

Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung

Retrosynthese von Perlmutter

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin Physikalische Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

von Nicole Gehrke

geboren am 13.07.1978

Potsdam, den 27.02.2006

Meiner Mutter

Wer mit dem Strom schwimmt, erreicht die Quelle nie

Peter Tille, dt. Schriftsteller

Danksagung

Der Weg zu dieser Arbeit führte durch viele Höhen und Tiefen. Viele Leute haben dazu beigetragen, daß die Tiefen weniger tief und die Höhen umso höher erschienen. Bei Ihnen möchte ich mich bedanken. Ich habe die Zeit sehr genossen.

Einige Personen möchte ich persönlich nennen:

Prof. Dr. Markus Antonietti, der mir die Gelegenheit gegeben hat, diese Arbeit anzufertigen, danke ich für seine Unterstützung und stetige Zuversicht in das Gelingen und alle Möglichkeiten, die ich in seiner Abteilung bekommen habe.

PD Dr. Helmut Cölfen, der mich an dieses spannende Thema herangeführt hat, gilt mein Dank für die Betreuung meiner Arbeit, während der er bei Problemen immer ein offenes Ohr und Ratschläge hatte, und für alles, was ich bei ihm und in seiner Gruppe gelernt habe und für die Zukunft mitnehmen werde.

Dr. Nadine Nassif für zahlreiche Ideen und Diskussionen, die mir nicht selten eine völlig andere Sicht auf die Dinge eröffnet haben. Ich möchte ihr für ihre wissenschaftliche Hilfe und Unterstützung, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, und für ihre Freundschaft danken.

Ich danke meiner Gruppe für zahllose kleine Hilfen und daß ich immer gerne nach Golm gefahren bin und mich nicht nur in unserer Abteilung, sondern besonders in unserer Gruppe immer sehr wohlfühlt habe.

Dr. Nicola Pinna, für alles, was ich von ihm über TEM gelernt habe.

Rona Pitschke für ihre Geduld und Kreativität bei der Präparation meiner EM-Proben.

Dr. habil. Klaus Tauer für die Diskussion und Ideen zur Modifizierung der Matrix.

Ursula Lubahn für die Ausführung der Modifizierungsexperimente.

Heidi Zastrow für die Zetapotential-Messungen und die hilfreichen Diskussionen zur Interpretation der Ergebnisse.

Annemarie Martins für spontane Probenpräparationen.

Denis Gebauer für hilfreiche Tips und Korrekturen des Manuskripts.

Dr. Himadri Gupta für interessante Diskussionen und die Nanoindentierungsexperimente. Außerdem gibt es noch viele weitere Personen, denen mein Dank für ihre Hilfe gilt. Zu ihnen gehören: Steffen Kozempel, Dr. Andreas Fery, Anne Heilig, Dr. Ingo Burgert, Dr. Jürgen Hartmann, Katharina, Gabi, Antje Völkel, Dr. Reinhardt Sigl, Birgit, Ingrid Zencke, Margit Barth, Cliff Janiszewski und die mechanische Werkstatt.

Neben der Arbeit habe ich viele Personen kennengelernt, die dafür gesorgt haben, daß mir meine Zeit am MPI immer in guter Erinnerung bleiben wird:

Saroj, Nadine, Ozlem und Samira,

und natürlich die gesamte „Kaffegruppe“, mit der die Mittagspausen immer mit gutem Espresso und viel Spaß verbunden waren und einige Wochenenden mit wenig Schlaf.

Besonders möchte ich Christoph danken, der mich immer unterstützt und ermutigt hat, wenn es nötig war, und meiner Familie, ohne die ich nicht hier angekommen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Klassische Kristallisationstheorie	3
2.2	Biomineralisation	6
2.2.1	Amorphe Phasen in der Biomineralisation	8
2.2.2	Transformation auf der Mesoskala	10
2.2.3	Oriented Attachment	13
2.2.4	Mesokristalle	13
2.3	Perlmutter	15
2.3.1	Modelle der Bildung von Perlmutter	18
3	Wichtige Methoden zur Charakterisierung	25
3.1	Röntgenstreuung	25
3.2	Lichtmikroskopie	26
3.3	(Hochauflösungs-) Transmissionselektronenmikroskopie	27
3.4	Elektronenbeugung	27
3.5	Rasterelektronenmikroskopie	28
3.6	ζ -Potential	29
4	Experimenteller Teil	30
4.1	Kristallisationmethoden	30
4.2	Demineralisierung und Deproteinierung	32

4.3	Remineralisierung	33
5	Ergebnisse und Diskussion	34
5.1	Kristallisationsmethoden	34
5.1.1	Gasdiffusionsmethode	34
5.1.2	Kitanomethode	44
5.1.3	Double Jet-Methode mit Durchflußzelle	44
5.2	Auswahl des Biominerals	45
5.3	Synthese von Aragonit	47
5.4	Perlmutter und Perlmuttermatrix	53
5.4.1	Perlmutter	53
5.4.2	Perlmuttermatrix	58
5.4.3	Lagerung der Matrix	60
5.4.4	Deproteinierung der Matrix	60
5.4.5	ζ -Potential der Matrix	63
5.5	Retrosynthese von Perlmutter	65
5.5.1	Optimierung der Precursor	67
5.5.2	Optimierung der Remineralisation	71
5.5.3	Remineralisierung der Matrix	72
5.5.4	Deproteinierter Matrix	90
6	Abschließende Diskussion	92
7	Zusammenfassung	94
A	Anhang	97
A.1	Modifizierung der Matrix	97
A.2	Kontrollexperimente der Retrosynthese	100
A.3	Probenpräparation für die TEM-Untersuchungen	101
A.4	Abkürzungsverzeichnis	101

Kapitel 1

Einleitung

Die Biomineralisation ist ein gleichermaßen faszinierendes wie bedeutsames Gebiet. So erfreuen sich viele Menschen an der Schönheit von Biomineralien wie Perlmutter oder der filigranen Struktur von Diatomen. Biomineralisationsprozesse spielen bei Menschen unter anderem in Knochen und Zähnen und bei Krankheiten wie Osteoporose eine wichtige Rolle. Darüberhinaus ist die Biomineralisation von überaus großer Bedeutung für zukunftssträchtige Technologien: Biomineralien werden bei Umgebungsbedingungen unter der Kontrolle eines Organismus gebildet. Sie bieten ein perfektes Beispiel für die Selbstanordnung hierarchisch strukturierter Komposite mit herausragenden Materialeigenschaften. Sie sind Beispiele für Biokompatibilität und Recyclefähigkeit von Materialien und die kristallographische Kontrolle von Partikelgröße, Gestalt und Polymorph, so daß der Ausdruck „chemische Medusa“ geprägt wurde. Aus diesen Gründen ist ein Verständnis von Biomineralisationsvorgängen wichtig für Medizin, Materialwissenschaften, Nanotechnologie, Kristallisationstheorie, physikalische Chemie und Biophysik. Die Biomineralisation bietet einen multidisziplinären Ansatz, von der Natur zu lernen.

Dennoch ist das wissenschaftliche Verständnis der Prozesse der Biomineralisation noch sehr gering und hindert die Weiterentwicklung auf vielen Gebieten. Eines der größten Probleme war dabei neben der Komplexität der Biomineralisationsprozesse an sich die Kommunikation zwischen den verschiedenen Fachgebieten. Diese Kommunikation findet inzwischen zunehmend statt, und der Fortschritt der Charakterisierungsmethoden wie beispielweise der Elektronenmikroskopie oder der Proteinanalytik bietet verbesserte Möglichkeiten. Dies führt zu einem stetigen Anstieg des Wissens und wird in naher Zu-

kunft zahlreiche neue Erkenntnisse bergen.

Bisher wurde dabei oftmals von der Dominanz spezifischer biomolekularer Erkennungsprozesse ausgegangen, doch weisen neue Studien auf die Bedeutung physikalisch-chemischer, „allgemein“ gültiger Mechanismen in der Biomineralisation hin.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu liefern, diese Bedeutung aufzuzeigen und die Prozesse der Biomineralbildung aufzuklären. Im Speziellen wird hierbei die Möglichkeit des Biomineralwachstums über amorphe Precursorpartikel und deren Transformation auf der Mesoskala untersucht. Dazu wird ein neuer Ansatz entwickelt, die Retrosynthese von Biomineralien: Die „Re“-Mineralisierung der unlöslichen organischen Matrix von Biomineralien wird am Beispiel von Perlmutter als ein Modellsystem zur Untersuchung des Wachstums von Biomineralien verwendet.

Im Laufe dieser Arbeit werden zunächst einige potentielle Kristallisationsmethoden, die zur Mineralisierung der Perlmutter-Matrix verwendet werden können, beleuchtet und verschiedene Biomineralien auf ihre Eignung für die Retrosynthese untersucht. Es werden darüberhinaus bio-inspirierte Systeme untersucht, um Kristallisationsmechanismen an vereinfachten Systemen zu beleuchten. Im Anschluß wird sowohl das Biomineral als Ganzes als auch seine Matrix charakterisiert. Daraufhin werden die Precursor so optimiert, daß eine Mineralisierung der Matrix durch die Precursor möglich wird. Schließlich wird der Remineralisierungsprozeß ausführlich untersucht und ein Mechanismus der Perlmutterbildung vorgeschlagen.

Das hier verwendete Modellsystem wurde aus verschiedenen Gründen ausgewählt: Es hat den Vorteil, daß die Matrix ein dreidimensionales Gerüst für die Mineralphase bietet und somit bereits sowohl die mikro- als auch die makroskopische Geometrie der zu synthetisierenden Hybridstruktur aus Matrix und Mineral vorgibt. Zudem wird die Mineralphase in Form amorpher Precursor geliefert, die im Gegensatz zu Ionen den Transport großer Mineralmengen ohne die Einschränkung von Ionenstärke, pH-Wert oder osmotischem Druck erlauben und überdies bereits in vielen Kristallisationsprozessen als Intermediate beobachtet wurden. Es erscheint also durchaus wahrscheinlich, daß sie auch in Biomineralbildungsprozessen eine Rolle spielen. Das Modellsystem besteht bis auf die unlösliche Matrix aus rein synthetischen Komponenten und ist daher geeignet, zu prüfen, ob spezifische Biomolekülwechselwirkungen nötig sind, um das Biomineralwachstum zu imitieren.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Klassische Kristallisationstheorie

Die klassische Kristallisationstheorie¹ erklärt die homogene und heterogene Nukleation und das Wachstum von Kristallen. Dabei werden einige Annahmen getroffen, wie beispielsweise die Reinheit der betrachteten Systeme. Weitere Annahmen werden im folgenden erläutert.

Wird in einem reinen System bei gegebener Temperatur und Druck die Löslichkeit der gelösten Komponente überschritten, so ist deren thermodynamische Stabilität in der kristallinen Phase größer als in Lösung, und sie sollte demgemäß spontan kristallisieren. Meist jedoch setzt die Kristallisation, sofern kein „Impfkeim“ zugegeben wird, erst bei höherer Übersättigung der Lösung durch Bildung von Keimen und deren Wachstum ein. Dieser metastabile Bereich, in dem die spontane Kristallisation gehemmt ist, wird „Ostwald-Miers-Bereich“ genannt und wird durch folgende Betrachtungen plausibel: Erst wenn ein Keim nach der Bildung auch weiter wächst, setzt die Kristallbildung in der Lösung ein. Nach den Gesetzen der Thermodynamik ist dies dann der Fall, wenn die freie Enthalpie G des Systems durch die Kristallisation abnimmt. Dies wird von mehreren Faktoren bestimmt: In übersättigter Lösung geht die gelöste Komponente durch die Kristallisation in einen Zustand niedrigerer freier Enthalpie über, wodurch ein proportional zur Stoffmenge bzw. zum Volumen negativer Beitrag ΔG_V (die freiwerdende freie Gitterenergie) geliefert wird. Da jedoch mit der Keimbildung eine Grenzfläche gebildet wird, wird durch

die damit verbundene Grenzflächenenergie ein positiver Beitrag

$$\Delta G_\sigma = \sigma A \quad (2.1)$$

mit der Grenzflächenspannung σ geliefert, der proportional zur Oberfläche A des Keimes ist. Zusätzlich können elastische Kräfte durch die umgebende Phase auf den entstehenden Keim wirken, wodurch ebenfalls ein positiver Beitrag ΔG_e geliefert wird. Dieser kann jedoch in gasförmigen oder flüssigen Phasen vernachlässigt werden. Um nun die gesamte Änderung der freien Enthalpie bei der Bildung von Keimen ΔG_K zu bestimmen, werden diese vereinfacht als kugelförmig angenommen, das heißt ihr Radius ist r_K , ihr Volumen $\frac{4}{3}\pi r_K^3$ und ihre Oberfläche $4\pi r_K^2$. Die Änderung der freien Enthalpie bei der Keimbildung kann damit zu

$$\Delta G_K = \Delta G_V + \Delta G_\sigma = \frac{4}{3}\pi r_K^3 \Delta g/v + 4\pi r_K^2 \sigma \quad (2.2)$$

berechnet werden, wobei Δg die Differenz der freien molaren Enthalpie der beiden Phasen, v das Molvolumen der kristallinen Phase und σ die spezifische freie Grenzflächenenergie ist, welche bei Einstoffsystemen der Oberflächenspannung entspricht und als konstant und isotrop betrachtet wird. Abbildung 2.1 zeigt die Abhängigkeit von ΔG_K in Abhängigkeit vom Keimradius r_K bei einer gegebenen Konzentration. Da kleine Keime (kleine r_K) eine

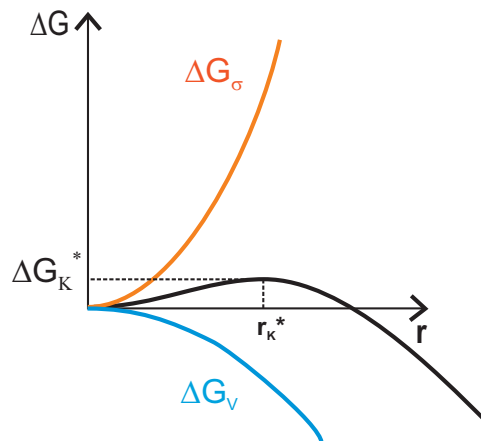


Abbildung 2.1: Die homogene Nukleation wird von der Oberflächenenergie ΔG_σ und der gewonnenen Gitterenergie ΔG_V des gebildeten Keimes bestimmt. Ab einer bestimmten „kritischen“ Größe des Keimes mit dem kritischen Keimradius r_K^* am Maximum der Funktion ist dessen weiteres Wachstum mit einer Abnahme der freien Enthalpie des Systems verbunden und somit thermodynamisch begünstigt.

relativ zum Volumen große Oberfläche haben, überwiegt bei kleinen Werten von r_K der Oberflächenterm, so daß ΔG_K positiv ist und somit eine Keimbildung thermodynamisch nicht begünstigt ist, so daß der Keim sich wieder auflöst. Ab einer bestimmten Größe jedoch ist die Oberfläche relativ zum Volumen des Keimes klein genug, so daß ΔG_K vom Übergang von der gelösten in die kristalline Phase bestimmt wird, somit also negativ ist und das weitere Wachstum des Keimes thermodynamisch begünstigt ist. Die Funktion durchläuft also ein Maximum. Der Radius des Keimes im Maximum der Kurve ist der sogenannte „kritische Keimradius“ r_K^* . Die weitere Zunahme des Radius liefert nun einen negativen Beitrag zur freien Enthalpie. Das bedeutet, in übersättigter Lösung können nur diejenigen Keime wachsen, die diesen Radius erreichen. Kleinere lösen sich wieder auf, so daß Keimbildung alleine nicht zwangsläufig zur Kristallbildung führt. Die Größe des kritischen Keimes und der freien Enthalpie der Keimbildung läßt sich durch die Bestimmung der Maxima der Funktion errechnen:

$$\Delta G_K^* = \frac{4}{3}\pi(r_K^*)^2\sigma \quad (2.3)$$

und

$$(r_K^*)^2 = -2\sigma\nu/\Delta g \quad (2.4)$$

Die Größe von r_K^* hängt von der Übersättigung ab: je größer diese ist, desto kleiner ist der kritische Keim und die freie Energie der Nukleation.

Im Gegensatz zur eben beschriebenen homogenen Nukleation hat die heterogene Nukleation eine große Bedeutung: die Keime werden beispielsweise an Gefäßwänden oder Fremdpartikeln wie Staub etc. abgeschieden, welche nahezu immer anwesend sind. Ein Spezialfall ist die sogenannte Epitaxie, in der die Struktur der Substanz, an der nukleiert wird, die Kristallstruktur des Keimes (beispielsweise bei der Einkristallzüchtung, in der im Ostwald-Miers-Bereich ein „Impfkeim“ hinzugegeben wird) bestimmt. Es entsteht zunächst eine Adsorptionsschicht aus der übersättigten Phase (manchmal sogar aus noch untersättigter Phase) an dem Substrat, dann bildet sich in dieser durch Diffusion und Fluktuationen ein kritischer Keim, der weiter wächst. Dies ist möglich, da die spezifische Grenzflächenenergie des Keimes zur Unterlage kleiner ist als zur Lösung und damit seine Oberflächenenergie relativ zur homogenen Nukleation herabgesetzt wird, wodurch sich auch r_K^* und ΔG_K^* verringern. Es hat sich empirisch herausgestellt, daß im Falle

verschiedener fester Modifikationen der übersättigten Phase oft als erstes nicht die unter den gegebenen Bedingungen thermodynamisch stabilste, sondern eine instabile Phase entsteht, die dann sukzessive in die nächst stabileren Phasen umgewandelt wird, bis schließlich zur stabilsten Phase. Dieses nach Ostwald benannte empirische Gesetz ist damit zu erklären, daß in der Regel zuerst die Phase mit der größten Keimbildungsgeschwindigkeit gebildet wird, die meist nicht die stabilste Phase ist.

Das Wachstum eines Kristalls wird von dem ihn umgebenden Medium beeinflusst² und hängt von der freien Enthalpie seiner Kristallflächen ab, welche dem Produkt der Oberflächenspannung der entstandenen Grenzfläche und deren Oberfläche entspricht. Demnach ist viel Energie nötig, um Flächen mit hoher Oberflächenenergie in der Kristallmorphologie zu exponieren. Da nach Gleichung 2.1 die Oberfläche umso größer ist, je langsamer eine Kristallfläche relativ zu den anderen wächst,² werden Kristallflächen mit hoher Oberflächenspannung schneller wachsen, um ihre Oberfläche zu minimieren.² Für die gesamte freie Enthalpie aller Kristallflächen eines Kristalls folgt also:

$$\sum \Delta G_n = \sum_i^n \sigma_i A_i \quad (2.5)$$

Dieser Ausdruck erreicht sein Minimum, wenn der Kristall seine Gleichgewichtsmorphologie annimmt. Da die Oberflächenenergien zwar aus Kraftfeldrechnungen für das Vakuum gut bestimmt werden können, jedoch eine Berücksichtigung des Lösemittels kaum möglich ist, ist es sehr schwer, die Gleichgewichtsmorphologie eines Kristalls vorherzusagen, zudem das Lösemittel normalerweise nicht absolut rein ist. Zusätzlich ist es möglich, durch die Zugabe von Additiven, welche durch elektrostatische oder strukturelle Wechselwirkungen an bestimmte Kristallflächen adsorbieren können, deren Oberflächenenergien zu ändern. Damit verbunden ist eine Modifizierung der Kristallmorphologie, die nur noch in Ausnahmefällen vorhergesagt werden kann.³ So können sich beispielsweise α,ω -Dicarbonsäuren an bestimmte Calcitflächen anlagern und so die Morphologie des Calcitkristalls beeinflussen.⁴

2.2 Biomineralisation

Biomineralisation ist der Prozeß, mit dem Organismen Biomineralien bilden. Diese haben die verschiedensten Funktionen, beispielsweise als Skelett (Knochen und Schalen), Kau-

werkzeug (Zähne), zur Orientierung (Magnetotaktische Bakterien) oder als Ionenspeicher. Sie faszinieren nicht nur Wissenschaftler; durch ihre Schönheit und die Komplexität ihrer Formen und haben sie Künstler und Architekten inspiriert.⁵ Biomineralien sind herausragende Beispiele für die Fähigkeit von Lebewesen, sich optimal an die Umwelt anzupassen. So werden sie unter Umgebungsbedingungen gebildet und bestehen oftmals zu einem Großteil aus vermeintlich „einfachen“ und im Überschuß vorhandenen Komponenten wie Calciumcarbonat.

Sie unterscheiden sich in vielen Punkten von „normalen“ anorganischen Mineralien, obwohl sie bis zu 99 oder mehr Prozent aus anorganischem Material bestehen. Ihre Bildung ist ein kontrollierter Prozeß und führt zu anorganisch-organischen, oft über mehrere Größenordnungen hierarchisch strukturierten Hybridmaterialien mit außergewöhnlichen Materialeigenschaften,⁶ wie extremer Bruchfestigkeit (z.B. Schalen), Härte und Elastizität (z.B. Knochen). Sie haben komplexe Formen, kristallisieren oder lösen sich nicht unkontrolliert auf und können aus Kristallmodifikationen bestehen, die unter den gegebenen Umgebungsbedingungen als solche thermodynamisch meta- oder gar instabil sind. Zudem weisen sie zum Teil einen Selbstheilungsmechanismus auf (z. B. gebrochene Knochen), und ihre Bildung ist völlig reproduzierbar.

Daher liegt es auf der Hand, daß die Biomineralisation ein sehr interdisziplinäres Gebiet ist: So sind Biologie, Medizin, Chemie, Materialwissenschaften, Physik und Mineralogie nur einige Bereiche, die sich mit ihr befassen, um Bildung und Funktionsweise von Biomineralien zu verstehen, in einen evolutionsgeschichtlichen Zusammenhang zu bringen⁷ und natürlich sie zu kopieren. Die Interessen reichen dabei von der Herstellung neuer Materialien mit herausragenden Eigenschaften unter Umgebungsbedingungen bis zur Heilung von Krankheiten wie Osteoporose⁸ oder der Regeneration kranker Zähne.

Trotz intensiver Forschung sind jedoch die Mechanismen der Biomineralisation noch weitgehend unbekannt und ihre Aufklärung seit einiger Zeit in den Mittelpunkt vieler Forschungsgruppen gerückt.

