringen unter bevorzugter Bildung einer antiparallelen β -Faltblattstruktur wechselwirken können.^[15] Die gewählte Konfiguration der Aminosäuren führt dazu, dass alle Seitenketten nach außen zeigen, wobei ein Hohlraum im Röhreninneren entsteht, dessen Abmessungen allein durch die Zahl der Aminosäuren in den cyclischen Peptiden definiert sind und dessen Oberflächenchemie von den Seitenkettenfunktionen bestimmt

wird. Abhängig von der implementierten Seitenkettenfunktion liegen diese Röhren als Einzelröhren oder in Form dreidimensionaler Aggregate vor.^[16]

Seit den ersten Arbeiten von Ghadiri und Mitarbeitern^[12] konnten bereits mögliche Anwendungen dieser Peptidnanoröhren als neuartige Antibiotika^[17] oder artifizielle Ionenkanäle^[18] aufgezeigt werden. Die Verwendungsmöglichkeiten dieser Nanoröhren werden dabei durch deren Oberflächenchemie bestimmt. Diese kann, wie durch Ghadiri und Mitarbeiter gezeigt,^[12–14] durch die Synthese cyclischer Peptide mit unterschiedlichen Sequenzen eingestellt werden. Eine weitere interessante Strategie zur Steuerung der Oberflächeneigenschaften dieser Peptidröhren ist die Anbindung von synthetischen Polymeren an die selbstorganisierten Strukturen, wodurch die Peptidröhre von einer Polymerhülle umgeben wird. In diesem Fall wird die Struktur des resultierenden Hybridmaterials sowohl von den Peptid-Grundbausteinen als auch von der Polymerhülle beeinflusst, und die Oberflächenchemie sollte sich durch die Wahl unterschiedlicher Polymere einstellen lassen.

Die Organisation von Peptidinitiatoren zu Peptidröhren mit einer anschließenden oberflächeninduzierten Polymerisation auf der Peptidröhre kann eine neue Möglichkeit zur Herstellung einer großen Zahl unterschiedlicher Hybridmaterialien bieten, die durch die Verwendung rein synthetischer Polymersysteme nicht einfach zu erhalten sind. Ein interessanter Aspekt dieser Strategie ist, dass dabei eine definierte Strukturinformation von einem biologischen Modul auf ein synthetisches Polymer übertragen werden kann (und umgekehrt).

Andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass modifizierte Peptide als Polymerisationsinitiatoren eingesetzt werden können, wodurch synthetische Polymere kovalent an die jeweiligen Peptide gebunden werden.^[19–21] In diesem Zusammenhang wurden zum Beispiel modifizierte Peptide als Initiatoren bei der Nitroxid-initiierten, kontrollierten radikalischen Polymerisation^[19] und bei Atomtransferpolymerisationen (ATRP) eingesetzt.^[20,21]

In unserer Arbeit nutzen wir die oben beschriebene Fähigkeit cyclischer Peptide, sich spontan zu definierten Strukturen zusammenzulagern. Diese Bausteine werden anschließend zur Herstellung neuartiger Peptid-Polymer-Hybridnanoröhren verwendet. Unsere Strategie ist in Abbildung 1 dargestellt. Zunächst wird ein cyclisches Peptid, das aus acht Aminosäuren mit alternierender D- und L-Konfiguration besteht, synthetisiert und an bestimmten Seitenkettenfunktionen mit Initiatorgruppen versehen. Diese sollen später als Starter für eine kontrollierte radikalische Polymerisation (ATRP) eingesetzt werden. Die so hergestellten cyclischen Peptidinitiatoren organisieren sich analog zu den oben beschriebenen cyclischen Peptiden in Form von Nanoröhren, und eine anschließende oberflächeninduzierte Polymerisation von *N*-Isopropylacrylamid (NIPAM) in wässriger Dispersion führt zu Peptid-Polymer-Hybridnanoröhren; bei dieser neuen Klasse von polymeren Hybridnanostrukturen ist das synthetische Polymer in Form einer Hülle kovalent an einen Kern gebunden, der aus einer Peptidröhre besteht.

Der cyclische Peptidinitiator wird in reiner Trifluoressigsäure (TFA) gelöst; anschließend wird langsam die Wasser-

[*] J. Couet, A. Kopyshchev, Dr. S. Santer, Dr. M. Biesalski
Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK)
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg (Deutschland)
Fax: (+49) 761-203-7163
E-mail: biesalsk@imtek.de

Dr. J. D. J. S. Samuel
IBM Almaden Research Center
San Jose, CA95120 (USA)

[†] geb. Prokhorova

[**] Wir danken folgenden Personen für die Unterstützung bei der Analytik von cyclischen Peptiden und den Polymer-Hybridmaterialien: Dr. J. Wörth und C. Warth (ESI-MS und LC-MS), Dr. M. Ade (Röntgendiffraktion), Dr. R. Thomann und A. Neub (TEM) sowie K. Shroff (Peptidsynthese). Finanziell werden wir unterstützt von der DFG (Emmy Noether-Programm), der Landesstiftung Baden-Württemberg (Eliteförderprogramm Nachwuchswissenschaftler) und dem Fonds der Chemischen Industrie. J.C. dankt für ein Stipendium im Rahmen des Doktorandenprogramms des DAAD. Wir danken Prof. J. Rühle und Dr. O. Prucker für die Unterstützung und die Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