Biomineralien sind, wie oben genannt, Kompositmaterialien aus anorganischen Mineral- und organischen Bestandteilen. Die Mengenverhältnisse können stark variieren, z.B. beträgt der organische Anteil in Molluskenschalen 1-5 wt%, in Knochen 60-70 wt% (Trockengewicht). Die Gesamtheit aller organischen Bestandteile eines Biominerals wird orga-

nische Matrix genannt. Diese wird weiter unterteilt in die lösliche und unlösliche organische Matrix, in Abhängigkeit davon, ob sie sich in dem jeweiligem Medium, mit dem die mineralische Komponente entfernt wird (häufig eine schwache Säure) löst oder nicht. Unlösliche Komponenten sind beispielsweise Collagen oder Chitin, lösliche verschiedene Makromoleküle. Die Einteilung in löslich und unlöslich ist unter Umständen etwas willkürlich oder problematisch,^{9,10} da sie *in vivo* nicht zwangsläufig dieselbe sein muß: so ist es beispielsweise denkbar, daß bestimmte Proteine zwar in der Säure löslich sind, aber möglicherweise in dem Medium, in dem der Biomineralisationsprozeß statt findet, in ungelöster Form vorliegen.

Trotz vieler Studien, die sich direkt oder indirekt mit der organischen Matrix oder ihren Bestandteilen befassen ist es weitgehend unbekannt, wie genau die organische Matrix den Mineralisationsprozeß steuert. Selbst die genaue Zusammensetzung der organischen Matrix, vor allem aber ihre *in vivo*-Struktur ist für die allermeisten Biomineralien nicht bekannt. Tendenziell wird beim Biomineralisationsprozeß der löslichen organischen Matrix eher die steuernde Rolle, der unlöslichen die gerüstgebende zugeschrieben.¹¹ Im folgenden wird der Begriff „Matrix“ vereinfacht für „unlösliche organische Matrix“ verwendet, soweit nicht anders genannt.

2.2.1 Amorphe Phasen in der Biomineralisation

Amorphe Phasen sind bei Umgebungsbedingungen oft thermodynamisch und kinetisch instabil¹² und haben im Gegensatz zu kristallinen Phasen eine ungerichtete Struktur. Sie streuen keine Röntgenstrahlen und Elektronen, so daß es oftmals schwer ist, sie in Gegenwart kristalliner Phasen zu identifizieren. Sie können jedoch eine Nahordnung auf der atomaren Skala aufweisen.^{13,14} Auch der Wassergehalt kann variieren. Sie sind thermodynamisch instabil und haben im Vergleich zu kristallinen Phasen ein größeres Löslichkeitsprodukt und eine geringere Dichte.

In Biomineralien sind amorphe Phasen nicht ungewöhnlich. Sie sind entweder stabil und dauerhafter Bestandteil⁶ oder transient und werden in kristallines Material umgewandelt. Als Beispiel für ersteres seien Diatomeen genannt, deren Gerüst aus amorphem Silica besteht und verschiedenste Formen und filigrane Strukturen aufweist und so eine

erstaunliche Stabilität erhält. Der Seeigel *P. pachydermatina* hat zwei Sorten Skelettnadeln, von denen eine aus kristallinem Calcit, die andere aus Calcit und amorphem Calciumcarbonat (ACC) nebeneinander besteht.¹⁵ Ein Vorteil von amorphen Biomineralien gegenüber kristallinen ist ihre höhere Bruchfestigkeit, da sie isotrop sind und keine bevorzugten Spaltflächen haben. Allerdings sind sie leichter löslich als kristallines Material. Transiente amorphe Phasen findet man in Biomineralien als temporäre „Lagerform“, beispielsweise in Vesikeln, um das Mineral schnell verfügbar zu machen. Dort weisen sie eine zwischenzeitliche Stabilität auf.¹³ Instabile transiente amorphe Phasen werden als Vorläuferphasen für kristalline verwendet. So konnte gezeigt werden, daß einige Mollusken amorphes Calciumcarbonat (ACC) als Vorläufer (Precursor) zum Aufbau ihrer Schale im Larvenstadium verwenden, welche in kristallines Aragonit umgewandelt werden,¹⁶ und daß die Regenerierung von beschädigten Seeigelstacheln mittels ACC erfolgt.¹⁷ Da es sich hierbei oft nur um kleine Mengen handelt, die zudem nicht stabil sind, ist es äußerst schwierig, diese Vorläufer vor allem in Gegenwart kristalliner Phasen nachzuweisen, so daß sie lange Zeit unentdeckt blieben. Es ist anzunehmen, daß die Zahl ihrer Beispiele weiterhin steigen wird. Zur Zeit ist bereits das Auffinden von biogenem, transientem ACC so aufwendig, daß es alleiniger Inhalt von Veröffentlichungen in führenden Zeitschriften ist.¹⁷ So ist biogenes ACC an sich erst Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt worden. Für alle bisher bekannten Beispiele gilt, daß stabiles ACC Wasser enthält, transientes jedoch wasserfrei ist. Unter anderem aufgrund des Wassergehaltes kann ACC verschiedene Nahordnungen haben, so daß es mehrere, strukturell unterschiedliche Formen von ACC gibt.¹³ Der Mechanismus seiner (zeitweisen) Stabilisierung ist noch nicht aufgeklärt, scheint jedoch über bestimmte Makromoleküle^{15,18} und Ionen¹³ zu erfolgen. Durch diese Entdeckungen wurden die gängigen Modelle der Biomineralisation nachhaltig beeinflusst.¹⁹ Früher wurde die Bildung von Biomineralien als ionisches Wachstum interpretiert,²⁰ was jedoch nicht alle Punkte zufriedenstellend erklären konnte. Selbst bei der Annahme, daß im Organismus wesentlich höhere Ionenkonzentrationen als dem Löslichkeitsprodukt entsprechende stabilisiert werden können, wären sehr große Volumina an Lösung nötig, um die nötige Materialmenge zum Mineralwachstum zur Verfügung zu stellen. Dies ist in Hinsicht auf die Diffusion schwer denkbar, da diese Volumina zum Mineralisationsort an- und abtransportiert werden müßten.²¹ Amorphe Precursor jedoch

bieten eine andere Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, nämlich mittels sogenannter Mesoskalentransformation von Precursorpartikeln (s. Kapitel 2.2.2) am Ort der Mineralisation, so daß kein Ionenwachstum nötig ist. Im Gegensatz zu Ionen können mit (amorphen) Precursoren große Mengen an Material nahezu unabhängig vom osmotischen Druck und biologischen „Einschränkungen“ wie dem pH-Wert transportiert werden. So erscheint dieser Weg aus Sicht der Evolution sinnvoll, um größere Mengen an Mineral, wie es in Biomineralien von Nöten ist, herzustellen.

Eine sehr interessante Rolle als ACC-Precursor könnten dabei sogenannte „PILP’s“ (Polymer Induced Liquid Precursors) spielen. Sie sind für organische Substanzen bereits gut bekannt und wurden auch für $CaCO_3$ bei Zugabe von Polyacryl (pAA)- oder Polyasparaginsäure (pAsp) beschrieben.^{22,23} Durch das Polymer induziert wird das ACC als eine tröpfchenförmig verteilte, flüssige Phase gebildet, was zu einer Mikrophasenseparation des Systems führt. Es wurde sogar über eine flüssig/flüssig Phasenseparation von $CaCO_3$ in Lösung ohne Additive berichtet.²⁴ Die durch pAA oder pAsp induzierten PILP-Tropfen sedimentieren, koaleszieren und kristallisieren, wodurch kristalline $CaCO_3$ -Filme entstehen. Es können überdies komplexe Formen gebildet werden, die durch das „Fließen“ und Kristallisieren einer flüssigen Vorläuferphase erklärt werden können.²² In einer Durchflußzelle konnten durch die Generierung von PILP’s perlmuttartige $CaCO_3$ -Dünnschichten hergestellt werden.²⁵ Eine flüssige ACC-Phase bietet weiterhin den Vorteil, daß sie potentiell jede Form annehmen und somit den durch beispielsweise eine Matrix gegebenen Raum ausfüllen kann, wodurch die Bildung komplexer Kristallmorphologien ohne den dirigierenden Einfluß von Proteinen möglich wird.^{23,26} Es ist beispielsweise gelungen, mit der PILP-Phase Collagenfasern zu mineralisieren.²⁷ Die PILP’s bieten somit eine plausible Erklärung für die Bildung der komplexen Morphologien, die in vielen Biomineralien gefunden werden.

2.2.2 Transformation auf der Mesoskala

Durch die Verwendung von amorphen Precursoren können große Materialmengen in relativ kleinen Volumina gespeichert und schnell bereitgestellt werden. Es wird ein effizienter Massentransport möglich, der, wie oben erwähnt, nicht (oder kaum) von Löslichkeitspro-

dukten und osmotischen Drücken abhängt.^{19,28} Das Biomineralwachstum erfolgt hierbei nicht durch die Anlagerung von Ionen sondern von einigen Nanometer großen, amorphen Partikeln (Precusorn) und deren Kristallisation: Ein Kristall mit einer Größe von einigen hundert Nanometern bis in den Mikrometer-Bereich wird so durch eine sogenannte Transformation auf der Mesoskala.¹⁹ gebildet. Da die amorphe Phase ungeordnet ist, weist sie keine bevorzugte Wachstumsrichtung auf und kann jede beliebige Form annehmen, was die Bildung komplexer, aber dennoch einkristalliner Morphologien in Biomineralien erklären kann.²⁹ Natürlich ist es auch denkbar, daß die Transformation nicht in einem Übergang von amorph zu kristallin, sondern von einer kristallinen Phase in eine andere besteht.

In einem Übersichtsartikel¹⁹ schlagen Cölfen und Mann vor, daß in den Modellen der matrixvermittelten Keimbildung bei der Biomineralisation, die das Biomineralwachstum unter dem Einfluß der sowohl löslichen als auch unlöslichen Matrix erklären, ähnliche Prozesse wie bei der beobachteten Transformation auf der Mesoskala *in vitro* auch *in vivo* eine Rolle spielen und berücksichtigt werden müssen. So wurden bis dahin molekulare Wechselwirkungen, wie die Epitaxie (s. Kapitel 2.1 und 2.3.1) zwischen der Matrix und der zu nukleierenden Mineralphase, an der Matrix-Mineral-Grenzfläche als treibende Kraft angesehen, die zur Bildung einer orientierten Kristallphase führen (s. Abb. 2.2 a). Diese kann jedoch auch durch die Bindung von direkt oder *via* amorphe Precursor in der Lösung gebildeten kristallinen Nuklei an die Matrix gebildet werden (s. Abb. 2.2 b). In diesem Fall sind kollektive Wechselwirkungen, die Kristalloberflächen der Nuklei und

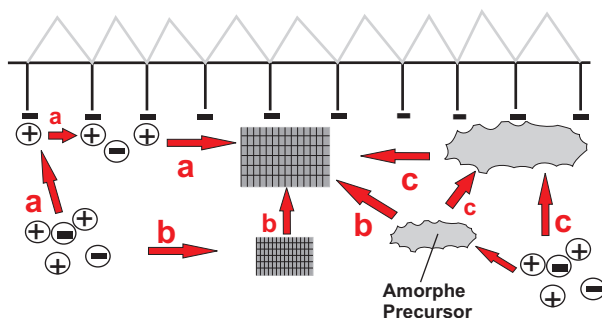


Abbildung 2.2: Klassisches und erweitertes Modell der orientierten Kristallisation an der organischen Matrix in der Biomineralisation. Es sind verschiedene Routen denkbar (a-c, s. Text).

geladene Gruppen auf der Matrix beeinhalten, ausschlaggebend für die Orientierung der

Mineralphase. Cölfen und Mann schlagen alternativ einen erweiterten Mechanismus vor, bei dem amorphe Precursor direkt an die Matrix gebunden werden und über gekoppelte Mesoskalentransformation gerichtet kristallisieren (s. Abb. 2.2 c). Es sind also sowohl molekulare als auch kooperative Wechselwirkungen wie die Phasentransformation auf mesoskopischer Skala denkbar, die zur orientierten Kristallisation führen.

In einem erweiterten Modell schlagen sie weiterhin vor, daß die Anfangswachstumsstadien von Biomineralien innerhalb einer Grenzflächenschicht beispielsweise eines dünnen Films von Makromolekülen stattfinden, die an einigen Stellen mit der unlöslichen Komponente der Matrix verbunden sind und die Transformation der Precursor (bzw. der Hybridstrukturen aus Precursor und stabilisierenden Makromolekülen) auslösen. Dieses Modell ist leicht modifiziert schematisch in Abbildung 2.3 dargestellt. Bei der Matrix kann es sich im weiteren Sinne beispielsweise auch um eine Vesikeldoppelschicht handeln. Es ist natürlich

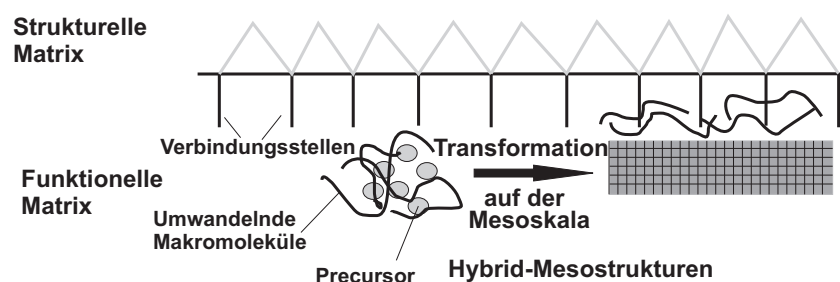


Abbildung 2.3: Modifizierte Darstellung des neuen Modells der matrixvermittelten Transformation auf der Mesoskala nach Mann und Cölfen. Die Precursor werden in der Grenzfläche zur strukturellen Matrix durch Makromoleküle in das Biomineral überführt, jedoch nicht mehr über molekulare Erkennung, sondern über Wechselwirkungen auf mehreren Skalen.

ohne eingehende Untersuchung des jeweiligen Systems nicht möglich, genau zu differenzieren, ob und inwieweit die unlösliche Matrix nicht auch den Transformationsprozeß selbst beeinflusst und die an sie gebundenen Makromoleküle möglicherweise nur zur temporären Stabilisierung der Precursor wirksam sind oder um diese in Kontakt mit der unlöslichen Matrix zu bringen, genauso wie es schwierig ist, eine generelle Einteilung in unlösliche und lösliche Matrix vorzunehmen (vgl. Kapitel 2.2), doch ist das für die Kernaussage des neuen Modells nicht von Bedeutung. Wichtig ist, daß nicht mehr die „molekulare Erkennung“ (wie beispielsweise im Epitaxiemodell, s. Kapitel 2.3.1), als die prinzipielle Triebkraft angesehen wird, sondern Wechselwirkungen auf mehreren Skalen, die eine präferentielle

Orientierung in Bezug auf die strukturelle Matrix als eine emergente Systemeigenschaft auslösen“.¹⁹ Es sind also bei der Biomineralbildung viele verschiedene Wechselwirkungen oder Kräfte auf verschiedenen hierarchischen Leveln vom atomaren bis zum makroskopischen Maßstab wirksam, wobei diese auch miteinander gekoppelt sein bzw. einander bedingen können. Somit spielen physikalisch-chemische Parameter eine größere Rolle als bisher angenommen.

2.2.3 Oriented Attachment

Ein weitere Möglichkeit der Bildung komplexer einkristalliner Morphologien ist die orientierte Aggregation oder Anlagerung von kristallinen Untereinheiten, das sogenannte „oriented attachment“.^{30–33} Hierbei lagern sich einkristalline Partikel so zusammen, daß sie die gleiche kristallographische Orientierung haben, und fusionieren, so daß sie einen größeren Einkristall bilden. Dies kann in einer, zwei oder drei Raumrichtungen geschehen, wodurch sehr komplexe Strukturen aufgebaut werden können.

2.2.4 Mesokristalle

Ein weiterer Aspekt der Transformation auf der Mesoskala sind die sogenannten Mesokristalle. Es handelt sich hierbei per Definition um Kristalle kolloidalen Maßstabs, die aus Baueinheiten im nm-Maßstab bestehen. Für einen Übersichtsartikel siehe Cölfen und Antonietti.²⁸ Eine Schlüsselrolle spielen wiederum Precursor, die in der Regel jedoch nicht amorph sondern kristallin sind. Diese werden häufig durch organische Additive temporär stabilisiert und ordnen sich zu Überstrukturen verschiedenster Morphologien zusammen. Erfolgt die Aggregation der Precursor dabei kristallographisch orientiert, wird ein Mesokristall gebildet. Auch denkbar ist die Aggregation amorpher Precursor und deren anschließender orientierter Kristallisation zu einem Mesokristall. Dieser kann von organischem Material durchsetzt sein und sich, obwohl nicht kontinuierlich sondern aus vielen kleineren nm-Baueinheiten aufgebaut, wie ein Einkristall verhalten.^{34,35} Mesokristalle sind meist Intermediate, weswegen es oft schwer ist, sie zu identifizieren: Ihre nm-Baueinheiten fusionieren kristallographisch und bilden so einen Einkristall, in dem seine ursprünglichen Baueinheiten nicht mehr auszumachen sind. Letztlich wird also durch ori-

enterte Anlagerung („oriented attachment“) von Nanopartikeln über die Zwischenstufe des Mesokristalls ein Einkristall gebildet. Die Anlagerung kann in 2 oder allen 3 Raumrichtungen, also dreidimensional, stattfinden.

Da auch Biomineralien organisches Material eingeschlossen haben und trotz ihrer komplexen Formen oft einkristallin sind, liegt es nahe, daß einige von ihnen ebenfalls Mesokristalle sind bzw. diese als Vorstufen haben.²⁹ Tatsächlich sind in vergangener Zeit bereits einige Beispiele gefunden worden.^{36,37} Abbildung 2.4 stellt die Bildung von Einkristallen

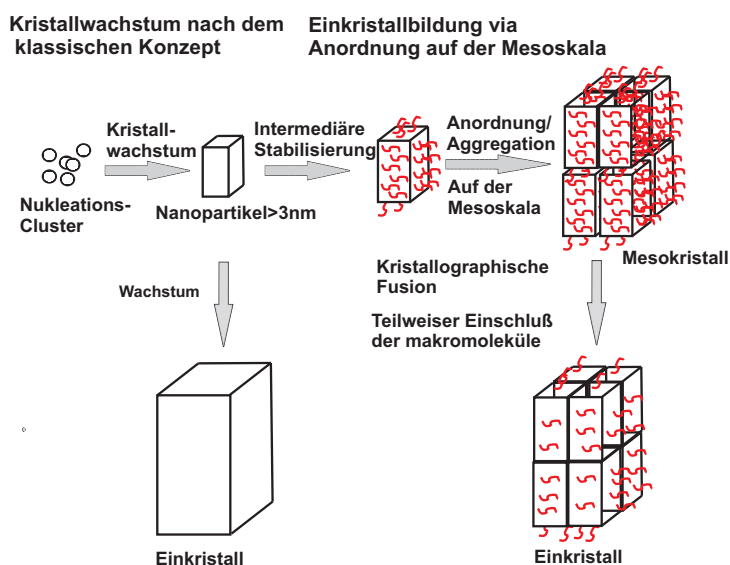


Abbildung 2.4: Graphische Darstellung der klassischen Kristallisationstheorie *via* Ionenwachstum (links) im Vergleich zur Einkristallbildung via Nanopartikel-Aggregation und Mesokristallbildung nach Cölfen und Mann.¹⁹

über Mesokristalle gegenüber dem klassischen Wachstum von Einkristallen dar. Der Pfad über Aggregation noch amorpher Precursor und deren gerichteter Kristallisation in den Aggregaten zu Mesokristallen ist nicht dargestellt.

In der synthetischen Welt sind Mesokristalle erst seit kurzem bekannt,^{31,34,35,38-42} wenn auch einer der ersten Hinweise auf einen intermediären Mesokristall bei $BaSO_4$ bereits 1969 gefunden wurde.⁴³ Die Anordnung von kolloidalen Partikeln zu Überstrukturen an sich durch Selbstorganisation hingegen ist bereits ein länger bekanntes und wichtiges Konzept,⁴⁴ so beispielsweise die Bildung von kolloidalen Kristallen. Hierbei handelt es sich um dreidimensionale periodische Gitter aus monodispersen kolloidalen, sphärischen Bausteinen: diese werden, beispielsweise durch Verdampfen des Lösemittels und Kapil-

larwirkung Überstrukturen angeordnet. Sie können durch diese periodische Anordnung neue Eigenschaften aufweisen, beispielsweise Opaleszieren, und können für wichtige Anwendungen von Bedeutung sein.^{45,46}

Eine Möglichkeit, die Selbstorganisation von Nanopartikeln auszulösen, bietet die additivgesteuerte Kristallisation, die den Einfluß von Additiven auf die Kristallisation untersucht, unter anderem, aber nicht nur, um die Rolle bestimmter Makromoleküle bei der Bildung von Biomineralien in der Natur aufzuklären oder nachzuahmen. Bei diesen Arbeiten wurde die oben beschriebene Bildung von Mesokristallen, die Spezialfälle von kolloidalen Kristallen sind, beobachtet³⁸ und zum Anlaß genommen, dieses Konzept auch in der Natur zu suchen. Es hat sich gezeigt, daß die Kristallisation differenzierter zu sehen ist, als dies für das Konzept der klassischen Kristallisationstheorie der Fall ist, nach der in übersättigter Lösung durch Zusammenlagerung von Ionen^{1,20} ein Nukleus gebildet wird, der bei Überschreiten einer kritischen Größe durch die Anlagerung weiterer Ionen zum Einkristall wächst (s. Kapitel 2.1). Möglicherweise muß dieses Konzept modifiziert oder gar abgelöst werden. Komplexe Formen oder der Einschluß von Makromolekülen können damit nicht erklärt werden; doch auch die Mechanismen bei der Bildung von Mesokristallen sind noch in der Aufklärungsphase.