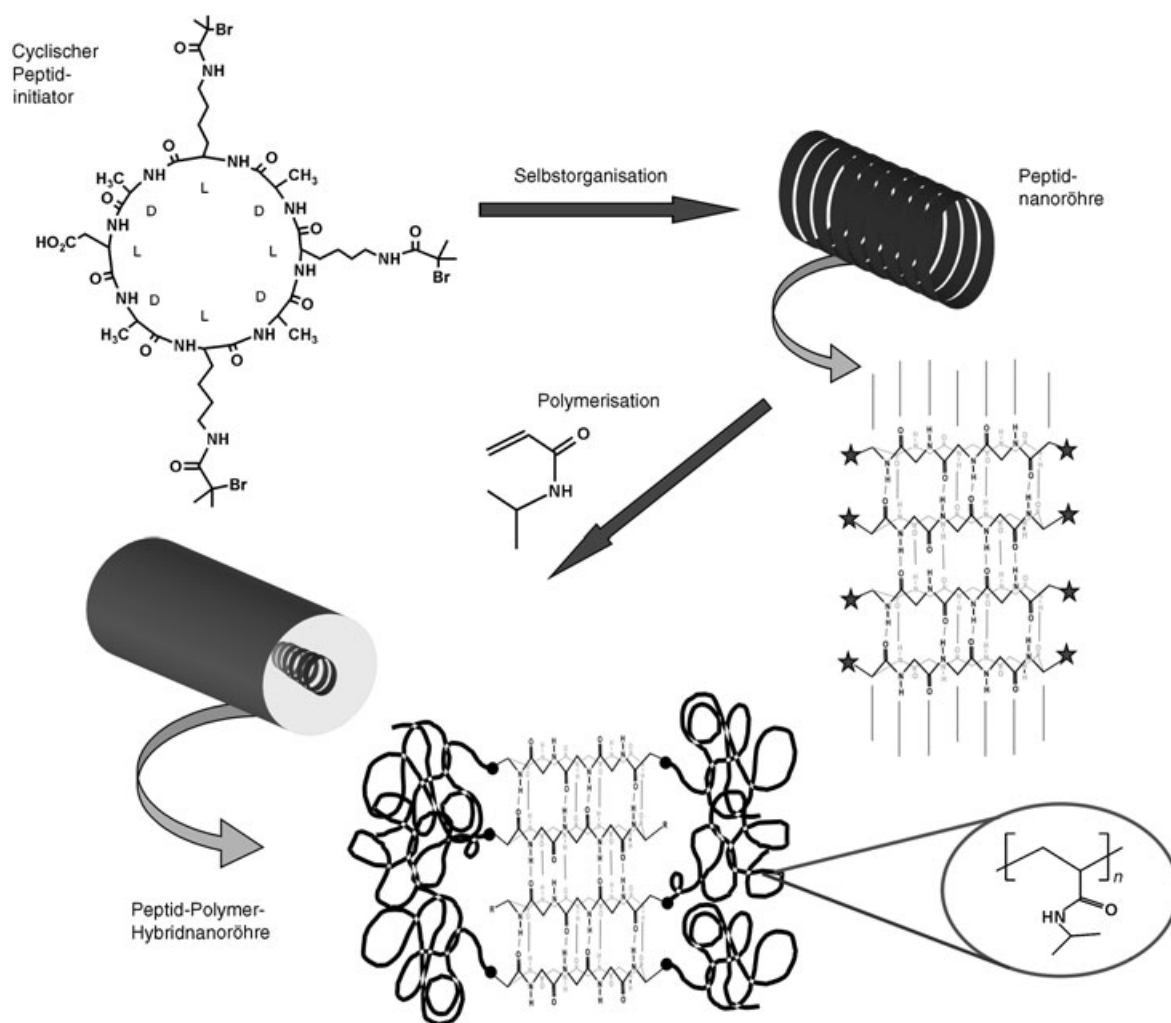


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Synthese von Peptid-Polymer-Hybridnanoröhren. Ein cyclisches Peptid mit Polymerisationsinitiatoren in bestimmten Seitenketten organisiert sich spontan zu Peptidnanoröhren, die die Initiatorgruppen ausschließlich auf ihrer Außenfläche tragen. Eine anschließende oberflächeninduzierte Polymerisation in Gegenwart von NIPAM-Monomer umhüllt den Peptidnanoröhrenkern mit einer kovalent gebundenen PNIPAM-Hülle.

konzentration in der Lösung erhöht, wobei sich das Peptid in Form von Nanoröhren organisiert. Die Nanoröhren können durch einfaches Zentrifugieren und Waschen mit reinem Wasser isoliert und dann hinsichtlich ihrer chemischen Identität, der Oberflächenchemie, der internen Struktur und der Morphologie charakterisiert werden. FTIR-spektroskopischen Untersuchungen zufolge besteht die innere Struktur der Peptidnanoröhren aus dicht gepackten Peptiden und baut sich in Form einer β -Faltblattstruktur durch intermolekulare Wasserstoffbrücken auf.^[22] Das Röntgenphotoelektronenspektrum einer Probe dieser Peptidnanoröhren zeigt das Vorhandensein von Brom, eine Grundvoraussetzung für den späteren Einsatz als ATRP-Initiatoren.^[22] Die Morphologie der Peptidnanoröhren kann mit Rasterkraftmikroskopie (AFM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht werden. In Abbildung 2 ist exemplarisch ein Ensemble von Peptidnanoröhren auf einem Siliciumwafer gezeigt. Hier wurden die Peptidnanoröhren aus wässriger Dispersion auf den Wafer aufgetragen (Drop-Cast-Verfahren) und getrocknet. In der AFM-Aufnahme erkennt

man sowohl Einzelröhren als auch zweidimensionale Aggregate. Die mittlere statistische Höhe der Peptidnanoröhren liegt bei 1.7 ± 0.2 nm (Abbildung 2c). Die Länge der Peptidnanoröhren liegt zwischen 100 und 500 nm. Beide Werte sind konsistent mit experimentellen und theoretischen Studien zu Peptidnanoröhren, die aus acht alternierenden D- und L-Aminosäuren bestehen.^[16] Die Höhe der faserartigen Aggregate, wie sie in Abbildung 2 gezeigt sind, entspricht exakt der Höhe der Einzelröhren, was darauf schließen lässt, dass diese Strukturen erst während des Trocknungsvorgangs auf der Oberfläche entstehen. Ein eindeutiger Beleg hierzu steht allerdings noch aus.

Die Peptidnanoröhren werden in einer Mischung aus Wasser, Monomer und Polymerisationsadditiven dispergiert, und eine oberflächeninduzierte ATRP-Polymerisation bei Raumtemperatur wird gestartet. Als Monomer wurde NIPAM verwendet, da es eine nicht toxische Polymerhülle um die Peptidnanoröhren aufbaut, die zudem über interessante physikalische Eigenschaften verfügt (z.B. eine untere kritische Lösetemperatur (LCST)). Nach einer bestimmten Poly-

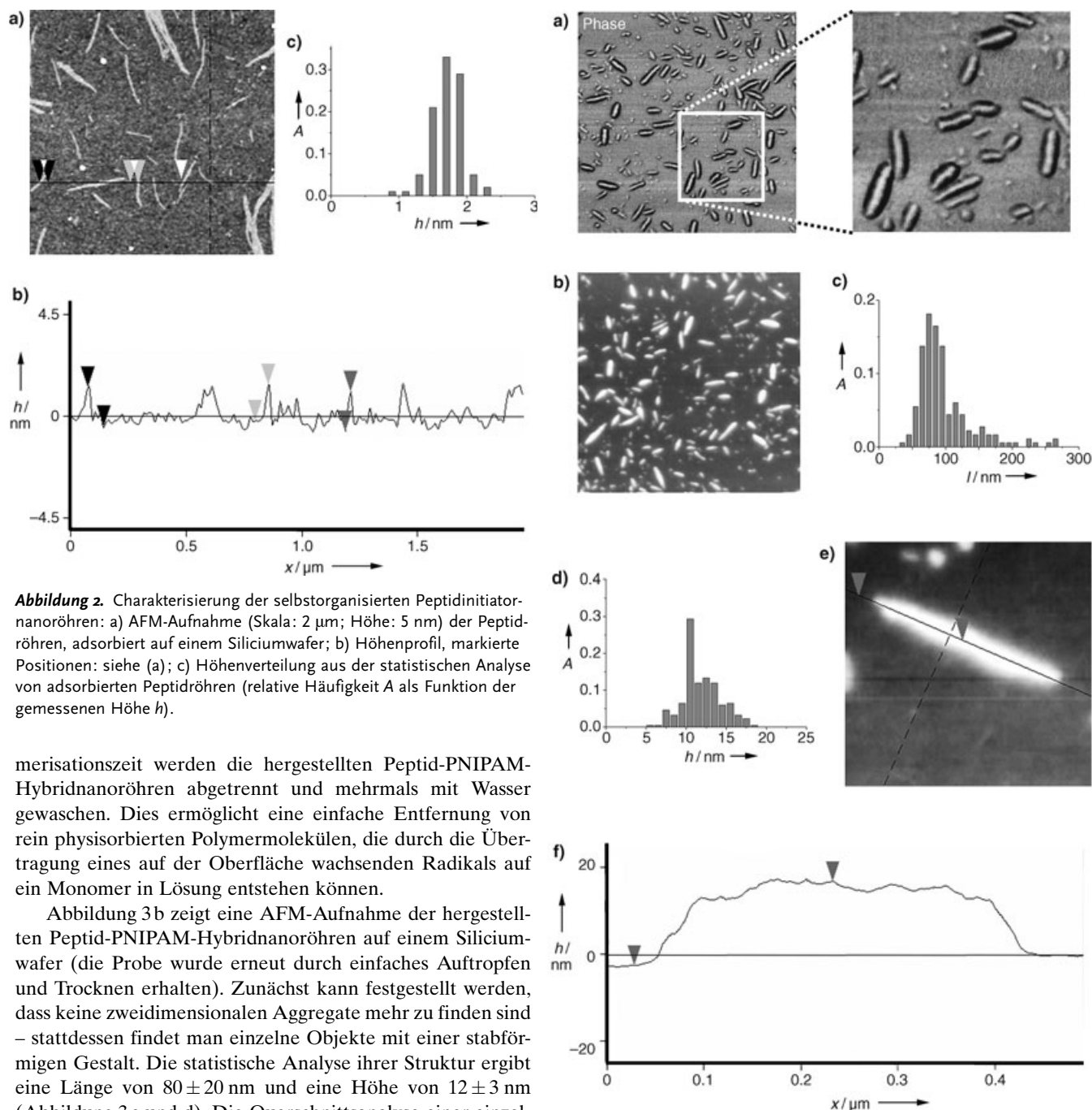


Abbildung 2. Charakterisierung der selbstorganisierten Peptidinitiator-nanoröhren: a) AFM-Aufnahme (Skala: $2\ \mu\text{m}$; Höhe: $5\ \text{nm}$) der Peptid-röhren, adsorbiert auf einem Siliciumwafer; b) Höhenprofil, markierte Positionen: siehe (a); c) Höhenverteilung aus der statistischen Analyse von adsorbierten Peptidröhren (relative Häufigkeit A als Funktion der gemessenen Höhe h).

merisationszeit werden die hergestellten Peptid-PNIPAM-Hybridnanoröhren abgetrennt und mehrmals mit Wasser gewaschen. Dies ermöglicht eine einfache Entfernung von rein physisorbierten Polymermolekülen, die durch die Übertragung eines auf der Oberfläche wachsenden Radikals auf ein Monomer in Lösung entstehen können.

Abbildung 3b zeigt eine AFM-Aufnahme der hergestellten Peptid-PNIPAM-Hybridnanoröhren auf einem Siliciumwafer (die Probe wurde erneut durch einfaches Auftropfen und Trocknen erhalten). Zunächst kann festgestellt werden, dass keine zweidimensionalen Aggregate mehr zu finden sind – stattdessen findet man einzelne Objekte mit einer stabförmigen Gestalt. Die statistische Analyse ihrer