2.3 Perlmutter

Perlmutter ist eines der meistuntersuchten Biomineralien. Es wird von einigen Mollusken an der Schaleninnenseite gebildet und ist für die enorme Bruchfestigkeit⁴⁷ der Schale verantwortlich, die dem Tier als mechanischer Schutz, beispielsweise gegen Freßfeinde und Salzwasser dient. Neben seiner Schönheit sind es diese Materialeigenschaften, die es für die Forschung interessant machen. Könnte es kostengünstig in großen Mengen hergestellt werden, böte es als leichter und zugleich äußerst stabiler Werkstoff zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten, beispielsweise in der Bauindustrie. Daher ist es ein wichtiges Ziel auf dem Feld der Biomineralisation, den Bildungsmechanismus von Perlmutter zu verstehen und sich dieses Wissen bei seiner Herstellung zu Nutze zu machen. Obwohl es viele Ansätze gab, Perlmutter zu kopieren^{25,48-50} und diese Materialien teilweise Eigenschaften haben, die denen des Perlmutter gleichkommen,⁵⁰ ist es bisher nicht gelungen, ein vom

Original ununterscheidbares Material zu synthetisieren.

Perlmutter ist ein Kompositmaterial, das zu 95% oder mehr aus Aragonit (einer orthorhombischen Calciumcarbonatmodifikation) und bis zu 5% organischen Komponenten besteht.⁵¹ Dieser geringe Anteil an organischem Material steigert seine Bruchfestigkeit um das 3000fache gegenüber reinem Aragonit.⁵² Um dies zu erreichen, hat die Natur ein raffiniertes Bauprinzip entwickelt, dessen Funktionsweise bis heute noch nicht vollständig geklärt werden konnte:⁵³ Die mineralische Komponente, das Aragonit, bildet Schichten aus 200-1200 nm hohen, 5-15 μm breiten sechseckigen Plättchen,⁵⁴⁻⁵⁶ die sich nahezu wie Einkristalle verhalten. In diesen Plättchen sind intrakristalline, lösliche Proteine eingeschlossen. Zwischen den Aragonitschichten befinden sich 20-50 nm dünne Lagen unlöslichen, organischen Materials (die unlösliche organische Matrix).^{54,57} Sie haben eine faserartige Struktur⁵⁸ durchsetzt von 5- 50 nm große Poren⁵⁸ und sind ihrerseits aus einer Schichtstruktur mit einem dünnem Kern aus β - Chitin⁵⁹ aufgebaut umgeben von unlöslichen Proteinen („Sandwichstruktur“),⁶⁰ welche als seidenähnlich beschrieben werden.^{9,61,62} Der Proteinanteil der unlöslichen Matrix beträgt ungefähr 78 wt%.⁶³ Abbildung 2.5 zeigt eine schematische Darstellung von Perlmutter. Es wird außerdem diskutiert,

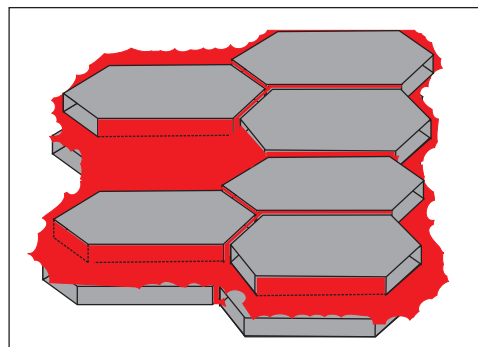


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Schichtstruktur von Perlmutter: Die Aragonitplättchen (grau) sind 200-1200 nm hoch, ihr Durchmesser beträgt ca. 5-15 μm . Die Lagen der organische Matrix (rot) sind ca. 20-50 nm dick und befinden sich zwischen den Aragonitschichten. Sie sind durch die Aragonitschichten hindurch miteinander verbunden, so daß die Mineralplättchen von einer „Box“ aus organischer Matrix umgeben sind. Diese sind hier zum besseren Verständnis nur unvollständig dargestellt.

daß sich lösliche Proteine auf den unlöslichen Matrixschichten angelagern.⁶¹ Die genaue Zusammensetzung und Verteilung aller Proteine auf der Matrix ist jedoch bislang nicht

genau bekannt. Die Matrixlagen sind durch die Aragonitschichten hinweg mit Collagenbrücken⁶⁴ so miteinander verbunden, daß jedes einzelne Aragonitplättchen mit einer honigwabeförmigen „Box“ aus unlöslicher Matrix umhüllt ist (oben und unten von den Matrixschichten, an den Seiten von den Collagenbrücken).

Die (001)-Flächen der Plättchen sind parallel zu den Matrixlagen exponiert, ihre c-Achse ist also senkrecht, die a- und b-Achsen parallel zur Matrix orientiert. Die (001)-Oberflächen sind jedoch nicht glatt, sondern weisen Nanounebenheiten auf, sogenannte „nanoasperities“.^{65,66} Je nach Gattung sind die Plättchen verschiedener Aragonitschichten versetzt zueinander oder übereinander, in sogenannten „stacks of coins“ (s. Abb. 2.7), angeordnet, die a- und b-Achsen innerhalb einer Schicht parallel oder ungeordnet zueinander orientiert.

Der beliebte iriszierende Effekt von Perlmutter wird durch die Abmessung der Aragonitplättchen hervorgerufen, da ihre Höhe im Bereich des sichtbaren Lichts liegt und so Interferenzfarben erzeugt.

,

Haliotis laevigata

Für die Studien in dieser Arbeit wurde das Perlmutter der Seeschnecke *Haliotis laevigata*, einer Abalone, verwendet. Diese gehört zu den Gastropoden. Sie besitzt somit nur eine Schalenklappe (Im Gegensatz zu „Bivalves“ mit zwei Klappen). Ihre Schale kann eine Größe von 220 mm erreichen, typisch sind aber ca. 150 mm. Von außen nach innen ist ihre Schale aus dem sogenannten Periostracum, einer organischen Schicht, die vor der Mineralisation gebildet wird⁶⁷ (und bei älteren Tieren oft nicht mehr oder nur noch teilweise vorhanden ist), einer Schicht aus prismatischem Calcit und als innerstes der Perlmuttertschicht aufgebaut. Die Aragonitplättchen liegen bei Gastropoden übereinander („stacks of coins“), das Wachstum erfolgt in einer pyramidenartigen Anordnung, so daß die jüngsten Plättchen am schmalsten sind, die darunterliegenden älteren immer breiter werden, bis sie zusammenstoßen. Es wachsen also immer mehrere Lagen gleichzeitig. Die fertigen Aragonitplättchen sind ca. 0,5 μm dick,⁶⁸ die Matrixlagen ungefähr 50 nm. Es werden zuerst einige Matrixlagen abgeschlossen, zwischen denen das Kristallwachstum erfolgt. Abbildung 2.7 zeigt eine der ersten SEM- und TEM-Aufnahmen der Wachstums-

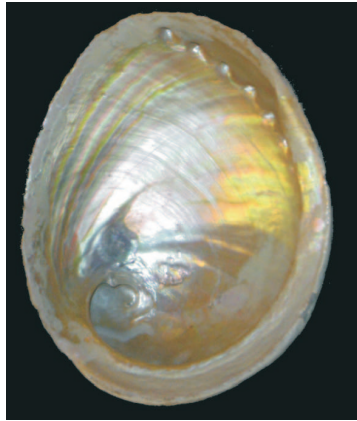


Abbildung 2.6: Foto des Perlmuttseite der hier verwendeten Schale der Seeschnecke *Haliotis laevigata*.

oberfläche.⁶⁹ Sie befindet sich auf der gesamten Innenseite der Schale.

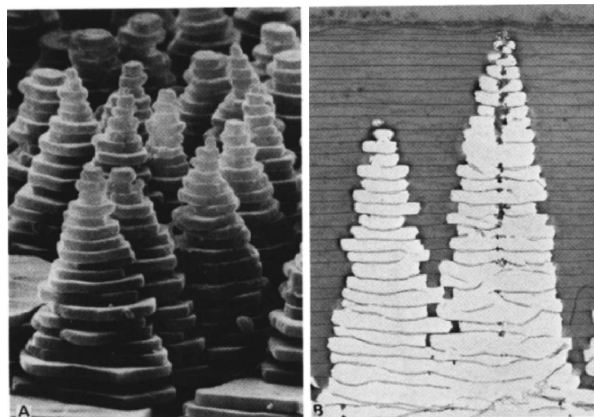


Abbildung 2.7: SEM (links)- und TEM (rechts) -Aufnahmen der Wachstums Oberfläche von Perlmutt von *Monodonta labio*, eine der in den ersten Studien zum Wachstum verwendeten Spezies.⁶⁹ Die Plättchen wachsen in mehreren Schichten, den sogenannten „stacks of coins“, gleichzeitig und haben eine Dicke von 0,45-0,6 μm .⁶⁹ Auf der TEM-Aufnahme sind die zuerst abgeschiedenen organischen Schichten zu erkennen, zwischen denen das Kristallwachstum der Aragonitplättchen erfolgt.

2.3.1 Modelle der Bildung von Perlmutter

Da es sich bei Biomineralien um biologische Proben handelt, die von einem lebenden Organismus gebildet werden, sind die Möglichkeiten, diese Bildungsmechanismen im Detail

aufzuklären, begrenzt. Es ist äußerst schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, ein Biomaterial *in vivo* „live“ während des Wachstums zu beobachten, abgesehen vom ganzheitlichen Wachstum und Untersuchungen mit dem Lichtmikroskop. Analytische Untersuchungen wie Elektronenmikroskopie oder Röntgenstreuung sind dabei völlig ausgeschlossen, da es den Organismus nachhaltig beeinträchtigen, wahrscheinlich aber töten würde. Daher kann man lediglich versuchen, das Biomaterial oder seine Komponenten in verschiedenen Wachstumsstadien zu isolieren und Rückschlüsse auf seinen Bildungsmechanismus zu ziehen. Hiermit sind viele Schwierigkeiten verbunden, wie Umwandlungen metastabiler Phasen während der Probenpräparation, so daß sie falsch oder gar nicht identifiziert werden, und das Auffinden von Bestandteilen, die nur in kleinen Mengen vorliegen. Zudem ist ein Organismus naturgemäß völlig inhomogen, so daß es problematisch ist, Proben an den „richtigen“ Stellen zu nehmen und Mechanismen, die von räumlich entfernten Komponenten (beispielsweise Zellen) ausgelöst werden, oder Synergieeffekte durch das Zusammenspiel mehrerer Komponenten zu erkennen. Biomaterialien sind meist hierarchisch strukturiert, so daß ihr Wachstum auf verschiedenen Ebenen erfolgt, was dessen Untersuchung zusätzlich erschwert, da die Beobachtung mehrerer Größenskalen gleichzeitig nahezu ausgeschlossen ist oder sogar nicht alle existierenden Hierarchie-Level aufgefunden werden. Ebenso ist es nicht trivial, den genauen Zustand des Biomaterials zu charakterisieren, da es in der Regel in seine Bestandteile aufgetrennt werden muß, um diese zu analysieren (Entfernen des Mineralanteils, Lösen und Sequenzieren der Proteine,..), wobei diese natürlich ihren ursprünglichen Zustand (Konformation und Ladung, Quellungsgrad, pH,...) nicht beibehalten. Aus diesen Gründen können Modelle zur Bildung verschiedener Biomaterialien nur auf Grund indirekter Beobachtungen und deren Schlußfolgerungen aufgestellt werden und müssen immer wieder überprüft und gegebenenfalls geändert oder verworfen werden.

So gibt es verschiedene Modelle zur Bildung von Perlmutter. Die im folgenden vorgestellten Modelle sind aus Untersuchungen an ausgewachsenen Mollusken (Molluskschalen wachsen während ihrer gesamten Lebensspanne) abgeleitet worden.

Das klassische Epitaxie-Modell

Das Epitaxie-Modell wurde 1984 von Weiner und Traub eingeführt.⁶¹ Diesem zufolge wächst Perlmutter durch die Permeation von Ionen in die Matrix mit nachgeschalteter heteroepitaktischer Kristallisation. Dabei bildet die unlösliche organische Matrix ein strukturierendes, zu den mechanischen Eigenschaften beitragendes Gerüst. Da ihre Zusammensetzung für verschiedene Specimen variiert, ist laut Modell anzunehmen, daß sie den Mineralisationsprozeß nicht beeinflusst. Das Gerüst besteht aus einem β -Chitinkern (in Abhängigkeit von der Spezies ist dieser nicht immer vorhanden) ummantelt von seidenartigen Proteinen, die eine β -Faltblatt-Konformation einnehmen und rechtwinklig zu den Chitinfasern orientiert sind. Es wurde eine „wohldefinierte räumliche Relation“ zwischen den β -Faltblatt-Orientierungen und der a- und b-Achsen im Aragonit gefunden, wobei die Matrix weniger orientiert als das Mineral war. Dies wurde aus Röntgen- und Elektronenbeugungsuntersuchungen^{61,62} geschlossen. Da die meisten löslichen Proteine als reich an sauren Aminosäuren gefunden wurden,⁷⁰ postulierten Weiner und Traub, daß die sauren löslichen Proteine die Nukleationszentren stellen und lokal Calcium-Ionen anreichern, die wiederum Carbonationen anreichern. Die Proteine ordnen sich dabei so als β -Faltblätter auf der unlöslichen Matrix an, daß die zweidimensionale Verteilung der Zentren mit einer wohldefinierten Fläche im Kristallgitter übereinstimmt und bei Übersättigung an Calcium- und Carbonationen Aragonit mit der [001]-Ebene nukleiert wird. Abbildung 2.8 stellt dies schematisch dar. Weiner und Traub weisen jedoch ausdrücklich darauf hin, daß nur wenig über die Nukleationszentren bekannt und ihre Diskussion daher spekulativer Natur ist.

Das erweiterte Epitaxie-Modell

Levi-Kalisman *et al.* erweiterten 2001 das klassische Epitaxie-Modell auf der Grundlage von ausführlichen Kryo-TEM-Untersuchungen der unlöslichen organischen Matrix, welche Trocknungsartefakte vermieden.⁵¹ Sie fanden dabei vor und nach Entfernen der unlöslichen Proteine nahezu identische TEM-Aufnahmen von der Matrix (parallel zu den Schichten). Würde diese aus einer Schichtstruktur aus einem Chitinkern ummantelt von unlöslichen Proteinen bestehen, wie im alten Epitaxiemodell und auch zuvor angenom-

erweiterten Modell jedoch auf die zuvor beobachtete Relation zwischen der Orientierung der unlöslichen Proteine und dem Aragonit.⁶² Eine Illustration dieses Modells zeigt Abbildung 2.9

Levi-Kalisman *et al.* weisen darauf hin, daß ihr Modell nur aus Negativbeweisen auf-

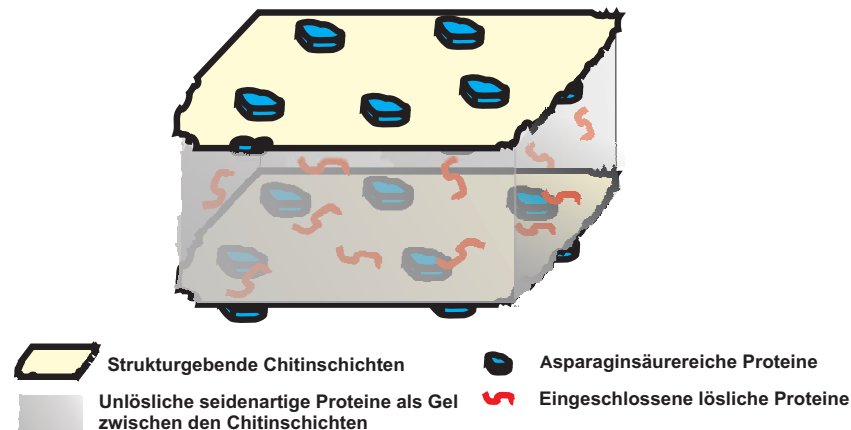


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des erweiterten Epitaxie-Modells nach *Levi-Kalisman et al.*: Die Matrixschichten bestehen nur aus Chitin. Die unlöslichen seidenartigen Proteine sind in Form eines Gels zwischen den Chitinschichten verteilt, einige lösliche Proteine sind eingeschlossen. Auf dem Chitin sind asparaginsäurereiche Proteine diskontinuierlich verteilt und bilden die Nukleationszentren. Dies erklärt die Übereinstimmung der Orientierung des Chitins mit dem Aragonit.

gebaut wurde, und betonen die Wichtigkeit der Reevaluierung von Nukleations- und Kristallwachstumsmechanismen im Falle einer gequollenen Gelphase aus als Mikroumgebung der Mineralisation, wobei diese von der Mineralphase in inter- und intrakristalline Bereiche verdrängt werden.

Das Modell der Mineralbrücken

Schäffer *et al.* interpretierten 1997 Ergebnisse von SEM-, TEM- und SICM (Scanning Ion Conductance Microscopy)-Untersuchungen derart, daß die Aragonitplättchen verschiedener Schichten durch Mineralbrücken miteinander verbunden sind.⁵⁸ Daraufhin schlugen sie ein alternatives Modell des Perlmutterwachstums zum Heteroepitaxiemodell vor: Die Plättchen wachsen in *c*-Richtung, bis sie an die darüberliegende Matrixlage stoßen. Treffen sie dabei auf die Löcher in der Matrix, die somit eigentlich Poren sind, wachsen sie

in Form von Mineralbrücken durch die Poren und bilden in der darüberliegenden Schicht neue Plättchen. So werden ungefähr 3-10 miteinander verbundene Plättchen gebildet, die aus einem Einkristall bestehen. Abbildung 2.10 illustriert dieses Modell: Zuerst wächst nur eine Mineralbrücke durch eine „zentrale“, größere Pore,⁵⁸ die somit dem Nukleationzentrum des neuen Plättchens entspricht. Mit dessen lateralem Wachstum können sich jedoch weitere Mineralbrücken durch andere Poren (nicht dargestellt) zwischen den Plättchen bilden. Durch die Poren können Ionen, möglicherweise auch Proteine diffundieren. Die Bildung der jeweils ersten Aragonitlage wird in dem Modell nicht erklärt, die Mineralbrücken werden als Beweis gegen die Epitaxie interpretiert.

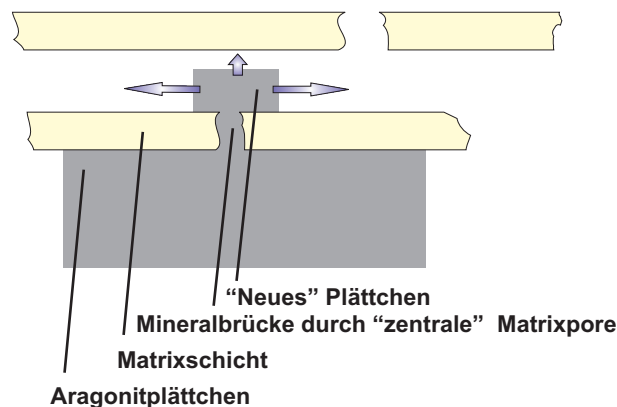


Abbildung 2.10: Illustration des Modells der Mineralbrücken nach Schäffer *et al.*⁵⁸ Die Plättchen wachsen durch eine „zentrale“ Pore der Matrix in die darüberliegende Schicht, wo so ein neues Plättchen gebildet wird. Mit dessen fortschreitendem lateralem Wachstum können weitere Mineralbrücken durch andere Poren (hier nicht eingezeichnet) entstehen.

Andere Modelle

Es sind verschiedene andere Modelle oder Ansätze zur Erklärung des Perlmutterwachstums bekannt, wenn auch weniger verbreitet als das Epitaxie-Modell. So wurde beispielsweise vorgeschlagen, daß die Aragonitplättchen durch die Aggregation von Nanopartikeln wachsen,^{37,66,71} wobei die Matrix zwar als Templat für die Ausdehnung der Plättchen dient, nicht jedoch auf der atomaren Skala, wie für die oben beschriebene Epitaxie erforderlich.³⁷

Weiss *et al.* ziehen 2002 die Möglichkeit in Betracht, daß Perlmutter über von ACC ummantelten Aragonitinseln gebildet wird.¹⁶

Auf diese und andere verschiedene Alternativen wird bei der Diskussion der Ergebnisse in Kapitel 5 näher eingegangen.

Kapitel 3

Wichtige Methoden zur Charakterisierung

3.1 Röntgenstreuung

Die Röntgenweitwinkelstreuung (WAXS)⁷² liefert Informationen über atomare und molekulare Dimensionen bei auf der Skala von Atomen oder Molekülen periodisch angeordneten Proben, wie beispielsweise Einkristallen. Es wird monochromatische Röntgenstrahlung auf die Probe gelenkt, die an den Elektronen der Probe gebeugt wird. In Abhängigkeit vom Streuwinkel variiert die Intensität der Beugungsreflexe durch konstruktive und destruktive Interferenz, welche von den charakteristischen Abständen d der Netzebenen des Kristalls und der Orientierung des Kristalls zum Röntgenstrahl bestimmt wird. Abbildung 3.1 links zeigt schematisch den Aufbau eines Streuexperiments. Die zusätzliche Weglänge ABC , die der untere Strahl zurücklegt, entspricht $2d \sin\theta$ (s. Abb. 3.1 rechts), so daß Peakmaxima auftreten, wenn die Bedingung

$$2d\sin\theta = n\lambda, n = 0, 1, 2, 3, \dots \quad (3.1)$$

erfüllt ist, das heißt, die Phasenverschiebung von zwei Wellenzügen ein Vielfaches der Wellenlänge ist. Dies ist als das Bragg'sche Gesetz bekannt⁷³ und gilt allgemein für Streuprozesse. Aus den Positionen der Bragg-Peaks kann man mit der WAXS somit die charakteristischen Abstände der Netzebenen einer auf der Skala von Atomen oder Molekülen periodisch angeordneten Probe ermitteln. Dabei verhalten sich der Netzebenenabstand und

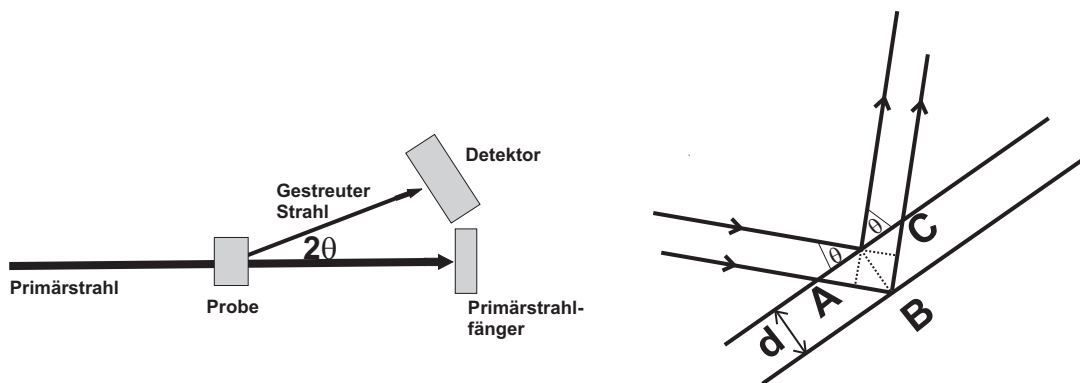


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau eines Streuexperiments (links) und der Bragg-Gleichung (rechts). Die gebeugten Strahlen werden winkelabhängig detektiert. Bei Erfüllung der Bragg-Bedingung tritt ein Peakmaximum auf

der Streuvektor reziprok zueinander. Das Bragg'sche Gesetz wurde für einen unendlich großen Kristall abgeleitet. Bei kleineren Kristallen sind die Beugungsreflexe auch bei geringen Abweichungen von der Bragg-Gleichung zu finden.

Bei dem hier verwendeten Diffraktometer handelt es sich um das D8 Advance, Bruker axs.

3.2 Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie ermöglicht die Abbildung von Objekten, die mit dem bloßen Auge nicht aufgelöst werden können. Die theoretische Auflösung entspricht dabei der Wellenlänge des Lichtes. Nach der Interferenztheorie von Abbè hängt der minimale auflösbare Abstand jedoch vom Öffnungswinkel α des Objektivs und dem Brechungswinkel n des Mediums zwischen Objektiv und Probe ab und beträgt nur

$$\delta = \frac{0,61\lambda}{n \sin\alpha} \quad (3.2)$$

wobei $A = n \sin\alpha$ die numerische Apertur ist. Mit der sogenannten Ultramikroskopie, bei der das Streulicht detektiert wird, ist es dennoch möglich, Auflösungen von bis zu ca. 100 nm zu erreichen. Für die Abbildung kleinerer Dimensionen ist die Elektronenmikroskopie geeignet (s. Kapitel 3.3, 3.5).

Bei dem hier verwendeten Lichtmikroskop handelt es sich um ein Olympus BX41.

3.3 (Hochauflösungs-)

Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie⁷⁴ (TEM) bietet eine deutlich höhere Auflösung als die Lichtmikroskopie, da nicht Licht sondern Elektronen verwendet werden. Diese werden im elektrischen Feld beschleunigt und haben eine von der Beschleunigungsspannung abhängige deutlich kleinere Wellenlänge als Licht. Der prinzipielle Verlauf des Elektronenstrahls ist dabei dem im Lichtmikroskop ähnlich, anstatt der Linsen sind elektrische und magnetische Felder geeignet, um die Elektronen so abzulenken, daß Linsenwirkungen wie am Lichtmikroskop entstehen. Es ist ein Hochvakuum nötig, um eine große freie Weglänge und eine minimale Aufweitung des Elektronenstrahls durch Wechselwirkungen mit Gasteilchen zu erzielen. Die Elektronen haben nach dem Welle-Teilchen-Dualismus nach de Broglie eine Wellenlänge von

$$\lambda = \frac{h}{p} \quad (3.3)$$

(mit $p = mv_e$: Impuls des Elektrons, λ : Wellenlänge des Elektrons, h : Plancksches Wirkungsquantum, m_e : Masse, v_e : Geschwindigkeit des Elektrons). So kann mit einem hochauflösendem TEM (HRTEM) eine Auflösung bis in den Sub-Angstrom-Bereich⁷⁵ erreicht werden. Die kinetische Energie der Elektronen läßt sich dabei zu

$$E_{kin} = \frac{m_e v^2}{2} = eU \quad (3.4)$$

(mit e : Elementarladung und U = Beschleunigungsspannung) errechnen.

Bei der TEM wird die Probe von den Elektronen durchstrahlt, so daß zum einen nur ein zweidimensionales Bild geliefert wird, und die Probe zum anderen nicht zu dick sein darf, um die Transmission zu ermöglichen.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurden ein Philips CM200 FEG bzw. ein EM 912 Omega der Firma Zeiss verwendet.

3.4 Elektronenbeugung

Mit Hilfe der Elektronenbeugung (ED) ist es möglich, Informationen über die kristalline Struktur (wie Modifikation, Orientierung oder Polykristallinität) einer Probe zu erhal-

ten, da Elektronen an Atomen gestreut werden. Wenn auch die Gitterkonstanten weniger genau als mit der Beugung von Röntgenstrahlen bestimmt werden können, besteht der unschlagbare Vorteil der ED gegenüber den indirekten Methoden (wie beispielsweise WAXS), die nur eine statistische Verteilung über die gesamte Probe ermitteln können, in der Möglichkeit, orstaufgelöste Diffraktogramme zu erhalten. Dies ist besonders bei inhomogenen Proben sehr wichtig.

Wie bei der Röntgenbeugung (s. Kapitel 3.1) erscheinen die Beugungsreflexe periodischer Objekte in Abhängigkeit von der Bragg-Gleichung.

3.5 Rasterelektronenmikroskopie

Im Gegensatz zur TEM besteht bei der Rasterelektronenmikroskopie⁷⁴ (SEM) kein direkter Strahlengang zwischen Probe und Bild. Der Strahl trifft im Hochvakuum auf die elektrisch leitende Oberfläche einer Probe, wodurch die Emission von Sekundärelektronen durch Streuprozesse von Primär- und rückgestreuten Elektronen angeregt wird, welche materialabhängig aus einer Oberflächenschicht von 5- 50 nm Tiefe aus der Probe austreten können und zur Bildgebung genutzt werden.⁷⁶ Das resultierende Bild wird von der jeweiligen Ausbeute von Elektronen pro Bildpunkt erzeugt. An Kanten und mit zunehmender Neigung der Oberfläche zum Primärstrahl steigt die Ausbeute. Die Probe wird nicht als Ganzes, sondern Punkt für Punkt rasterförmig abgetastet, indem der Strahl über sie Zeile für Zeile hinwegwandert. Da die Signale umgekehrt proportional zum Durchmesser des Strahls sind, aber dieser aus technischen Gründen nicht beliebig klein werden kann, ist dem Auflösungsvermögen eine Grenze gesetzt. Sie kann bis zu 3 nm betragen.

Die emittierten Elektronen werden vom Detektor gesammelt und erzeugen ein Bild auf einer Fernsehbildröhre, indem deren Elektronenstrahl synchron mit dem des Mikroskops über den Leuchtschirm wandert und an jedem Punkt eine von der Höhe der Probenoberfläche abhängige Helligkeit erzeugt.

Der Vorteil der Bilderzeugung in Emission gegenüber der in Transmission besteht in der hohen Tiefenschärfe, so daß ein dreidimensionaler Eindruck der Probe entsteht.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde ein LEO 1550-GEMINI verwendet. Die Proben wurden mit Gold bedampft, um sie leitfähig zu machen.

3.6 ζ -Potential

Geladene Teilchen wandern in einem elektrischen Feld.⁷⁷ Ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit bekannt, kann ihr Oberflächenpotential zur umgebenden flüssigen Phase bestimmt werden.

An der Oberfläche der Partikel adsorbieren Gegenionen, die eine mit dem Teilchen relativ fest verbundene elektrische Doppelschicht bilden, die sogenannte Sternschicht. Diese wiederum ist von einer beweglichen diffusen Schicht umgeben, die in das elektrisch neutrale Lösungsmittel übergeht.

Wandert das Teilchen im elektrischen Feld, wird ein Teil der diffusen Doppelschicht abgestreift. Es bildet sich eine hydrodynamische Gleitebene. Das an dieser Ebene meßbare Potential wird als ζ -Potential bezeichnet und wird oft vereinfachend über die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung ermittelt:⁷⁷

$$\zeta = \frac{\nu}{\eta\epsilon E} \quad (3.5)$$

mit der Teilchengeschwindigkeit ν , der Viskosität des Dispersionsmediums η , der Dielektrizitätskonstanten ϵ und der elektrischen Feldstärke E . Die Gleichung gilt für Partikel, deren Radius deutlich größer als die Dicke der elektrischen Doppelschicht ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit kann mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung bestimmt werden. Die hier gemessenen ζ -Potentiale wurden nur als qualitative Aussage verwendet. Zur Messung wurde ein Zetamaster (Malvern Instruments) verwendet.

Kapitel 4

Experimenteller Teil

Das in diesen Experimenten verwendete Wasser wurde doppelt destilliert und mit einer „Milli-Q“-Anlage deionisiert. Die Chemikalien wurden von „Fluka“ erworben mit Ausnahme der Protease Subtilisin und Na_2CO_3 , welche von Sigma-Aldrich erworben wurden.

4.1 Kristallisationmethoden

Gasdiffusion Die Gasdiffusionsmethode zur Präzipitation von Calciumcarbonat ($CaCO_3$) beruht auf der Zersetzung von Ammoniumcarbonat ($(NH_4)_2CO_3$) in Kohlendioxid (CO_2) und Ammoniak (NH_3) und deren Diffusion in eine Calciumchloridlösung ($CaCl_2$).⁷⁸

Hier wurden die $CaCl_2$ -Lösungen mit der gegebenenfalls jeweiligen Menge an Additiv über Nacht mit Stickstoff (N_2) gespült. Ein schmales 30 ml-Schnappdeckelgläschen mit, soweit nicht anders genannt, 20 ml der gespülten Lösung und ein kleines Schnappdeckelgläschen mit 1-2g $(NH_4)_2CO_3$ wurden je mit einem mit sechs Nadellöchern versehenem Stück Parafilm abgedeckt und in ein mit Parafilm abgeschlossenes Becherglas (1000 cm^3) plaziert. Durch die thermische Zersetzung des $(NH_4)_2CO_3$ freigesetztes CO_2 und NH_3 diffundieren in die $CaCl_2$ -Lösung, wodurch der pH-Wert auf 9,5 ansteigt und $CaCO_3$ präzipitiert. Die Kristalle wurden gegebenenfalls für weitere Untersuchungen mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Als Additive wurden, soweit nicht anders genannt, Polyacrylsäure (pAA) ($M = 5100$ oder

450000 g/mol) oder Polyasparaginsäure (pAsp) ($M = 6000, 20000$ oder 33400 g/mol) in Konzentrationen zwischen $10 \mu\text{g/ml}$ und 1 mg/ml verwendet. Die Konzentration der CaCl_2 -Lösung betrug, wenn nicht anders genannt, 10 mmol/l .

Kitano-Methode Die Kitano-Methode ermöglicht eine sehr langsame Bildung von CaCO_3 .⁷⁹ Eine CaCO_3 -Suspension wird mit CO_2 gespült, wodurch sich das Gleichgewicht zwischen CaCO_3 und Calciumhydrogencarbonat zugunsten des leichter löslichen Calciumhydrogencarbonats verschiebt, welches in Lösung geht. Anschließend entweicht das CO_2 aus der Lösung, und CaCO_3 nukleiert. Dies geschieht vor allem an oder nahe der gas-flüssig-Grenzfläche. Diese Methode wird also von dem Ausgasen des CO_2 in bzw. aus der Lösung bestimmt

Hier wurde eine Suspension von $0,2 \text{ g CaCO}_3$ in 100 ml Wasser ca. 2 Stunden mit CO_2 gespült, abfiltriert, das jeweilig nötige Volumen mit entsprechender Menge an Additiv versetzt und für weitere 30 Minuten gespült. Das Reaktionsgefäß wurde mit durchlöcherter Parafilm abgedeckt. Als Additiv wurde, soweit nicht anders genannt, pAA ($M = 5100$ oder 450000 g/mol) oder pAsp ($M = 6000, 20000$ oder 33400 g/mol) im Konzentrationsbereich zwischen 10 und $100 \mu\text{g/ml}$ verwendet.

Double Jet mit Durchflußzelle Bei der Double-Jet-Methode werden eine CaCl_2 - und eine Natriumcarbonat (Na_2CO_3)-Lösung mit Hilfe einer Spritzenpumpe über Kapillaren kontinuierlich in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt.⁸⁰ Die Flußgeschwindigkeit läßt sich dabei über die Pumpe festlegen. Die Präzipitation von CaCO_3 findet sehr schnell bei Zusammentreffen der Lösungen an den Kapillarenden durch lokale Übersättigung statt; dadurch wird eine heterogene Nukleation an den Glaswänden des Gefäßes verhindert. Das Additiv wird üblicherweise in Wasser im Reaktionsgefäß vorgelegt,⁸⁰ das Volumen steigt durch das Zupumpen der beiden Lösungen, wodurch das Additiv verdünnt wird. Die Verwendung einer mit den Kapillaren verbundenen Durchflußzelle hingegen bietet den Vorteil des ständigen Durchflusses neuer Lösung gleicher Konzentration. Für die hier durchgeführten Experimente wurde eine Durchflußzelle nach dem Vorbild von Volkmer *et al.*²⁵ konstruiert. Abbildung 4.1 zeigt den hier verwendeten Versuchsaufbau. Die Durchmischung der beiden Lösungen erfolgt, anders als bei Volkmer *et al.*, bereits vor

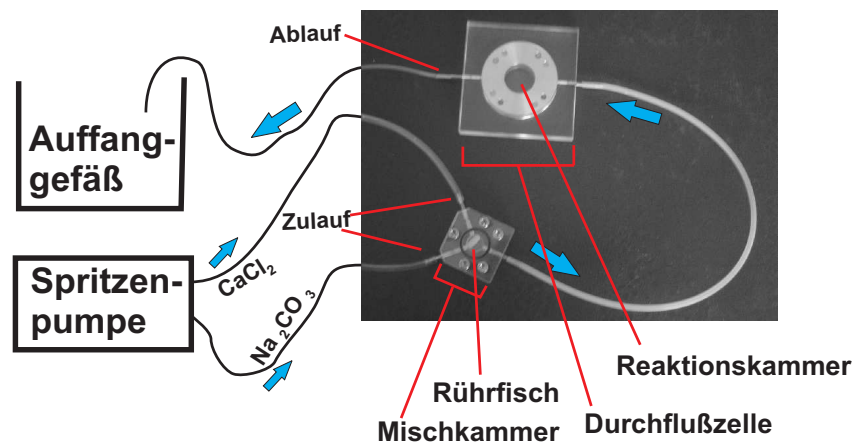


Abbildung 4.1: Fotografie der nach dem Vorbild von Volkmer et al.²⁵ konstruierten Durchflußzelle mit schematischer Darstellung des Flußverlaufes der Lösungen. Die Lösungen werden in einer Mischkammer zusammengeführt, durchmischt, durch die eigentlichen Durchflußzelle geleitet, wo die Reaktion lichtmikroskopisch verfolgt werden kann, abgeleitet und in einem Auffangbehälter gesammelt.

Eintritt in den Reaktionsraum durch eine vorgeschaltete Mischkammer mit Rührfisch. Das Additiv wurde in gleicher Konzentration in beiden Lösungen vorgelegt. Nachteil der Verwendung einer Durchflußzelle ist der - in Abhängigkeit von der Flußgeschwindigkeit - relativ hohe Verbrauch an Additiv.

Es wurden, soweit nicht anders genannt, 10 mM $CaCl_2$ und 10 mM Na_2CO_3 -Lösungen, als Additiv pAA ($M = 5100$ oder 450000 g/mol) oder pAsp ($M = 6000$ oder 20000 g/mol) im Konzentrationsbereich zwischen 10 und $56 \mu\text{g/ml}$) verwendet. Es wurden Flußgeschwindigkeiten von 0,02 und 0,2 ml/min. eingestellt.

4.2 Demineralisierung und Deproteinierung

Demineralisierung Vor der Demineralisierung wurde die äußere Calcitschicht der Schale mit Hilfe eines Sandstrahls mechanisch entfernt. Das verbleibende Perlmutter wurde in einige mm^2 große Stücke geschnitten. Zur Extraktion der unlöslichen organischen Perlmuttermatrix wurde das Aragonit mit 10%iger Essigsäure entfernt. Dazu wurden die Stücke in die Essigsäure gegeben und diese mehrmals gewechselt. Die Vollständigkeit der Demineralisierung wurde mittels thermogravimetrischer Analyse kontrolliert. Die Matrix wurde -bei Weiterverwendung innerhalb von ca. 14 Tagen- in der Essigsäure oder -bei

Lagerung über 14 Tage- in Raschit-Lösung (5 wt% 4-Chlor-3-methylphenol in Methanol) gelagert.

Deproteinierung Die demineralisierte Matrix wurde mit 50 (bzw. 100) mM Trizma-Puffer pH 7,4 gewaschen. Die Deproteinierung erfolgte mit leichten Abänderungen nach Weiss *et al*⁵⁹ in 10mM $CaCl_2$, 0,02 wt% Natriumazid in 30 ml des Puffers mit Subtilisin im mg-Maßstab. Die Menge an Subtilisins wurde nach grober Abschätzung der in der feuchten Matrix enthaltenen Proteinmenge dosiert. Die Matrix wurde nicht getrocknet, um vor allem ihre dreidimensionale Struktur möglichst wenig zu beeinflussen oder zu schädigen und konnte daher nicht genau eingewogen werden. Die Proben wurden bis zu über drei Wochen deproteiniert, wobei sie auf einem Schütteltisch bei Raumtemperatur kontinuierlich geschüttelt wurden. Die Lösung wurde alle fünf Tage gewechselt.

4.3 Remineralisierung

Für die Remineralisierungsexperimente wurden demineralisierte Matrixstücke aus der Essigsäure bzw. Raschit- oder Subtilisin-Lösung entnommen und mit Pinzetten parallel zu den Schichten zu dünnen Stücken (Submilimeter-Bereich im feuchten Zustand) auseinandergezogen und mit Reinstwasser oder Trizma-Puffer gründlich gewaschen. Die Mineralisierung wurde wie in 4.1 beschrieben durchgeführt. Im Falle der Gasdiffusions- und Kitanomethode wurden 2-3 Matrix-Stücke nach dem Spülen mit N_2 bzw. CO_2 in die Lösung gegeben, bei der Doublejetmethode wurden zwei Matrixstücke so zwischen den beiden Hälften der Durchflußzelle eingeklemmt, daß sie zum größten Teil in in den Reaktionsraum hineinragten. Nach der Remineralisierung wurde die Matrix, soweit nicht anders genannt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Konzentrationen der Lösungen werden bei den jeweiligen Methoden genannt (s.o.)

Kapitel 5

Ergebnisse und Diskussion

5.1 Kristallisationsmethoden

Um die am besten geeignete Remineralisationsmethode für die Biomineralmatrices zu finden, wurden die gängigen Methoden zur Präzipitation von $CaCO_3$ zunächst als solche getestet. Da in den Remineralisationsexperimenten zwei Komponenten die Kristallisation beeinflussen können (das lösliche Additiv und die unlösliche Matrix), ist es wichtig, die Blindexperimente (ohne jegliche Additive) gut zu kennen und von der durch Zusätze modifizierten Kristallbildung bzw. Präzipitation zu unterscheiden. Dies ist weniger trivial als es den Anschein hat, da die Ergebnisse der Kristallisation unter Umständen stark von Reaktionsbedingungen wie beispielsweise der Größe des verwendeten Reaktionsgefäßes abhängen.⁸¹

5.1.1 Gasdiffusionsmethode

Die Gasdiffusionsmethode ist extrem durch die Wahl der Reaktionsbedingungen beeinflussbar,⁸¹ hat sich hier aber unter gleichen Reaktionsbedingungen als sehr reproduzierbar erwiesen. Auch variieren die Kristalle mit der Stelle im Reaktionsgefäß (Boden, Wände, Lösungsoberfläche,..). Oft wird das unter Standardbedingungen thermodynamisch stabile Calcit-Rhomboeder als Default-Struktur dieser Methode beschrieben, die sich innerhalb ungefähr eines Tages bildet.⁷⁸ Vorstufen können dabei beispielsweise nadelförmiges Aragonit oder spherulitisches Vaterit sein.⁸¹ Mit dem hier verwendeten experimentel-

len Aufbau (s. Kapitel 4.1) wurden Calcit-Rhomboeder nur bei relativ großen $CaCl_2$ -Konzentrationen (mehr als 1 mol/l) oder langen Reaktionszeiten beobachtet. Bei geringeren Konzentrationen dagegen wurden - ohne Zusatz von Additiven - verschiedene Species von Kristallen mit hexagonaler Symmetrie⁸²⁻⁸⁸ gefunden, die bis zu über 14 Tage stabil sind.⁸⁹ Sie weisen dabei Überstrukturen verschiedener Morphologien auf, wie in

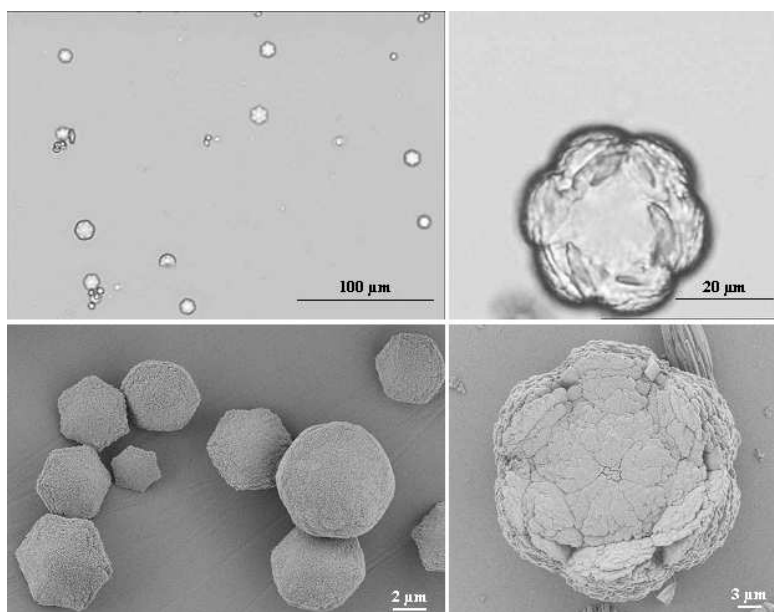


Abbildung 5.1: LM (oben) und SEM-(unten) Aufnahmen der mit der Gasdiffusionsmethode präzipitierten Kristalle bei $CaCl_2$ -Konzentrationen von 20 mmol/l (links) und 1 mmol/l nach 18 Stunden.