Struktur ergibt eine Länge von $80 \pm 20\ \text{nm}$ und eine Höhe von $12 \pm 3\ \text{nm}$ (Abbildung 3c und d). Die Querschnittsanalyse einer einzelnen Röhre zeigt, dass die Polymerhülle das Peptidassemblat in sehr homogener Weise umgibt. Das Vorhandensein des PNIPAM-Polymers kann FTIR-^[22] und NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Eine Analyse der Amidbanden im FTIR-Spektrum zeigt zudem das Vorliegen einer internen β -Faltblattstruktur.^[22] Schließlich zeigt das AFM-Phasenbild (Abbildung 3a) einen schwarzen Schatten, der die stabförmigen Objekte umgibt. Dies ist ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein einer weichen Polymerhülle, die den härteren (Peptid-)Kern umgibt.

Zum Nachweis der kovalenten Anbindung der PNIPAM-Ketten auf den Peptiden wurden Kontrollexperimente durchgeführt: Hierzu wurde freies PNIPAM-Polymer mit Peptid-nanoröhren ohne Initiatorfunktionen auf der Oberfläche

Abbildung 3. Charakterisierung der Peptid-PNIPAM-Nanoröhren: a) AFM-Phasenbild (Skala: $2\ \mu\text{m}$) der Peptid-Polymerröhren, adsorbiert auf einem Siliciumwafer; zusätzlich ist ein Detailausschnitt aus dem Phasenbild gezeigt (Skala: $0.8\ \mu\text{m}$); b) AFM-Aufnahme (Topographie, Skala: $2\ \mu\text{m}$; Höhe: $50\ \text{nm}$); c) relative Häufigkeit A als Funktion der Länge l und d) der Höhe h aus der statistischen Analyse von adsorbierten Peptid-Polymerröhren; e) AFM-Aufnahme (Skala: $0.5\ \mu\text{m}$, Höhe: $25\ \text{nm}$) und f) Querschnittsanalyse (markierte Positionen: siehe (e)) einer einzelnen Peptid-PNIPAM-Nanoröhre.