LM- und SEM-Aufnahmen in Abbildung 5.1 dargestellt, und bestehen aus Vaterit, wie das Beispiel des Röntgenpulverdiffraktogramms der aus einer 1 mmol/l $CaCl_2$ -Lösung gebildeten Kristalle zeigt (s. Abb. 5.2). Calcit-Rhomboeder wurden dabei in mikroskopischen Untersuchungen nur als Nebenkomponente gefunden; ihre Calcit-Peaks sind auch im Röntgendiffraktogramm (WAXS: Wide Angle X-Ray Scattering) zu erkennen. Letztere können teilweise auch bei der Probenpräparation als Artefakte von nicht vom Boden des Reaktionsgefäßes stammenden Kristallen eingeführt worden sein. Um den Calcitanteil zu bestimmen, wurden zu einer bestimmten Menge dieser Probe bekannte Mengen Calcit gegeben und die jeweilige Intensität des Calcitpeaks bei $2\theta = 29,5^\circ$ im WAXS-Pulverdiffraktogramm gegen die zugegebene Calcitmenge aufgetragen. Der Calcitanteil der Probe wurde extrapoliert: Er beträgt 49 %, kann allerdings aufgrund der kleinen

Probenmenge und der möglichen „Calcitverunreinigungen“ von nicht vom Boden stammenden Kristallen (s.o.) nur sehr grob abgeschätzt werden.

Die Morphologien der Vateritkristalle hexagonaler Symmetrie lassen sich in zwei Grup-

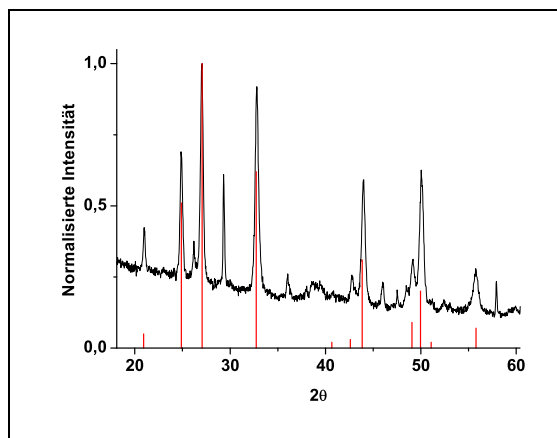


Abbildung 5.2: WAXS Pulver-Diffraktogramm der Kristalle aus einer 1 mmol/l $CaCl_2$ -Lösung nach 18 Stunden im Vergleich zu einem Diffraktogramm von reinem Vaterit. Die restlichen Signale entsprechen Calcit, welches auf einige Calcit-Rhomboeder in der Probe und mögliche „Verunreinigungen“ von nicht vom Gefäßboden stammenden Kristallen zurückzuführen ist.

pen einteilen: Bei einer $CaCl_2$ -Konzentration von 20 mmol/l werden nach ungefähr 12 Stunden sechseckige flache Kristalle mit einem Durchmesser von 2-20 μm beobachtet. Mit fortschreitendem Wachstum werden diese vor allem in der Mitte dicker, und ihre Ecken runden sich ab, so daß sie eine linsenartige Form annehmen. Diese verschiedenen Wachstumsstufen sind bereits nach 18 Stunden zu erkennen (s. Abb. 5.1, links unten). Nach ungefähr 3 Tagen haben sich die Kristalle zu Calcit-Rhomboedern umgewandelt. Bei einer Konzentration von 1 mmol/l bilden sich gut 30 μm große rosettenförmige Kristalle (Abb. 5.1 rechts), die aus kleinen Plättchen bestehen und mindestens 14 Tage stabil sind. Der Übergang zwischen diesen beiden Morphologien ist fließend, das heißt bei Konzentrationen zwischen 20 und 1 mmol/l sind teilweise beide Morphologien zu beobachten, wobei der Anteil an rosettenförmigen Kristallen mit abnehmender Konzentration steigt. SEM-Aufnahmen (s. Abb. 5.3) zeigen, daß die Morphologie letzterer leicht variiert, was wahrscheinlich ebenfalls auf einen Konzentrationseffekt zurückzuführen ist.

Ebenso gibt es keine obere Konzentration für die Bildung der sechseckigen/linsenförmigen Kristalle, vielmehr nimmt der Anteil an Calcit-Rhomboedern bei über 20 mmol/l

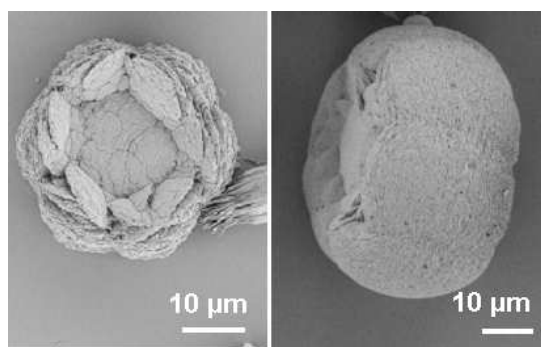


Abbildung 5.3: SEM-Aufnahmen rosettenförmiger Vateritkristalle mit leicht unterschiedlichen Morphologien. Der rechten Abbildung ähnliche Kristallmorphologien wurden in einer früheren Studie auf den Einfluß eines polyanionische Perlmutterproteins zurückgeführt.⁹⁰

$CaCl_2$ mit steigender Konzentration zu, bis sie schließlich die einzige Spezies darstellen. Genaue Studien über die Verhältnisse der verschiedenen Morphologien in Abhängigkeit von der Konzentration wurden jedoch nicht durchgeführt, da dies keinen Einfluß auf die Kernaussage dieser Experimente hat.

Da bei der Gasdiffusionsmethode NH_3 in die $CaCl_2$ -Lösung diffundiert und somit in der Lösung Ammoniumionen NH_4^+ gebildet werden, stellt sich die Frage, ob NH_4^+ -Ionen als ein die $CaCO_3$ -Kristallisation modifizierendes Reagenz wirken und zur Bildung dieser für die additivfreie $CaCO_3$ -Präzipitation ungewöhnlichen Morphologien führen können, also ein „unfreiwilliges Additiv“ der Gasdiffusionsmethode sind. Zum einen ist bekannt, daß nicht nur Makromoleküle sondern auch Ionen wie Li^+ und NH_4^+ die Kristallisation beeinflussen können.^{86,87} Zum anderen wurden sogar nahezu identische Kristalle bereits bei der Präzipitation von $CaCO_3$ mit der Kitano-Methode nach Zugabe von NH_4^+ -Ionen beschrieben.⁸⁷ Rosettenförmige Kristalle wurden in einer früheren Studie als „überwachsene Rhomboeder“ interpretiert und auf den Einfluß eines zugesetzten anionischen Proteins zurückgeführt.⁹⁰ Da die Präzipitation dabei durch Mischen von $CaCl_2$ - und $(NH_4)_2CO_3$ -Lösungen herbeigeführt wurde, ist es ebenso möglich, daß diese durch NH_4^+ -Ionen, nicht aber das zugesetzte Protein modifiziert wurde. Weiterhin wurden linsenförmige sechseckige Vateritkristalle mit der Kitanomethode durch die stereochemische Erkennung unter Stearinsäure-Monolagen,⁸⁸ durch den Zusatz von polaren Additiven⁸⁵ bei der Double Jet-Methode und unter dem Einfluß von Lithium-Ionen⁸⁶ gebildet.

Die hier erhaltenen Ergebnisse machen im Vergleich mit früheren Studien deutlich, daß NH_4^+ die Kristallisation von Calciumcarbonat erheblich modifizieren kann.⁸⁷ Deswegen ist es besonders bei der Gasdiffusionsmethode wichtig, die Reaktionsbedingungen umsichtig zu wählen und Blindversuche sorgfältig durchzuführen.

Der Bildungsmechanismus der hier beobachteten Vateritkristalle und die Rolle des NH_4^+ wurden näher analysiert, da trotz des großen Interesses an $CaCO_3$ als wichtige Komponente sowohl in Biomineralien als auch in industriellen Anwendungen die Kontrollmechanismen seiner Morphologiebildung noch nicht verstanden sind. Hier wurden unter einfachen Reaktionsbedingungen ohne jegliche Additive komplexe $CaCO_3$ -Überstrukturen synthetisiert.

Um diese Strukturen näher zu charakterisieren, wurden TEM-Untersuchungen durchgeführt. Abbildung 5.4 zeigt zwei der Partikel (a) und ihre jeweiligen Elektronenbeugungsbilder (b und c) aus 20 mmol/l $CaCl_2$ nach 18 Stunden Reaktionszeit. Obwohl der

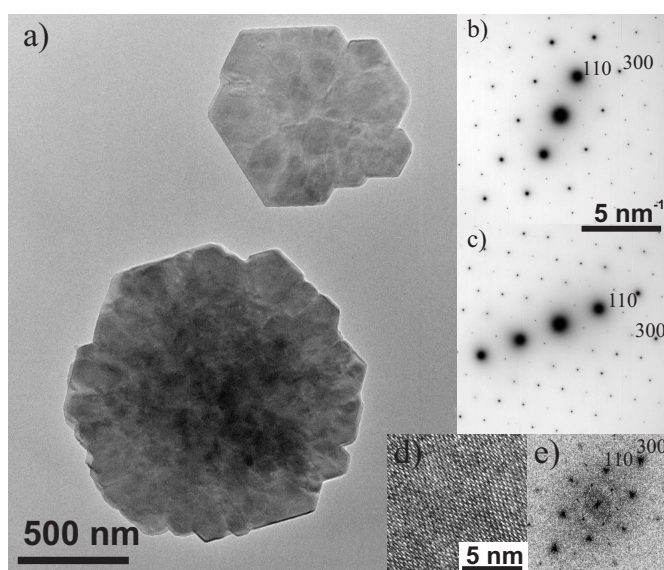


Abbildung 5.4: TEM-Aufnahmen (a) zweier sechseckiger bzw. linsenförmiger Partikel aus 20 mmol/l $CaCl_2$ nach 18 Stunden Reaktionszeit. Das Elektronenbeugungsbild des oberen (b) und des unteren Partikels (c) sind charakteristisch für Vaterit, ebenso wie das HRTEM-Bild (d) und das Powerspektrum (e) des oberen Partikels.

untere besonders im Zentrum schon deutlich dicker ist, wie die erhöhte Elektronendichte zeigt und mit SEM-Aufnahmen der linsenförmigen Partikel übereinstimmt, zeigen beide das charakteristische Beugungsbild eines Einkristalls. Es entspricht entlang der [001]-

Richtung orientiertem Vaterit, das heißt die (001)- bzw. (00-1)-Flächen sind exponiert. Dies wird vom HRTEM-Bild (s. Abb. 5.4 d) und Powerspektrum (s. Abb. 5.4 e) des oberen Partikels bestätigt. Da die (001)/(00-1)-Flächen bei Vaterit nur aus Calcium- bzw. Carbonationen bestehen, also geladen und somit energetisch nicht stabil sind, stellt sich die Frage, wie diese Flächen hier stabilisiert werden können. Auf Abbildung 5.4 a ist besonders bei dem kleinen Partikel deutlich zu erkennen, daß es sich keinesfalls um einen Einkristall handelt. Er ist aus gestapelten, teilweise als sechseckig zu erkennenden Plättchen aufgebaut, die, da sie ein einkristallines Beugungsbild erzeugen, perfekt gegeneinander ausgerichtet sein müssen. Es gibt demnach einen Mechanismus, der zum einen die geladenen Flächen stabilisiert, zum anderen die plättchenartigen Untereinheiten stapelt und dabei die Orientierung erhält. Wie oben ausgeführt ist es naheliegend, daß NH_4^+ -Ionen dabei eine wichtige Rolle spielen.

Bei der Gasdiffusionsmethode diffundieren CO_2 und NH_3 in Lösung; der pH-Wert steigt dabei sehr schnell (in ca. 30 min.) von 5,8 auf 9,5 an. Mit einem pKa von 9,25 (bei 25°C) liegt NH_3 somit hauptsächlich als NH_4^+ vor, welches als positiv geladene Spezies mit negativ geladenen Flächen des Kristalls wechselwirken, sich also an diese anlagern und sie stabilisieren kann. Eine solche Wechselwirkung ist in Übereinstimmung mit früheren Studien.^{86,87}

Die detaillierte Bildung der Untereinheiten ist schwer zu analysieren, da die einsetzende Trübung der Lösung (ca. 6 Stunden nach Reaktionsstart) zwar die Bildung von $CaCO_3$ anzeigt, dieses jedoch nur in geringer Konzentration vorliegt, so daß bei IR-Messungen in Lösung nur Wassersignale erhalten werden, und ein Isolieren dieser frühen Spezies auf Grund der geringen Menge und deren Instabilität nicht möglich ist. Unter dem Lichtmikroskop sind kleine spherische Partikel zu erkennen, die unter gekreuzten Polarisationsfiltern dunkel erscheinen, das heißt, eine isotrope Struktur haben, was für eine amorphe Phase spricht. Die Größe dieser Partikel ist schwer abzuschätzen, da sie beweglich sind. Unterhalb einer von der Konzentration und vom Brechungsindex abhängigen Größe von ca. 50 nm trüben die Partikel die Lösung nicht mehr. Es ist also denkbar, daß bereits vor Einsetzen der Trübung kleinere $CaCO_3$ -Partikel gebildet wurden. Es ist möglich, bewegliche Partikel mit einer Größe unterhalb ca. 1 μm , die am Lichtmikroskop optisch nicht mehr aufgelöst werden können, über ihre Streuung zu detektieren. Ihre Größe kann durch

das Tracking der Bewegungsbahnen einzelner Partikel ermittelt werden.⁹¹ Hier wurde auf diese Art der Größenbestimmung in den frühen Reaktionsstadien verzichtet, da SEM-Aufnahmen späterer Reaktionsstadien zeigen können, daß die Partikel bei ihrer Bildung maximal ca. 20 nm groß sind (s.u. Text und Abb. 5.6.).

Nach längerer Reaktionszeit (ca. 9-12 Stunden) sind auf Grund der gestiegenen $CaCO_3$ Konzentration IR-Messungen möglich. Sie zeigen die charakteristischen Banden für Vaterit (743 cm^{-1}) und ACC (1083 cm^{-1}), auch ein schwächerer Calcit-Peak (712 cm^{-1}) ist zu erkennen (evtl. als Artefakt eingeführt, s.o.). Dies läßt den Schluß zu, daß die Vaterit-Untereinheiten aus ACC-Precursoren gebildet werden, was typisch für die additiv-gesteuerte Kristallisation von $CaCO_3$ ist.^{92,93} In einem weiteren Schritt lagern sich die NH_4^+ -Ionen wie oben beschrieben auf die negativ geladenen exponierten Flächen. Dies führt zu einer Verlangsamung oder sogar Inhibierung des Wachstums in [001]-Richtung und somit zur Exposition der (001)/(00-1)-Flächen. Die daraus resultierende Bildung der sechseckigen, plättchenförmigen Vaterituntereinheiten und deren nachfolgende Anordnung zu den beobachteten Kristallen kann wie folgt erklärt werden: Gemäß der Debye-Hückel-Theorie für schichtartige Geometrien können Ladungen durch sehr dünne Schichten hinweg wechselwirken, d.h. bis zu einer bestimmten Dicke der Plättchen können sich Oberflächenladungen durch den Kristall „spüren“. Somit hätten gleiche Ladungen auf den gegenüberliegenden exponierten (001)/(00-1)-Flächen energetisch ungünstige abstoßende elektrostatische Wechselwirkungskräfte zur Folge⁹⁴ so daß diese entgegengesetzte Ladungen tragen müssen.⁹⁵ Es ist davon auszugehen, daß die NH_4^+ -Ionen nicht vollständig bis zum Ladungsausgleich auf den negativ geladenen (001)/(00-1)-Flächen der Vateritkristalle adsorbieren. Somit resultiert eine negative Gesamtladung dieser Flächen. Folglich muß die gegenüberliegenden Flächen positiv geladen, das heißt es müssen die Calcium-Ionen exponiert sein. Dies ist veranschaulichend in Abbildung 5.5 dargestellt.

Durch diese Asymmetrie der Ladungen entstehen dipolare Felder,^{38,95} so daß sich entgegengesetzt geladene Flächen elektrostatisch anziehen und sich die Plättchen zu Multilagen stapeln,³⁸ wobei sie kristallographisch perfekt ausgerichtet sind, wie die Elektronenbeugungsbilder (s. Abb. 5.4b und c) beweisen. Diese Schichtstruktur ist in der Seitenansicht der linsenförmigen Partikel auf SEM-Aufnahmen (s. Abb 5.6 links) deutlich zu erkennen. Bei stärkerer Vergrößerung wird ein weiteres Merkmal dieser Partikel enthüllt: Sie haben

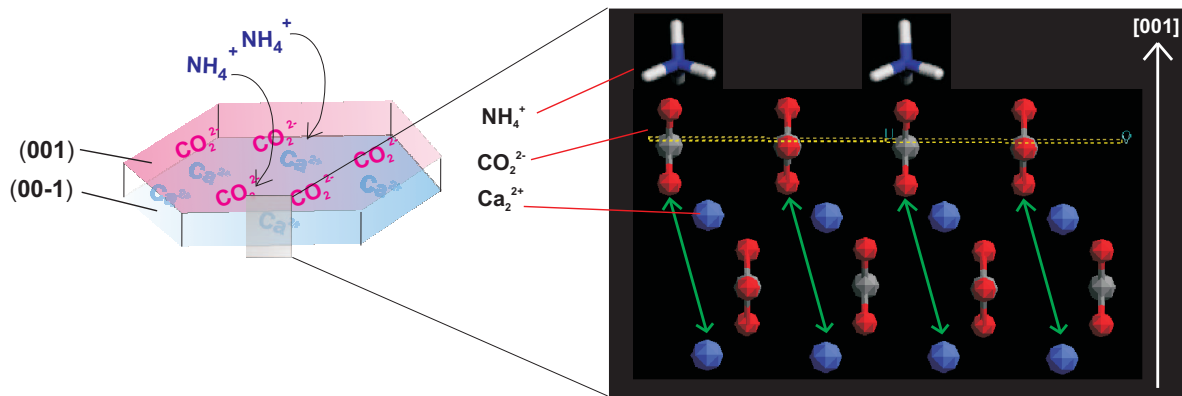


Abbildung 5.5: Darstellung der sechseckigen „Vaterituntereinheiten“. Links: sechseckiger Vateritkristall mit exponierten (001)/(00-1)-Flächen und NH_4^+ -Adsorption. Rechts: Vergrößerung des Querschnitts durch den Kristalls. Die [001]-Richtung befindet sich in der Papierebene, die (001)/(00-1)-Flächen senkrecht dazu (gelb angedeutet). Bei sehr dünnen Schichten „spüren“ sich Ladungen durch den Kristall, so daß auf Grund elektrostatischer Abstoßung nicht beide Flächen die gleiche Ladung tragen können. Die positiv geladenen NH_4^+ -Ionen adsorbieren auf den negativ geladenen Flächen und inhibieren so deren Wachstum. Da die Adsorption nicht vollständig erfolgt, resultiert dennoch eine negative Gesamtladung. Folglich muß die gegenüberliegende Fläche positiv geladen, also die Calcium-Ionen exponiert sein. Die Adsorption von NH_4^+ auf beiden Flächen ist also nicht möglich, da dies abstoßenden Kräfte zwischen den exponierten, dann beide negativ geladenen Flächen zur Folge hätte.

eine rauhe, aus Nanopartikeln von ca. 20 nm bestehende Oberfläche (s. Abb. 5.6 rechts). Es ist denkbar, daß auf Grund des steigenden Dipolmoments zum einen die Dicke der

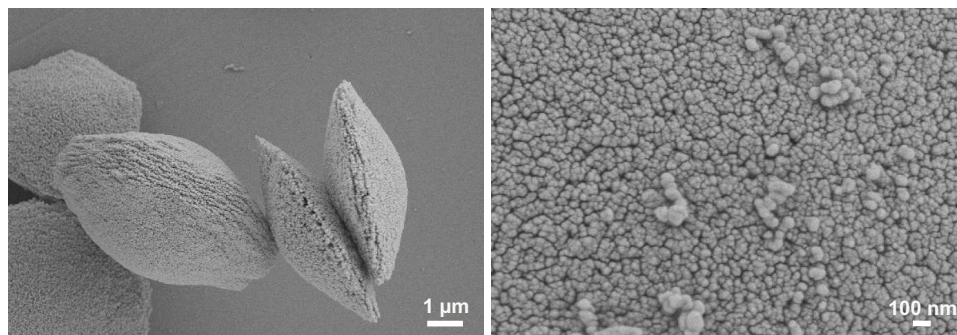


Abbildung 5.6: SEM-Aufnahme von Kristallen aus einer 20 mmol/l $CaCl_2$ -Lösung nach 18 Stunden; links: Seitenansicht, rechts: Rauigkeit der Oberfläche bei stärkerer Vergrößerung

Kristalle begrenzt und einheitlich ist,³⁸ zum anderen ihre Anziehung auf die amorphen Precursor mit fortschreitendem Wachstum durch ein in den Precursoren induziertes Dipolmoment so stark wird, daß sich die Precursor gemäß der Feldlinien des Dipols auf ihrer Oberfläche anlagern, wodurch die Partikel ihre linsenförmige Morphologie bekommen. Dies ist schematisch in Abbildung 5.7 dargestellt. Da die Precursor zum Zeitpunkt ihrer Bildung nicht größer sein können als bei der Anlagerung auf den Partikeln, läßt sich aus den SEM-Aufnahmen an dieser Stelle schließen, daß die Precursor zu Reaktionsbeginn eine maximale Größe von ca. 20 nm hatten (s.o.). Da die Partikel immer noch ein ein-kristallines Beugungsbild zeigen (s. Abb 5.4c) müssen die Precursor nach Anlagerung auf der Oberfläche entlang der kristallographischen Achse des Systems kristallisieren. Hierbei sind prinzipiell drei Möglichkeiten denkbar: Die erste ist die Auflösung und Rekristallisation der Precursor auf der Oberfläche. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da in diesem Fall keine Nanopartikel mehr auf der Oberfläche der Kristalle auszumachen sein sollten. Die zweite und dritte Möglichkeit sind sich sehr ähnlich und mit den vorliegenden Daten nicht voneinander zu unterscheiden: Die ACC-Precursor kristallisieren kristallographisch ausgerichtet auf der Oberfläche der Kristalle, wobei entweder sowohl die c-Achsen ([001]-Richtung) als auch die a- und b-Achse bereits zum Kristall ausgerichtet sind, oder nur die c-Achse ausgerichtet ist und die parallele Ausrichtung der a- und b-Achsen zum Kristall durch einen anschließenden „oriented attachment“-Mechanismus erfolgt. Ein solcher

„Lock-in“-Mechanismus ist für Übergangsmetalle, nicht aber für $CaCO_3$ bekannt^{30,32,96} und zeigt eine neue Route der Kristallisation und Morphologiebildung von $CaCO_3$, genauer ähnelt er der dreidimensionalen Anordnung wie für SnO_2 beobachtet.³³

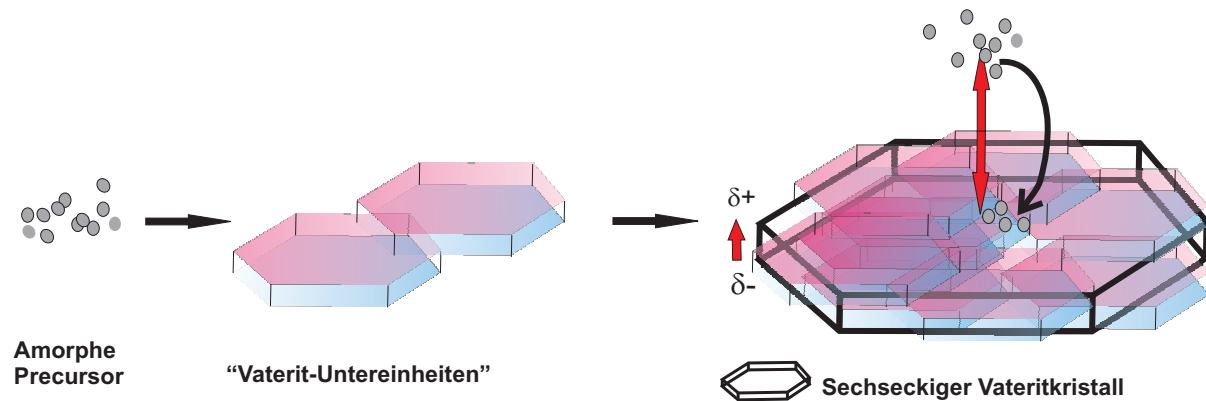


Abbildung 5.7: Durch die Stapelung der Vaterituntereinheiten steigt das Dipolmoment der sechseckigen Kristalle, so daß sie ein Dipolmoment in den amorphen Precusorn induzieren und diese anziehen. Die Precursor kristallisieren entlang der kristallographischen Achse des Systems.

Letzteres ist nicht für die rosettenförmigen Kristalle zutreffend. Sie sind wesentlich größer und weisen eine glatte Oberfläche auf, sind aber wie die kleineren sechseckigen Kristalle aus plättchenförmigen Untereinheiten aufgebaut. Da sie bei kleineren $CaCl_2$ -Konzentrationen, also geringerer Übersättigung, gebildet werden, ist die Nukleationsrate kleiner. Es ist anzunehmen, daß ihre Überstruktur langsamer und thermodynamisch kontrollierter, somit also weniger unter kinetischer Kontrolle, entsteht, so daß die Untereinheiten sich in einem bemerkenswerten Selbstanordnungs-Prozeß anordnen können, ohne kleinere Precursor-Nanopartikel anzulagern. Es ist anzunehmen, daß die Anordnung der Untereinheiten von den Feldlinien der Dipolfelder des wachsenden Kristalls bestimmt wird.⁹⁵ Ein Einfluß von Dipolfeldern wurde bereits bei Fluorapatit-Gelatine-Kompositen diskutiert.³⁵ Über einen längeren Zeitraum wandeln sich alle beobachteten Strukturen in Calcit-Rhomboeder um. Dies geschieht nur in Lösung über Auflösung und Rekristallisation: im getrockneten Zustand hingegen sind die Partikel langfristig stabil. Weiterhin läßt sich aus der Tatsache, daß eine Umwandlung in Lösung stattfindet, folgern, daß die Stabilisierung durch NH_4^+ -Ionen tendenziell weniger stark ist als die durch Makromoleküle.^{85,97} Offensichtlich ist dabei die in den Rhomboedern exponierte ungeladene Calcit-(104)-Fläche stabiler als eine durch NH_4^+ -Ionen stabilisierte, geladene Calcit-(001)/(00-1)-Fläche.

Die hier beobachteten Überstrukturen werden durch Transformation auf der Mesoskala gebildet (Aggregation und anschließende Kristallisation der amorphen Nanoprecursor, Anordnung der Unterstrukturen) und machen in Übereinstimmung mit anderen Studien⁹⁸ deutlich, daß kein epitaktischer Mechanismus⁸⁸ bzw. die Zugabe von Additiven für die Bildung und Stabilisierung thermodynamisch metastabiler Phasen unter Umgebungstemperatur und -druck nötig ist, weswegen bei der additivgesteuerten Kristallisation sorgfältige Kontrollexperimente nötig sind. Überdies konnten komplexe Morphologien durch Selbstanordnungsprozesse erzeugt werden. Dies wirft die Frage auf, ob ähnlich einfache Mechanismen auch in der Biomineralisation denkbar sind, um die Vielfalt und Komplexität der Biomineralien hervorzubringen, im Gegensatz zu spezifischen Biomolekülwechselwirkungen.

5.1.2 Kitanomethode

Bei der Kitano-Methode sind die Ergebnisse stark von den Ausmaßen des Reaktionsgefäßes abhängig. In Schnappdeckelgläschen von 10-30 ml Volumen werden nach 2 Tagen Calcit-Rhomboeder gebildet, während in Gefäßen mit einem Fassungsvermögen von ca. 500 μ l nadelförmige Kristalle beobachtet werden. Es ist anzunehmen, daß einerseits Oberflächeneffekte andererseits die Geschwindigkeit der CO_2 -Bildung und -Entweichung, welche von der Höhe der Lösung im Gefäß (also auch der Gefäßgröße) und Faktoren wie dem CO_2 -Partialdruck in der Umgebung und der Temperatur abhängt, eine extrem wichtige Rolle spielen.

Da sich diese Methode als ungünstig für die Remineralisation der Perlmuttermatrix erwiesen hat (s. Kapitel 5.5), wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

5.1.3 Double Jet-Methode mit Durchflußzelle

Bei der Double Jet Methode ist es möglich, schnell amorphes $CaCO_3$ zu erzeugen. Ebenso erweist sie sich als sehr reproduzierbar. Um die Schnelligkeit und Reproduzierbarkeit der Double Jet-Methode zu nutzen, jedoch ständig frisch Precursorlösung konstanter Konzentration zu generieren und „alte“ Lösung zu entfernen, wurde eine Durchflußzelle konstruiert (s. Kapitel 4.1). Über die Kristallisation von $CaCO_3$ mittels einer Durchfluß-

zelle sind erst wenige Studien bekannt: sie wurde bereits zur Synthese perlmuttartiger Dünnschichten mittels ACC-Precursor²⁵ verwendet und hier erfolgreich für die Remineralisierung der Perlmuttermatrix eingesetzt (s. Kapitel 5.5).

5.2 Auswahl des Biominerals

Um das am besten für die Remineralisationsexperimente geeignete Biomineral zu ermitteln, wurden verschiedene Biomineralien näher in Hinsicht auf Eigenschaften wie Handhabbarkeit oder Demineralisierungszeiten untersucht: Schwämme, Zähne, Minischweinknochen und Perlmutter.

Knochen und Zähne

Knochen und Zähne sind sehr komplexe Biomineralien, ihre Struktur ist im Vergleich zum Perlmutter wesentlich komplizierter. In Knochen ist die von der Matrix gegebene Mikroumgebung in der Größenordnung von ca. $50\text{-}100 \times 25 \times 4 \text{ nm}^3$, so daß eine Beobachtung mit dem Lichtmikroskop, welches eine schnelle und einfache erste Analyse ohne Trocknung ermöglichen kann, ausgeschlossen ist. Die Auswahl der Calciumphosphatsysteme wurde daher auf Zähne beschränkt, zumal diese schon als eingebettete Schnitte zur Verfügung standen. Die Demineralisierung der Zähne erwies sich als äußerst zeitaufwendig. Es ist anzunehmen, daß die Diffusion in der relativ kompakten Matrix vor allem bei großen Proben sehr langsam ist und zu übermäßig langen Demineralisationszeiten führt. Zudem sind die Schnitte zu dick und/oder trüb, um mit dem Transmissionslichtmikroskop untersucht zu werden, so daß bei ersten Analysen kein Unterschied zwischen de- und remineralisierten Proben erkannt werden konnte. Wird ein Auflichtmikroskop verwendet, können lediglich Informationen von der Probenoberfläche erhalten werden, während die Remineralisation jedoch im Innern der Matrix stattfinden muß. Auch im WAXS-Diffraktogramm wurden keine charakteristischen Calciumphosphatpeaks nach den Mineralisierungsexperimenten gefunden. Es ist natürlich möglich, die Größe der Schnitte zu reduzieren, was gleichzeitig eine bessere Diffusion gewährleisten würde, jedoch würde dies zu einer schlechten Handhabbarkeit der Proben führen.

Schwämme

Der Schwamm *Astroclera Willeyana*⁹⁹ stand als Pulver zur Verfügung. Dieser Schwamm bildet spherulitsche Kristalle mit einem asternförmigen organischen Matrixgerüst. Die Demineralisierung mußte mit Essigsäure steigender Konzentration durchgeführt werden, um die Matrix durch die CO_2 -Entwicklung beim Lösen des $CaCO_3$ nicht zu zerstören. Dennoch konnte ihre Struktur nicht völlig erhalten werden: am Lichtmikroskop wurden nur Fragmente der Astern beobachtet (s. Abb. 5.8) In ersten Experimenten konnte nicht

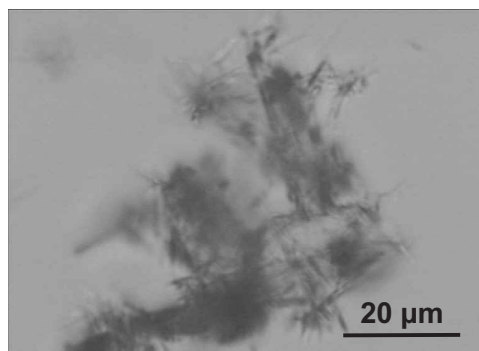


Abbildung 5.8: LM-Aufnahme der demineralisierten Matrix. Diese besteht aus einer empfindlichen asterförmigen Matrixstruktur, die während der Demineralisierung nicht erhalten werden konnten, so daß nur Fragmente isoliert werden können.

festgestellt werden, ob die organische Matrix in irgendeiner Weise einen Einfluß auf die Kristallisation ausübt, da ihre filigrane und weiche Struktur von den in der Lösung unspezifisch gebildeten Kristallen eingeschlossen wurde und nicht mehr separiert werden konnte. Es ist jedoch anzunehmen, daß sie von den Kristallen deformiert worden ist bzw. völlig kollabiert ist. Ein weiteres Problem stellt die geringe Menge an Matrix nach der Demineralisation dar.

Perlmutter

Das Perlmutter der Seeschnecke *Haliothis laevigata* läßt sich leicht, schnell und vollständig demineralisieren (s. Kapitel 5.4.2). Die verbleibende unlösliche organische Matrix ist mechanisch relativ stabil und läßt sich aufgrund ihrer makroskopischen Dimensionen gut handhaben. Zudem kann sie gut mit dem Transmissionslichtmikroskop untersucht werden. Ein weiterer Vorteil ist, daß Perlmutter im Vergleich zu Knochen, Schwämmen und

Zähne eine relativ einfache, sehr gut identifizierbare Struktur hat und daß die durch die Matrix gegebene Mikroumgebung wesentlich größer als beispielsweise in Knochen ist. Da die Demineralisierung (im Gegensatz zu den Zähnen) schnell und vollständig abläuft und die Matrix sowohl stabil ist als auch im makroskopischen Maßstab präpariert und eine potentielle Remineralisierung mit dem Lichtmikroskop erkannt werden kann (im Gegensatz zur Schwamm- und Knochen-Matrix), wurde Perlmutter als Modellsystem für die Remineralisierung ausgewählt.

5.3 Synthese von Aragonit

Die mineralische Komponente von Perlmutter ist Aragonit, eine unter Umgebungsbedingungen metastabile Modifikation von $CaCO_3$. Ein Schritt auf dem Weg zur Retrosynthese von Perlmutter ist es daher, diese metastabile Modifikation *in vitro* herzustellen. Die Bildung von Aragonit kann durch Magnesiumzugabe im Überschuß erzwungen,^{100–103} auf biomimetische Weise, zum Beispiel mit extrahierten Molluskschalenproteinen^{60,90} oder auf anderen Wegen wie unter Monolayern,^{104,105} an einer flüssig/flüssig Grenzfläche¹⁰⁶ oder als metastabiles Intermediat¹⁰⁷ induziert werden. Es ist bis jetzt jedoch noch nicht gelungen, Aragonit ohne Magnesium auf einfache Weise nur mit leicht verfügbaren und billigen Zusätzen zu synthetisieren. Daher erscheint es vielmehr sinnvoll, einen einfachen Weg zur Aragonitbildung zu suchen und diesen bei der Remineralisierung der Matrix zu nutzen, als die bekannten, ohnehin aufwendigeren Methoden durch die Zugabe der unlöslichen Matrix und mit der Bedingung, daß Aragonit innerhalb dieser gebildet werden muß, weiter zu erschweren.

Durch Verwendung eines sphärischen Triblockcopolymer-Mikrogels ist es hier gelungen, komplexe Aragonitstrukturen unter Umgebungsdruck- und -temperatur zu synthetisieren.¹⁰⁸ Doppelt hydrophile Blockcopolymere sind bereits für die Beeinflussung der Kristallisation unter biomimetischen Bedingungen bekannt.^{109,110} Bei den hier eingesetzten Mikrogelpartikeln handelt sich um Poly-(Diethylaminoethyl-Methacrylat)-b-poly-(N-Isopropylacrylamid)-b-poly-(Methacrylsäure) (PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMMA), welches einen mit 1,3-Diisopropylbenzol vernetzten Kern aus Polymethacrylsäure hat. Diese Partikel haben sowohl positive Ladungen im äußeren PDEAEMA-Block als auch negati-

ve im inneren PMAA-Block. Zwischen diesen beiden Blöcken befindet sich ein PNIPAM-Block, der bei Raumtemperatur hydrophil ist und für die sterische Stabilität der Partikel sorgt (s. u.). Die Kombination dieser drei Blöcke wurde ausgewählt, da zum einen bekannt ist, daß PMAA Calcium-Ionen bindet, zum anderen Molluskenschalenproteine weniger sauer als bisher angenommen zu sein scheinen,¹⁰ so daß zusätzlich der positive PDEAEMA-Block eingesetzt wurde. Der mittlere PNIPAM-Block verhindert dabei die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Blöcken. Die Partikel haben vor allem durch den PMAA-Block die Eigenschaften eines Mikrogels. So sind sie quellfähig: ihre Größe beträgt in Wasser ungefähr 1 μm , im getrockneten Zustand zwischen 170 und 220 nm.¹¹¹ Für die Synthese der Partikel sind nur billige und allgemein erhältliche Chemikalien nötig.¹¹¹

Werden diese Partikel in nur sehr geringer Konzentration (10^{-4} mg/ml) als Additive bei der Präzipitation von CaCO_3 mit der Gasdiffusionsmethode ($0,01\text{mol/l CaCl}_2$) verwendet, zeigen SEM-Aufnahmen nach 12 Tagen neben einigen wenigen Rhomboedern Überstrukturen in Form von „garbenbündelförmigen“ Kristallen.^{104–106} (s. Abb. 5.9). Diese haben eine sehr einheitliche Morphologie mit einer schmalen Größenverteilung um ca. 60 μm . Sie bestehen aus Aragonit, wie aus WAXS-Diffraktogrammen und IR-Spektren hervorgeht (Spektren hier nicht gezeigt). Die Spektren zeigen außerdem kleine Mengen an Calcit, was zu erwarten ist, da in den Proben einige Rhomboder, also thermodynamisch stabiles Calcit, gefunden wurden. In Blindexperimenten ohne Additiv unter sonst gleichen Bedingungen werden ausschließlich Calcitrhomboeder gefunden. Es ist daher zu schließen, daß die „garbenbündelartigen“ Aragonitkristalle unter dem Einfluß des PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMAA gebildet werden und vor allem wegen dessen sehr geringer Konzentration kleine Mengen an Calcitrhomboedern frei nukleiert werden können.

Die Bildung der Aragonit-Überstrukturen wurde näher analysiert: Bereits die Tatsache, daß alle Kristalle mit der unteren Seite auf einem in die Reaktionslösung gelegten Glas anhaftend gefunden (s. Abb. 5.10 links) und sie verstärkt auf einem senkrecht in die Lösung gestellten Glasstück gebildet werden, deutet darauf hin, daß sie heterogen an der Glasoberfläche nukleiert werden. In Übereinstimmung damit zeigen abgelöste bzw. heruntergefallene Kristalle eine flache Unterseite, welche zudem in der Mitte ein Loch von ca. 1 μm Durchmesser aufweist (s. Abb. 5.10 rechts). Dies legt den Schluß nahe, daß dort zuvor die Position eines PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMAA-Mikrogel-Partikels

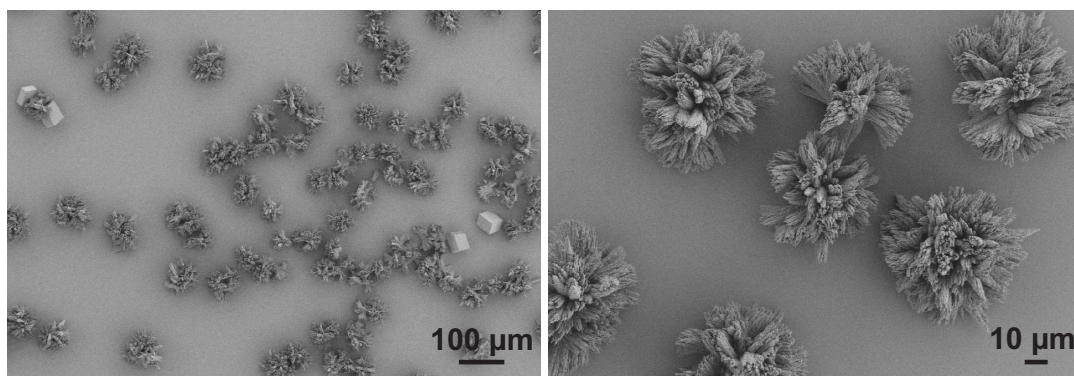


Abbildung 5.9: SEM-Aufnahmen der garbenbündelartigen Aragonitkristalle, nach 12 Tagen mit sehr geringen Konzentrationen an PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMAA als Additiv in der Gasdiffusionsmethode gebildet (s. Text). Es sind einige Rhomboeder zu erkennen (links), die vermutlich frei in Lösung nukleiert werden.

war, welches auf dem Glas adsorbiert ist und den Kristall auf der Glasoberfläche nukleiert hat. Die Affinität der Mikrogel-Partikel zu Glasoberflächen kann leicht gezeigt werden: Wird ein Glasstück in eine $CaCl_2$ -Mikrogelpartikel-Lösung entsprechender Konzentration gegeben, befinden sich auch nach intensivem Waschen Mikrogelpartikel auf dem Glas, wie auf SEM-Aufnahmen erkennbar ist. Dies ist plausibel, da Glasoberflächen negativ (hier durch Adsorption positiv geladener Farbstoffe und Latexpartikel überprüft) und die äußere Hülle der PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMAA-Partikel positiv geladen ist. Somit erfolgt die Nukleation je eines Aragonit-Kristalls heterogen an je einem Mikrogel-Partikel auf der Glasoberfläche, während die wenigen Calcitrhomboeder frei in Lösung homogen nukleiert werden. Die Überstrukturen sind aus 500 nm bis einige μm langen plättchenartigen Untereinheiten aufgebaut. Abbildung 5.11 zeigt TEM-Aufnahmen dieser Baueinheiten und ihre jeweiligen Elektronenbeugungsspektren (a,b). In beiden Fällen ist der Kristall entlang der [001]-Achse ausgedehnt. HRTERM-Aufnahmen (c,d) und ihre Powerspektren (e,f) zeigen zum einen die perfekte Kristallinität im Inneren der Untereinheiten, zum anderen ein neues, sehr interessantes Merkmal: Die Plättchen sind von einer ca. 5 nm dicken amorphen Schicht ummantelt. Diese Schicht beginnt unter dem Elektronenstrahl zu kristallisieren, besteht also aus amorphem $CaCO_3$ (ACC). Eine solche ACC-Schicht wurde ebenfalls in den Aragonitplättchen des in dieser Arbeit untersuchten Perlmutter (s. Kapitel 5.4.1) entdeckt.¹¹² Ihre Funktion ist unbekannt, sie könnte jedoch

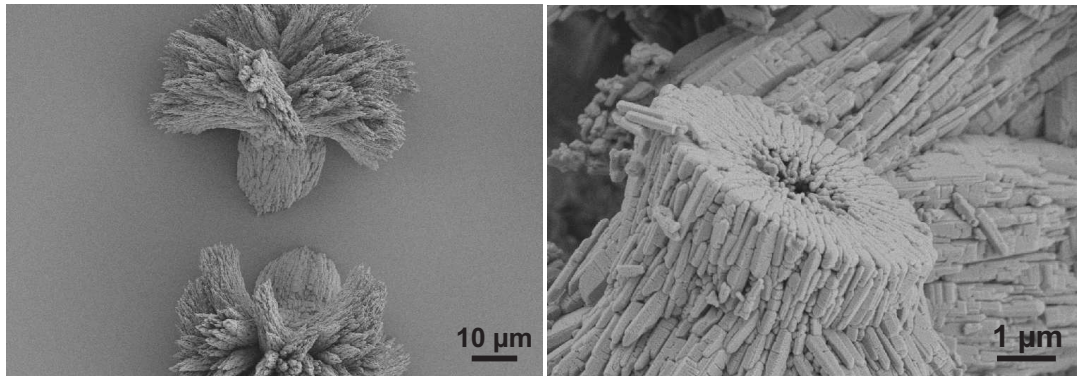


Abbildung 5.10: Die Aragonitkristalle werden vermutlich an der Glasoberfläche nukleiert, da sie immer mit der Unterseite auf dem Glas anhaftend gefunden werden (links). Abgelöste Partikel zeigen jeweils ein Loch in der Unterseite, dessen Größe mit der der Mikrogelpartikel übereinstimmt (rechts).