gemischt (Abbildung 4a zeigt das hierzu verwendete cyclische Peptid). Da das freie Polymer in diesem Fall nur physikalisch auf den Peptidröhren abgeschieden wurde, kann es durch einfache Extraktion mit Wasser sehr leicht

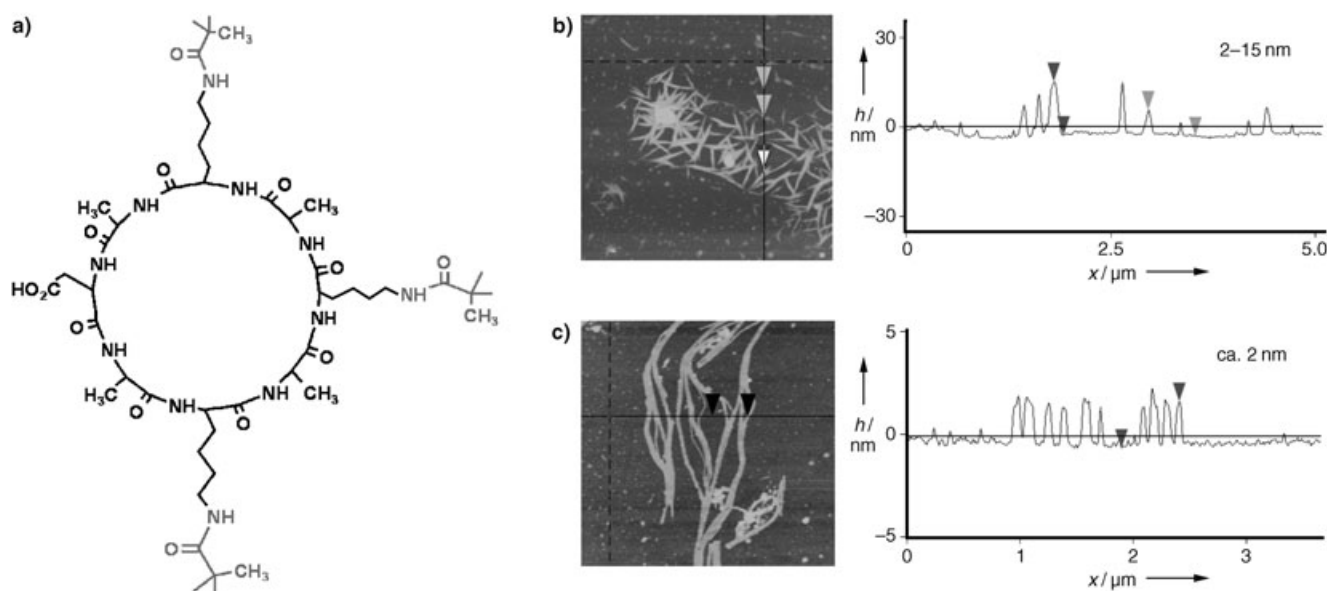


Abbildung 4. a) Schematische Abbildung des cyclischen Peptids (CPB), das zur Durchführung von Referenzexperimenten synthetisiert wurde. Das Peptid lagert sich zu Peptidnanoröhren zusammen, die anschließend mit freiem PNIPAM gemischt, auf einem Siliciumwafer vor und nach einer Extraktion mit Wasser adsorbiert und mittels AFM visualisiert werden: b) AFM-Aufnahme (Skala: 5 μm , Höhe: 35 nm) und Querschnittsanalyse von Polymer-CPB-Nanoröhren auf einem Siliciumwafer vor und c) nach der Extraktion mit Wasser.

und vollständig wieder abgelöst werden, was mit AFM-Untersuchungen vor und nach der Extraktion eindeutig nachgewiesen wurde. Dies ist ein Beleg dafür, dass die oben beschriebenen Peptid-PNIPAM-Nanoröhren aus kovalent verbundenen Peptid-Polymer-Hybridbausteinen bestehen.