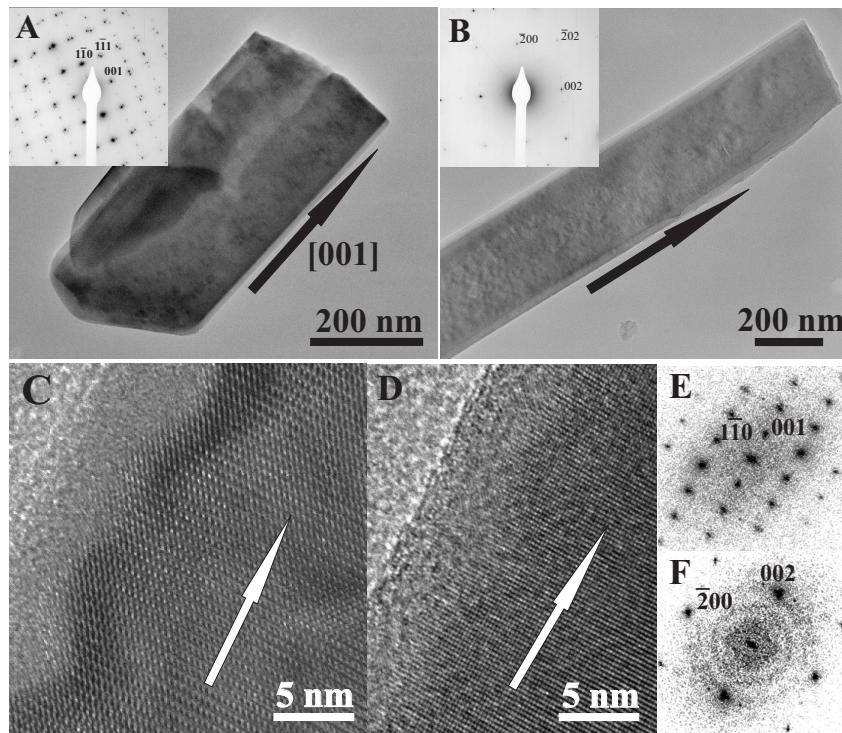


Abbildung 5.11: TEM-Aufnahmen der Untereinheiten der Aragonitkristalle mit jeweiligen Elektronenbeugungsbildern (a,b, Einschub) und HRTEM-Aufnahmen (c,d) mit den dazugehörigen Powerspektren (e,f).

als eine „Schutzschicht“ wirken und die Rekristallisation des Aragonits in Lösung verhindern. Es ist dabei denkbar, daß eine ACC-Schicht ein häufig verwendeter Mechanismus zur Stabilisierung von Aragonit ist. Dies muß jedoch noch intensiv an vielen Systemen geprüft werden (s. auch Untersuchung von Perlmutter, Kapitel 5.4.1).

Um den Einfluß der PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMAA-Partikel näher zu untersuchen, wurde deren Konzentration bei konstanter $CaCl_2$ -Konzentration variiert. Mit zunehmender Konzentration werden die Kristalle zunächst heterogener, bis bei 1 mg/ml PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMAA die Mikrogelpartikel unspezifisch in amorphe $CaCO_3$ -Strukturen eingeschlossen werden (s. Abb. 5.12 links). Da in diesem Fall die $CaCl_2$ -Konzentration relativ zu der der Mikrogelpartikel klein ist, ist es möglich, daß nicht genügend Material pro Partikel für die Ausbildung größerer Strukturen zur Verfügung steht. Somit könnten also diese in Mineral eingeschlossenen Polymerpartikel den frühen Wachstumsstadien der Aragonitüberstrukturen entsprechen oder ähneln, bei welchen durch die wesentlich kleinere PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMAA-Konzentration mehr Material pro Mikrogelpartikel zur Verfügung steht. Die Tatsache, daß die Mikrogelpartikel auch bei relativ kleiner $CaCl_2$ -Konzentration von der Mineralphase eingeschlossen werden, deutet übereinstimmend mit den Löchern in der Unterseite der Aragonitkristalle darauf hin, daß die Mikrogelpartikel Ionen „ansammeln“ und die Mineralphase nukleieren, so daß sie von dieser umhüllt werden. Nur wenn dann noch genügend Material zur Verfügung steht, kann weiteres Wachstum, also die Bildung der beobachteten Überstrukturen, stattfinden. Eine Wechselwirkung zwischen Calciumionen und Mikrogelpartikeln wurde durch Untersuchungen mittels DLS (Dynamische Lichtstreuung) bestätigt: Der hydrodynamische Radius sinkt von 1000 nm in Wasser¹¹¹ auf 800 nm in 0,01 mol/l $CaCl_2$, da die abstoßenden Ladungen durch die Ionen abgeschirmt werden. Ein in den Gasdiffusionsexperimenten parallel dazu auftretender gegenläufiger Effekt ist der Anstieg des Partikelradius mit zunehmender Abstoßung der negativen Ladungen im PMAA-Kern aufgrund des pH-Anstiegs auf 9,5. Eine *in situ*-DLS-Messung zur Ermittlung der Partikelgröße ist hierbei nicht möglich, da mit dem pH-Anstieg die $CaCO_3$ -Präzipitation verbunden ist, welche die Messung stört. In auf pH 9.5 eingestellter NaOH jedoch beträgt der hydrodynamische Radius der Partikel 1200 nm.

Die zwitterionischen Partikel wirken offensichtlich als „Ionenschwamm“ und können große

Mengen an negativ und positiv geladenen Ionen binden. Ist die Kapazität erschöpft, wird

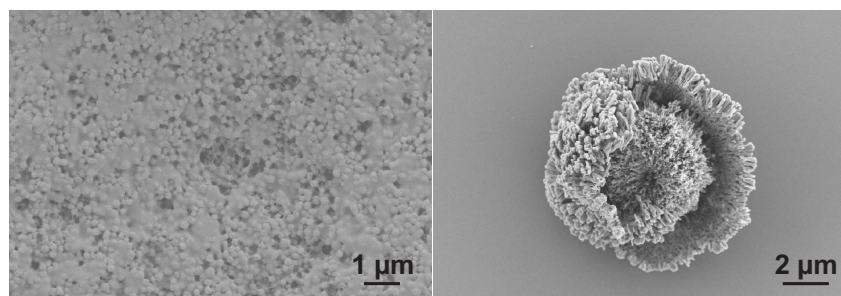


Abbildung 5.12: Bei hohen Konzentrationen der Mikrogelpartikel (1 mg/ml) werden diese von amorphen unspezifischen Strukturen eingeschlossen. Vermutlich ist nicht genügend Mineral vorhanden, um die Überstrukturen auszubilden. Dies kann also die Vorstufen der Aragonit-Überstrukturen darstellen (links). Stadien, in denen die Überstrukturen bei niedrigen Mikrogelpartikel-Konzentrationen zu entstehen beginnen, zeigen, daß diese radial wachsen, wobei die Untereinheiten teilweise schon zu erkennen sind (rechts, äußerer Rand des Partikels).

Aragonit nukleiert, möglicherweise über ACC als Vorstufe, wie Abbildung 5.12 links andeutet (s. Text oben). Frühe Stadien der Überstrukturen zeigen, daß diese vom Nukleus aus radial wachsen und dabei die Untereinheiten ausbilden (s. Abb. 5.12 rechts, äußerer Rand).

Um die Stabilisierung des Aragonits zu erklären und den Einfluß der PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMAA-Triblockpartikel näher zu spezifizieren, wurden die Funktionen der verschiedenen Blöcke näher untersucht. So kann gezeigt werden, daß der mittlere PNIPAM-Block die Partikel in Lösung stabilisiert,¹¹¹ obwohl potentiell eine destabilisierende Säure-Base-Wechselwirkung zwischen dem negativ geladenen PMAA-Kern und den positiv geladenen äußeren PDEAEMA-Gruppen denkbar ist. So sind die Triblockpartikel wasserlöslich und stabil. Das Diblock-Copolymer PDEAEMA-b-PMAA jedoch, das keinen PNIPAM-Block hat, ist instabil in Wasser: Die Partikel sind wasserunlöslich, da die beiden Blöcke miteinander wechselwirken und so einen Polyelektrolytkomplex bilden. Offensichtlich kann also im Falle der Triblockpartikel der mittlere PNIPAM-Block die PMAA- und PDEAEMA-Block voneinander abschirmen, so daß diese eine kolloidal stabile Lösung bilden können. Zusätzlich kann die Vernetzung des PMAA-Kerns die Mobilität der Säuregruppen und somit eine Wechselwirkung einschränken.

Wird anstelle des Triblock-Polymers nur das PDEAEMA-Homopolymer bei der Kristallisation verwendet, werden den oben beschriebenen ähnliche Überstrukturen gebildet, wenn

dieses in hoher Konzentration (1 mg/ml) zugesetzt wird. Bei geringerer Konzentration wird Calcit nukleiert, dessen Morphologie mit abnehmender Konzentration immer mehr die eines Rhomboeders annimmt, bis dieses bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml die nahezu einzige Morphologie darstellt. Dies deutet darauf hin, daß eine hohe lokale Polykationenkonzentration nötig ist, damit Aragonit nukleiert werden kann: Im Falle Triblockpolymers ist dies auch bei kleinen Konzentrationen alleine durch dessen Struktur gegeben, da seine äußere Hülle aus PDEAEMA besteht und dieses somit lokal hochkonzentriert vorliegt. Dadurch und durch den negativ geladenen Kern wird wiederum die Ionenkonzentration lokal erhöht und Aragonit nukleiert, das, wie aus SEM-Aufnahmen hervorgeht (s. Abb. 5.9, 5.10, 5.12 rechts), eine radiale Struktur aus Plättchen bildet. Diese wächst vom Mikrogelpartikel aus weiter zu der garbenbündelartigen Aragonitüberstruktur. Da diese Kristalle viel größer sind als die Mikrogelpartikel und keine weiteren Polymere in Lösung sind, ist es denkbar, daß die Plättchen durch Aragonitbrücken durch die ACC-Schicht hindurch miteinander verbunden sind, die es ermöglichen, daß auch noch in großer Entfernung vom nukleierenden Mikrogelpartikel Aragonit in kristallographischer Orientierung gebildet wird. Dies ist ein Mechanismus, der auch *in vivo* erklären könnte, wie in Biomineralien große Mineralanteile von verschwindend geringen Mengen an organischen Molekülen modifiziert werden können.

5.4 Perlmutter und Perlmuttermatrix

5.4.1 Perlmutter

Das Perlmutter der Seeschnecke *Haliothis laevigata* wurde vor der Demineralisierung charakterisiert. Das WAXS-Diffraktogramm gemahlener Perlmutter zeigt die charakteristischen Peaks für Aragonit (s. Abb 5.13). Die thermogravimetrische Analyse ergibt einen Anteil an organischer Matrix von ca. 4.2 wt%. Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur (vgl. Kapitel 2.3) überein. Neben den bisher bekannten Strukturmerkmalen wurden jedoch zwei weitere gefunden, die bisher trotz zahlreicher ausführlicher Studien an Perlmutter^{17,54,57-59} noch nicht erwähnt wurden.

Die in der Literatur beschriebene Schichtstruktur aus ca. 500 nm dicken Aragonitplättchen

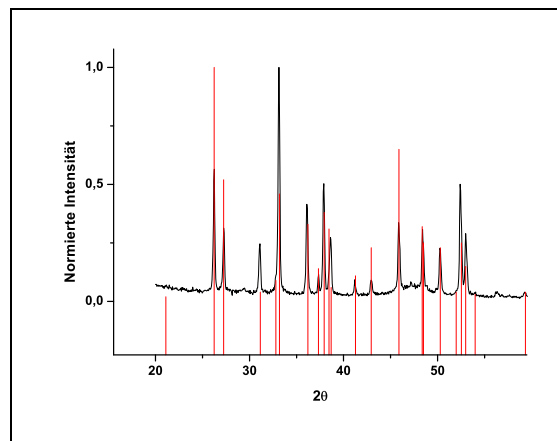


Abbildung 5.13: WAXS Pulver-Diffraktogramm gemahlene Perlmutter im Vergleich zum Diffraktogramm reinen Aragonits (rote Linien).

und organischer Matrix ist auf SEM- und TEM-Aufnahmen von Perlmutterbruchkanten bzw. -dünschnitten deutlich erkennbar, ebenso die Unebenheiten („Nanoasperities“) auf den Plättchen (s. Abb. 5.14 rechts, Einschub) Die organische Matrix ist auf den TEM-

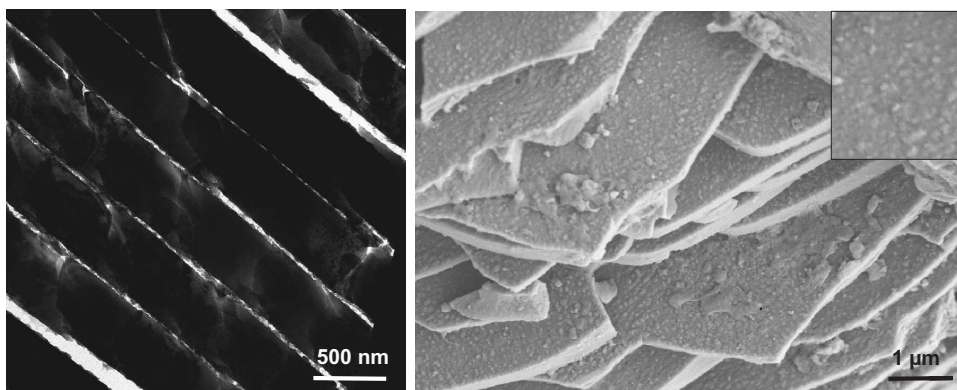


Abbildung 5.14: TEM (links) und SEM-Aufnahmen (rechts) von Perlmutterdünschnitten bzw. -bruchkanten zeigen die Schichtstruktur von Perlmutter und die Nanounebenheiten auf den Plättchen (rechts, Einschub)

Aufnahmen als weniger elektronendichtes und damit helleres Material zwischen den elektronendichten Aragonitschichten abgebildet (s. Abb. 5.14 links).

Überraschenderweise existieren neben dieser kompakten Struktur auch Bereiche, in denen der Raum zwischen den Matrixschichten nicht vollständig mit Mineral ausgefüllt ist. Zwar ist über das Wachstum von Perlmutter in Gastropoden bekannt, daß je einige

Matrixlagen gebildet werden, bevor die Mineralphase nukleiert wird, doch erfolgt die Auffüllung der Matrixzwischenräume in einer pyramidenartigen Anordnung von kleiner werdenden Plättchen (s. Kap. 2.3, „stacks of coins“). Die TEM-Aufnahmen hier zeigen jedoch mehr oder weniger ungeordnet verteiltes Mineral, das keineswegs die Form von Plättchen hat. Auf Abbildung 5.15 ist ein solcher nicht vollständig mineralisierter Bereich mit Mineralstrukturen verschiedener Formen und Größen zu sehen, einige davon grob rechteckig, allerdings ohne gerade Kanten, andere haben eine aggregatartige Morphologie. Alle Strukturen sind in Kontakt mit den Matrixschichten. Es werden weder die für die nahezu einkristallinen Aragonitplättchen typischen geraden Kanten noch die glatten Flächen gefunden (links). Vielmehr ist bei stärkerer Vergrößerung zu erkennen, daß die Strukturen aus Nanopartikeln bestehen (rechts). Elektronendiffraktogramme dieser wenig mineralisierten zeigen Aragonit, in wenigen Fällen wird auch die Gegenwart von Calcit angedeutet. Solche Charakteristica können keine bei der Probenpräparation verursachten Artefakte sein. Wohl können Aragonitplättchen beim Schneiden brechen,

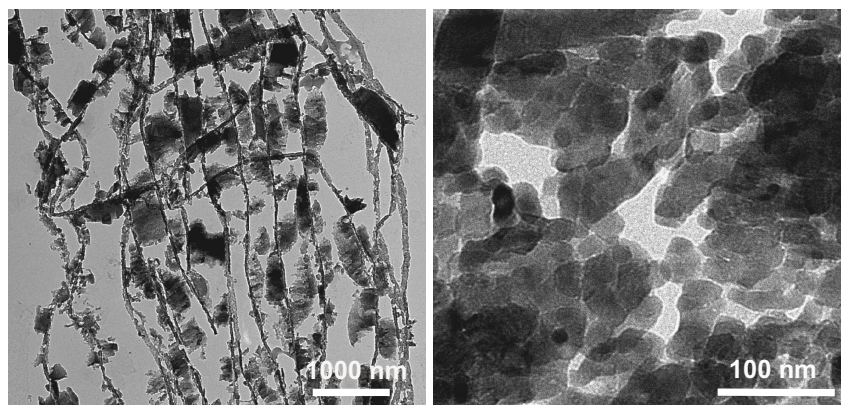


Abbildung 5.15: TEM-Aufnahmen wenig mineralisierter Bereiche von quer zu den Aragonitschichten geschnittenem Perlmutter. Die Matrixzwischenräume sind nicht vollständig mineralisiert. Die Mineralstrukturen bestehen aus Nanopartikeln (rechts).

doch sind sie in diesem Fall immer noch deutlich als solche zu erkennen und können auch nicht in aggregatförmige Strukturen oder Nanopartikel aufgespalten werden. Überdies ist es nicht möglich, daß dabei so große Bereiche entstehen, die völlig frei von Mineral sind. Um die Rolle dieser Beobachtungen im Perlmutter (Mineralspeicher, teilweise Auflösung/Zerstörung der Schale, Wachstum von Perlmutter über Nanopartikel, Baufeh-

ler,...?) zu klären, sind weitere ausführliche Studien nötig. Sie könnten beispielsweise ein Indiz für ein Wachstum der Perlmutterplättchen *via* Nanopartikel sein. Es ist überaus erstaunlich, daß das Phänomen in der Literatur nicht bekannt ist. Es wird in Kapitel 5 noch einmal aufgegriffen werden.

Hochauflösungstransmissionselektronenmikroskopie (HRTEM)- Untersuchungen enthüllen ein weiteres noch nicht beschriebenes Strukturmerkmal von Perlmutter. Abbildung 5.16 zeigt einen Ausschnitts aus der Oberflächenregion eines typischen Aragonitplättchens (wie in Abbildung 5.14 zu sehen). Die Plättchen sind von einer 3-5 nm dicken Schicht aus amorphen $CaCO_3$ ummantelt.¹¹² Die Grenzflächen kristallin/amorph und amorph/organische Matrix sind deutlich gewellt. Bei längerer Exposition des Elektronenstrahls beginnen sich Aragonitkristallite in der amorphen Schicht zu bilden. Durch die hier angewand-

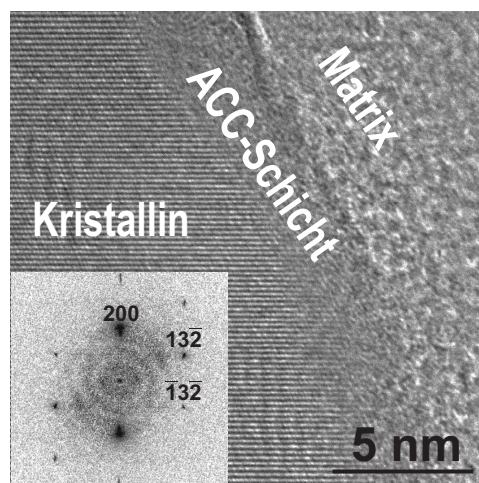


Abbildung 5.16: HRTEM-Aufnahme von Perlmutterdünnenschnitten: Ausschnitt der Oberflächenregion eines typischen Aragonitplättchens. Es befindet sich eine 3-5 nm dicke ACC-Schicht auf der Oberfläche, in der bei längerer Exposition unter dem Elektronenstrahl Aragonitkristallite entstehen. Der Einschub zeigt das Powerspektrum aus dem kristallinen Bereich des Plättchens, welches entlang der [023]-Richtung orientiert ist.

te Probenpräparation kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei den Beobachtungen um ein Artefakt handelt. Lediglich bei der sogenannten „Ion-milling“-Technik wurde die Bildung von amorphen Bereichen, die zudem größer und unregelmäßiger als die hier beschriebenen Schichten waren, beobachtet.³⁷ Eine organische Natur der Schicht kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da sie bei längerer Exposition des Elektronenstrahls zu

kristallisieren beginnt.

Zwar wurde amorphes $CaCO_3$ bereits als Precursor diskutiert,¹⁶ eine die Plättchen umgebende ACC-Schicht jedoch hat nicht nur die Erweiterung des Bildes von der Perlmutterstruktur zur Folge, sondern auch von dessen Bildungsmechanismus (s. Kapitel 2.3.1). Sollte die ACC-Schicht auf den Aragonitplättchen kontinuierlich sein, wie es auf HRTEM-Aufnahmen verschiedener Stellen der Fall ist, läßt sich dies mit dem Epitaxie-Modell nicht nur nicht vereinbaren, es widerlegt dieses sogar. Da keine Grenzfläche Matrix/kristallines Aragonit vorhanden ist, kann letzteres nicht durch Nukleationszentren auf der Matrixoberfläche induziert werden. Ein epitaktisches Wachstum von Perlmutter ist somit nur noch denkbar, wenn es wenige, sehr kleine kristalline Verbindungen zur Matrix durch die ACC-Schicht geben sollte, die zufällig nicht innerhalb der untersuchten Schnitte liegen. Mit Festkörper-NMR-Untersuchungen konnten diese Ergebnisse untermauert werden: Es wurde eine ACC-Phase detektiert, die nicht mit den Matrixproteinen wechselwirkt. Diese Studie wird bei Nassif *et al* näher beschrieben.¹¹²

Die wellenförmige Kontur der ACC-Grenzflächen liefert einen von sich häufenden Hinweisen^{16,17} daß Biomineralien sich nicht wie klassisch beschrieben durch ionisches Wachstum bilden, da dieses gerade Flächen erzeugt. Sie ist hingegen in Übereinstimmung mit dem Wachstum über Nanopartikel, beispielsweise ACC. Auch die sogenannten „Nanoasperities“ auf der Oberfläche der Plättchen weisen auf ein Nanopartikelwachstum hin (s. Kapitel 2.3).^{65,66}

Trotz der thermodynamischen Instabilität von ACC in Wasser ist die Langzeitstabilität amorpher Phasen in Biomineralien nicht ungewöhnlich.¹³ Es ist beispielsweise denkbar, daß die hier entdeckte ACC-Schicht im Perlmutter trotz einer Grenzfläche mit der kristallinen Phase durch Makromoleküle oder Ionen - seien diese Stabilisatoren oder Verunreinigungen - stabilisiert wird, die während des Kristallisationsprozesses ähnlich wie beim bekannten Zonenschmelzverfahren an den Rändern des Kristalls angesammelt werden.