Die hier vorgestellte Strategie ermöglicht die Synthese von Peptid-Polymer-Hybridnanoröhren, bei denen die Struktur im Wesentlichen durch das selbstorganisierte Peptid und die Oberflächenchemie durch das synthetische Polymer dominiert wird. Mithilfe der Rasterkraftmikroskopie können wir zeigen, dass die PNIPAM-Ketten den „biologischen“ Kern sehr homogen umgeben und wegen der kovalenten Anbindung an die Peptidnanoröhre auch nicht durch einfache Lösungsmittelextraktion entfernt werden können. Neben den Peptiden ist die interne Struktur der angebundenen Polymerhülle ein entscheidender Parameter, der die Gesamtstruktur der Hybridmaterialien sehr stark beeinflussen kann. Die innere Struktur wird insbesondere durch die Molmasse, die Pfropfdichte und somit durch die Konformation der Ketten beeinflusst. Die Molmasse der angebundenen Ketten sollte sich über die verwendeten Polymerisationsbedingungen (z. B. Monomerkonzentration, Polymerisationszeit) einstellen lassen, die Pfropfdichte über die Verdünnung der Initiatorkonzentration auf der Oberfläche der Peptidnanoröhren; entsprechende systematische Studien werden zurzeit durchgeführt. Abschließend soll noch angemerkt werden, dass sich mit steigender Molmasse und hoher Pfropfdichte auf den Peptidnanoröhren die angebundenen Ketten sehr stark strecken müssen. Diese Streckung kann zu starken repulsiven Kräften zwischen den Makromolekülen auf der Oberfläche führen. Falls diese Kräfte schließlich stärker werden als die Kraft, mit der zwei benachbarte Peptidringe zusammengehalten werden, so würde man ein Auseinanderbrechen der Aggre-

gate erwarten – dies könnte die Möglichkeit bieten, auch die Länge der gezeigten Strukturen einzustellen.

Experimentelles

Die cyclischen Peptide wurden nach Standardvorschriften (Fmoc-Chemie; Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl) an einer festen Phase synthetisiert. Die Cyclisierung des Octapeptids (HOOC-L-Asp(OAll)-[D-Ala-L-Lys(Mtt)]-D-Ala-NH₂) und die Modifizierung der Lysinseitenketten wurden direkt auf der festen Phase durchgeführt (All=Allyl, Mtt=4-Methyltrityl). Die cyclischen Peptide wurden anschließend von der Festphase abgespalten und durch Rekrystallisation aus TFA/Wasser und präparative HPLC (RP-C18; Acetonitril/Wasser-Gradientenelution) gereinigt. Die Charakterisierung erfolgte mit ESI-Massenspektrometrie sowie FTIR- und NMR-Spektroskopie.^[22]

Die Polymerisationen wurden in wässriger Dispersion ähnlich zu einer kürzlich erschienenen Vorschrift von Kizhakkedathu et al. durchgeführt.^[23] In Kürze: Monomer, Lösungsmittel und HMTETA (HMTETA = 1,1,4,7,10,10-Hexamethyltriethylentetramin) wurden gemischt und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen im Vakuum entgast. Anschließend wurde das noch gefrorene Gemisch mit Cu^I, Cu^{II} und Cu⁰ versetzt und langsam aufgetaut. Die assemblierten Peptidinitiatorröhren wurden in wässriger Lösung (entgast) dispergiert und zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Polymerisation wurde bei 20 \pm 0.1 $^{\circ}\text{C}$ unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. Nach 90 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von weiterem Lösungsmittel und Cu^{II} in starkem Überschuss abgebrochen. Das Molverhältnis von Monomer/Initiator betrug 200:1, und der Umsatz betrug zu diesem Zeitpunkt ca. 0.7 (bestimmt durch HPLC). Nach dieser Polymerisationszeit liegen die Peptid-Polymer-Hybridmaterialien noch als dispergierte Phase in dem Reaktionsgemisch vor, wodurch die Aufarbeitung relativ einfach durch wiederholtes Extrahieren mit reinem Wasser und anschließendes Trocknen geschehen kann. Durch die Lösungsmittelextraktion wird gleichzeitig auch eventuell physisorbiertes PNIPAM von den Materialien entfernt.

Für das Referenzexperiment wurde ein weiteres cyclisches Peptid synthetisiert, und aus diesem wurden in analoger Weise Peptidnanoröhren assembliert. Diese Peptidröhren wurden mit freiem PNIPAM in wässriger Dispersion gemischt und die Peptidröhren anschließend durch AFM vor und nach einer Extraktion mit reinem Wasser visualisiert.

Eingegangen am 20. Dezember 2004

Online veröffentlicht am 14. April 2005

Stichwörter: Nanoröhren · Nanotechnologie · Peptide · Polymere · Supramolekulare Chemie

- [1] S. Iijima, *Nature* **1991**, 354, 56–58.
- [2] J. Li, C. Papadopoulos, J. M. Xu, M. Moskovits, *Appl. Phys. Lett.* **1999**, 75, 367–369.
- [3] H. S. P. Wong, *IBM J. Res. Dev.* **2002**, 46, 133–168.
- [4] G. L. Che, B. B. Lakshmi, E. R. Fisher, C. R. Martin, *Nature* **1998**, 393, 346–349.
- [5] C. R. Martin, P. Kohli, *Nat. Rev.* **2002**, 2, 29–37.
- [6] D. T. Bong, T. D. Clark, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1016–1041; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 988–1011.
- [7] J. M. Schnur, *Science* **1993**, 262, 1669–1676.
- [8] K. Yu, A. Eisenberg, *Macromolecules* **1998**, 31, 3509–3518.
- [9] J. Grumelard, A. Taubert, W. Meier, *Chem. Commun.* **2004**, 13, 1462–1463.
- [10] S. Höger, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 1320–1329.
- [11] S. Hecht, A. Khan, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 24–26; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 6021–6024.
- [12] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, *Nature* **1993**, 366, 324–327.
- [13] J. D. Hartgerink, J. R. Granja, R. A. Milligan, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 43–50.
- [14] M. R. Ghadiri, *Adv. Mater.* **1995**, 7, 675–677.
- [15] M. R. Ghadiri, K. Kobayashi, J. R. Granja, R. K. Chadha, D. E. McRee, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 76–78; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 93–95.
- [16] T. Nakanishi, H. Okamoto, Y. Nagai, K. Takeda, I. Obataya, H. Mihara, H. Azehara, Y. Suzuki, W. Mizutani, K. Furukawa, K. Torimitsu, *Phys. Rev. B* **2002**, 66, 165417.
- [17] S. Fernandez-Lopez, H. S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K. M. Wilcoxen, M. R. Ghadiri, *Nature* **2001**, 412, 452–455.
- [18] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature* **1994**, 369, 301–304.
- [19] M. L. Becker, J. Liu, K. L. Wooley, *Chem. Commun.* **2003**, 2, 180–181.
- [20] H. Rettig, E. Krause, H. G. Börner, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, 25, 1251–1256.
- [21] Y. Mei, K. L. Beers, H. C. Michelle Byrd, D. L. van der Hart, N. R. Washburn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3472–3476.
- [22] Siehe Hintergrundinformationen.
- [23] J. N. Kizhakkedathu, R. Norris-Jones, D. E. Brooks, *Macromolecules* **2004**, 37, 734–743.