Es stellt sich die Frage nach der Funktion der amorphen Schicht. Dafür sind weitere Studien nötig; dennoch sind bereits verschiedene Funktionen denkbar: Die amorphe Schicht könnte zum einen der Stabilisierung der energiereichen (001)-Fläche der Aragonitplättchen dienen, indem durch sie ein Gradient entsteht und so die energiereiche Oberfläche durch zwei weniger energiereiche ersetzt wird. Weiterhin könnte sie, ähnlich wie bei

Grenzflächen in natürlichen Polymerkompositen,¹¹³ die Adhäsion von Matrix und Mineral ermöglichen oder verbessern und somit erheblich zu den mechanischen Eigenschaften des Perlmutter beitragen.

5.4.2 Perlmuttermatrix

Die demineralisierte Perlmuttermatrix zeigt die in der Literatur beschriebenen charakteristischen Merkmale. Auf Lichtmikroskop-Aufnahmen der Aufsicht ist deutlich die Wabenstruktur zu erkennen, die den „Negativabdruck“ (s. Abb. 5.17) der Aragonitplättchen darstellt. Blickrichtung ist also die frühere *c*-Richtung der Aragonitplättchen, in der Paperebene befinden sich folglich die *a*- und *b*-Richtungen. Dies gilt für alle folgenden LM-Aufnahmen der Matrix. Der Durchmesser einer „Wabe“ beträgt im Mittel ungefähr

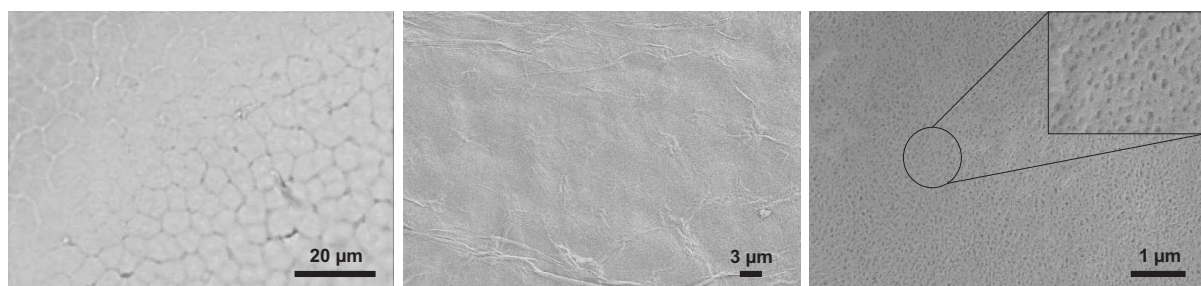


Abbildung 5.17: LM (links)- und SEM (mitte, rechts)-Aufnahmen der demineralisierten Perlmuttermatrix. Die charakteristische Wabenstruktur, der „Negativabdruck“ der Aragonitplättchen, ist zu erkennen, der Durchmesser der Waben ist jedoch kleiner als der der Plättchen. Die Matrix hat eine faserige Struktur (rechts).

$7,4 \mu\text{m}$ und ist damit kleiner als die der Aragonitplättchen. Dies wurde in früheren Studien ebenfalls beobachtet (mit einem Durchmesser von $10\text{-}15 \mu\text{m}$ für die Plättchen und im Mittel $6,7 \mu\text{m}$ für die Waben),⁵⁹ aber nicht diskutiert. Mögliche Erklärungen sind ein Schrumpfen des gesamten Matrixgerüsts durch die Demineralisierung, beispielsweise durch die fehlende Stabilisierung des harten Minerals und/oder die von der in der Matrix vorliegenden natürlichen abweichende Ionenzusammensetzung und -stärke der Essigsäure. Diese Erklärung wird durch das hier beobachtete ausgeprägte Quellungs-/Entquellungsverhalten der Matrix unterstützt: beim Trocknen kollabiert sie, bei Dispergieren in wässriger Lösung quillt sie wieder. SEM- Aufnahmen lassen außerdem bei

stärkerer Vergrößerung die faserige Struktur der Matrix erkennen (s. Abb.5.17 rechts). TEM-Aufnahmen parallel zu den Schichten geschnittener Matrix zeigen die Löcher bzw. Poren (s. Abb.5.18). Diese wurden als Trocknungsartefakte „zu einem gewissen Ausmaß“⁵¹ beschrieben, da sie nur bei luftgetrockneten Proben, nicht aber in vitrifizierten Schnitten beobachtet wurden. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß durch kritische Punkt-Trocknung entwässerte, quer zu den Schichten geschnittene Proben ebenfalls eine löcherige Struktur aufweisen. Da diese Methode dazu dient, Trocknungseffekte zu minimieren, ist anzunehmen, daß die Poren kein Artefakt sind, dieses Strukturmerkmal aber nicht bei jeder der verschiedenen Probenpräparationsarten beobachtet werden kann. Die Existenz von Poren in der Matrix erscheint überdies sinnvoll,

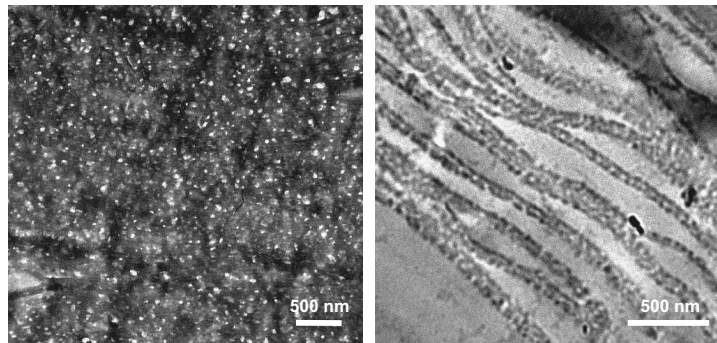


Abbildung 5.18: TEM-Aufnahmen der Matrix. Luftgetrocknet und parallel zu den Schichten geschnitten (links); kritisch-Punkt-getrocknet und quer zu den Schichten geschnitten (rechts). Es sind Poren in der Matrix erkennbar. Die Matrix ist nicht kollabiert.

da beim Perlmutterwachstum Material durch die vorher gebildeten Matrixschichten hindurch transportiert werden muß. Die Aufnahmen beweisen weiterhin, daß die Matrix nach der Demineralisierung nicht kollabiert. Dies ist in Übereinstimmung mit dem oben beschriebenen makroskopischen Quellverhalten der Matrix, nach dem diese in Wasser gequollen ist, und wurde schon vor Einbettung kritisch Punkt-getrockneter Matrix deutlich: Im Gegensatz zu herkömmlich getrockneten, kollabierten Proben, die eine unscheinbare Farbe haben (beige-braun), ist diese nicht kollabiert und, ähnlich wie das ursprüngliche Perlmutter, iriszierend. Die im Vergleich zum ursprünglichen Perlmutter etwas kleineren Abstände zwischen den Matrixschichten (100-400 nm statt 500nm) sind trotz der kritischen Punkt-Trocknung ein Artefakt der Probenpräparation, da die demineralisierten

Matrixstücke in Lösung dicker als die ursprünglichen Perlmutterstücke sind: Die Matrix quillt also während der Demineralisierung, wodurch keine kleineren Abstände zwischen den Matrixschichten resultieren können.

5.4.3 Lagerung der Matrix

Es wurden mehrere Methoden getestet, die Matrix zu lagern: In Gentamycinlösung, Natriumazidlösung, Ethanol und Raschithaltiger Lösung (Raschit: 5 wt% 4-Chlor-3-methylphenol in Methanol). Die Lagerung in reinem Wasser oder physiologischem Puffer allein ist wegen Pilzbildung nicht möglich, es ist ein Fungizid nötig. Bei Lagerung in Gentamycin- oder Natriumazidlösung tritt kein Pilzbefall auf, die Konsistenz der Matrixstückchen ändert sich jedoch, so daß sie nicht mehr gut handhabbar sind. (Sie werden „glitschig“). Als beste Methode für die Langzeitlagerung (über 1 Monat) hat sich eine Lösung von 150 μ l Raschit pro 4 ml Wasser herausgestellt. Es kann auch nach mehr als 12 Wochen keine Veränderung und kein Pilzbefall der Matrix festgestellt werden. Die kurz- und mittelfristige Lagerung (bis zu 2 Wochen) ist in 10%iger Essigsäure möglich.

5.4.4 Deproteinierung der Matrix

Der Proteinanteil der Matrix sollte mit der Protease Subtilisin⁵⁹ entfernt werden. Die Deproteinierung wurde mit Coomassie Blue,¹¹⁴ einem Reagenz zur Proteinfärbung, überprüft. Dazu wurde die Matrix in eine 50%ige Coomassie Blue-Lösung in Wasser gegeben und die Verfärbung beobachtet. Auch nach über sechswöchiger Deproteinierung, mehrmaligem Wechsel der Subtilisinlösung und eines intensiven Waschprozesses tritt eine Blaufärbung sowohl der Matrix als auch der zuvor farblosen bis leicht bräunlichen Coomassie Blue-Lösung selbst auf. Im Gegensatz dazu verfärbt sich bei der Negativkontrolle, einer demineralisierten, nicht mit Subtilisin behandelten Probe zwar die Matrix, nicht aber die Coomassie Blue-Lösung. Die subtilisinbehandelten Matrixstückchen trennen sich in dünnere Stücke auf, ein Hinweis, daß die Verbindungen zwischen den Matrixlagen abgebaut wurden.

Es ist nicht unproblematisch, diese Ergebnisse zu beurteilen, zumal bereits über Schwierigkeiten bei der Anfärbung, Entfernung und Charakterisierung der Proteine im Perl-

mutt berichtet wurde.^{63,64,115} Mit den Deproteinierungsexperimenten sollte zum einen

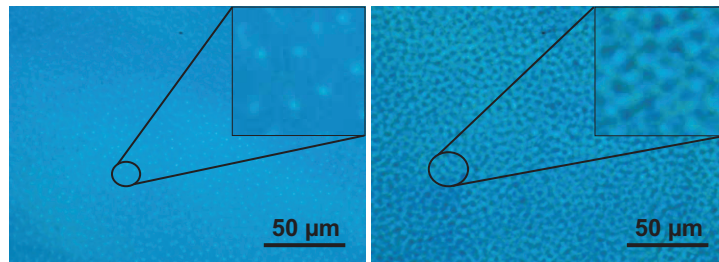


Abbildung 5.19: LM-Aufnahmen von mit Coomassie Blue angefärbten Matrixproben. Links: 47 Tage mit Subtilisin behandelt, rechts: nicht behandelt. Die subtilisinbehandelte Matrix zeigt große, regelmäßig angeordnete Poren, die charakteristische Wabenstruktur wie auf der unbehandelten Matrix ist nicht mehr zu erkennen

die Struktur der Matrix ohne Proteine, sprich die Chitinmatrix, zum anderen das Remineralisationsverhalten der deproteinierten Matrix (s. Kapitel 5.5.4) untersucht werden. Es ist jedoch offensichtlich nicht möglich, alle Proteine vollständig mit Subtilisin zu entfernen, da trotz intensiver Behandlung eine Blaufärbung der Matrix auftritt, das heißt noch Proteine vorhanden sind. Hierbei wurde in Übereinstimmung mit der Literatur⁵⁹ die charakteristische Wabenstruktur durch das Subtilisin degradiert, wie ihr Fehlen auf Lichtmikroskopaufnahmen zeigt (s. Abb.5.19 links). Folglich existiert noch eine weitere, mit Subtilisin nicht (oder nicht vollständig) degradierbare Gruppe von in Essigsäure unlöslichen Proteinen, die mit Coomassie Blue reagieren. Da Matrix und Lösung angefärbt wurden, befinden sich diese Proteine sowohl auf der Matrix als auch in der Lösung. Da die Matrix vor dem Färbetest intensiv gewaschen wurde und die Färbung der Lösung erst nach ungefähr 30 Minuten auftritt, ist es denkbar, daß zwar die Bindung zwischen Proteinen und Matrix, nicht aber die Proteine selbst degradiert wurden. Falls die so abgespaltenen Proteine wasserunlöslich sind (was anzunehmen ist, da sie bei der Demineralisierung mit Säure nicht entfernt wurden) und auf der Matrix ausfallen, gehen sie, wie hier beobachtet, nur sehr langsam in Lösung. Zunächst steht zu vermuten, daß es sich dabei lediglich um nicht herausgewaschene „Wabenproteine“ oder Subtilisin handelt. Da Subtilisin in den hier verwendeten Mengen gut wasserlöslich ist und bereits früher neben den Wabenproteinen von einer weiteren, mit Subtilisin nicht spaltbaren Proteingruppe

berichtet wurde,⁶⁴ ist dies unwahrscheinlich. Ein Artefakt kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da bei nicht mit Subtilisin behandelten Matrixproben die Blaufärbung der Coomassie Blue-Lösung nicht auftritt. Aus Kontrollexperimenten ist bekannt, daß Chitosan von Coomassie Blue angefärbt wird, welches mit Aminogruppen reagiert. Da im Chitin ein gewisser Anteil in der Chitosanform vorliegt, ist zwar davon auszugehen, daß die deproteinierte Chitinmatrix angefärbt werden kann. Die Matrix kann jedoch durch die Essigsäure- und Subtilisinbehandlung nicht gelöst werden, so daß die Tatsache, daß neben der subtilisinbehandelten Matrix auch die Coomassie Blue-Lösung selbst angefärbt wird, wie oben beschrieben auf nicht degradierte Proteine zurückzuführen ist.

Die Tatsache, daß die Wabenstruktur vollständig degradiert wurde, zeigt außerdem, daß die Matrixstückchen trotz ihrer makroskopischen Ausmaße für das Subtilisin komplett zugänglich sind. Weiterhin weisen die deproteinierten Proben ein vorher nicht erkennbares Strukturmerkmal auf: Sie sind regelmäßig von im Lichtmikroskop erkennbaren Löchern (s. Abb. 5.19) durchsetzt, die wesentlich größer sind als die auf den TEM-Bildern (s. Abb. 5.18) beobachteten Poren (ca. 5-50 nm, vgl. Kapitel 2.3) und im Modell der Mineralbrücken⁵⁸ als zentrale Poren für die Bildung der Mineralbrücken und die Nukleation der Aragonitplättchen in der nächst höheren Schicht interpretiert werden (s. Kapitel 2.3.1). Demnach entsprechen diese Löcher den Positionen der Nukleationszentren der Aragonitplättchen. Dies wird von der Tatsache gestützt, daß ihre Abstände im Mittel dem Durchmesser der Waben entsprechen und sich somit je eine Pore unter je einem Plättchen befinden kann.

Im Laufe der Subtilisin-Behandlung behalten die einzelnen Matrixstückchen ihren Zusammenhalt nicht, sondern zerfallen in dünnere Schichten, was beweist, daß die einzelnen Matrixschichten miteinander durch Proteine verbunden sind (s. Kapitel 2.3). Chitin alleine, wie im erweiterten Epitaxiemodell von Perlmutterwachstum postuliert (s. Kapitel 2.3.1), ist also nicht ausreichend, um der Matrix ihre dreidimensionale Struktur zu geben,⁵¹ es sind strukturierende Proteine nötig. So wurden bereits Hinweise gedunden, daß die Brücken, die die Matrixschichten verbinden, aus Collagen bestehen.⁶⁴

5.4.5 ζ -Potential der Matrix

Da es sich als problematisch erwiesen hat, Informationen über die Matrixproteine zu erhalten, diese aber nicht nur im Hinblick auf ihre Struktur (SEM, TEM,...) charakterisiert werden sollte, wurden ζ -Potential-Messungen durchgeführt, um den Zustand der Matrix in wäßriger Lösung näher zu untersuchen. Das ζ -Potential⁷⁷ ist ein Maß für die Ladung eines Partikels, der in Lösung in einem angelegten elektrischen Feld wandert, aber nicht sedimentiert und kann somit wichtige Informationen über die Matrix liefern. Diese sind unter anderem im Hinblick auf die in Lösung stattfindende Remineralisierung (s. Kapitel 5), vor allem auf die mit einem starken pH-Anstieg verbundene Gasdiffusionsmethode (die sicher nicht „biomimetisch“ genannt werden darf), interessant.

Vor jeder Messung wurde eine kleine Menge an Matrix in der jeweiligen Lösung mit einem Ultraschallstab- oder bad dispergiert und gewartet bis eventuelle größere Partikel sedimentiert waren. Die verbleibenden Matrixpartikel in der überstehenden Dispersion sedimentierten vor allem bei höheren pH-Werten (über ~ 5) erst nach deutlich längeren Zeiten als der Meßdauer. Der pH-Wert wurde mit HCl, NaOH oder Puffer eingestellt.

Abbildung 5.20 stellt das ζ -Potential der Matrix in Abhängigkeit vom pH-Wert dar. Für saure pH-Werte ist es positiv und sinkt von ca. +26 mV bei pH 2,9 auf ca. -

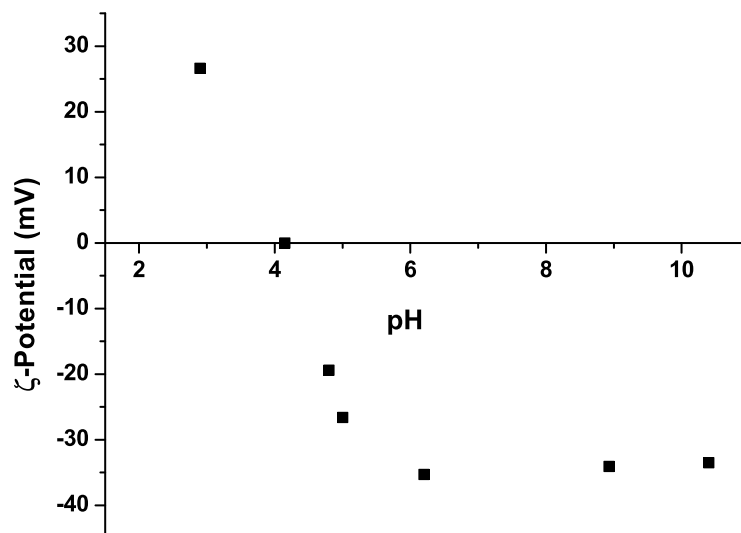


Abbildung 5.20: Abhängigkeit des ζ -Potentials der Matrix vom pH-Wert.

35 mV bei pH 6,2. Dabei durchläuft es den Nullwert bei einem pH-Wert von 4,2. Bei Anstieg des pH-Wertes über 6,2 sinkt das ζ -Potential nicht weiter, sondern bleibt bis zum höchsten untersuchten pH-Wert von 10,5 konstant zwischen -33 und -35 mV. Wenn auch keine quantitative Aussage möglich ist, da eine unbekannte Menge an Matrix vor der Messung sedimentiert, die Partikel variable, nicht definierbare Formen und eine breite Größenverteilung haben, ist der qualitative Trend doch unverkennbar: Die Matrix ist bei pH-Werten unter ca. 4,2 positiv geladen, die positive Ladung steigt mit abnehmendem pH-Wert. Über pH 4,2 ist sie negativ geladen, wobei der Betrag der negativen Ladung bis pH 6,2 zunimmt, dann aber mit weiter steigendem pH bis 10,5 konstant bleibt. Der isoelektrische Punkt der Matrix liegt um pH 4,2. Der gleiche Trend wurde auch beobachtet, wenn der pH mit Puffer einer Ionenstärke von 0,1 mol/l eingestellt wurde. Hier waren die Absolutwerte des ζ -Potentials geringer, was zu erwarten ist, da die Ionenstärke im Vergleich zu mit HCl oder NaOH eingestellten Lösungen größer ist und somit zu kleineren ζ -Potential-Absolutwerten führt. Der isoelektrische Punkt wurde ebenfalls nahe 4 gefunden.

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß der Zustand der Matrix in Hinsicht auf ihre Ladung bei allen Remineralisierungsexperimenten gleich (oder nahezu gleich) ist, da in keinem ein pH von ca. 5,8 unterschritten wird, und die Matrix somit immer (ähnlich stark) negativ geladen ist. Dies gilt überraschenderweise selbst für die Gasdiffusionsmethode, bei der der pH-Wert auf 9,5 ansteigt. Es kann weiterhin gezeigt werden, daß die Matrix Calcium-Ionen binden kann: ihr ζ -Potential liegt in neutraler und basischer $CaCl_2$ -Lösung bei Werten nahe 0 und nicht, wie in NaOH, bei negativen Werten.

Meerwasser ist ein gutes Puffersystem. Sein pH liegt zwischen 7,5 und 8,5.¹¹⁶ und somit innerhalb des Bereiches konstanter negativer Matrixladung bei pH-Werten über 6. Der pH, der bei der Mineralisation *in vivo* vorliegt, kann in der Mikroumgebung natürlich von dem des Meerwassers abweichen, jedoch ist unwahrscheinlich, daß er sich um mehr als zwei pH-Einheiten unterscheidet. Man kann also vermuten, daß die unlösliche Matrix bei der Mineralisation sowohl *in vivo* als auch bei dem synthetischem Ansatz hier ähnlich stark negativ geladen ist und somit in Bezug auf ihre Ladung bei den *in vitro*-Remineralisationsexperimenten zumindest nah-biomimetische Bedingungen vorliegen. Allerdings darf nicht vernachlässigt werden, daß *in vivo* neben der unlöslichen Matrix

lösliche Proteine vorhanden sind, die die Ladung und Ladungsverteilung beeinflussen können. Dies kann für die Mineralisation von großer Bedeutung sein, da Ladungen eine wichtige Rolle spielen. So wurde beispielsweise für die *in vitro*-Kristallisation von $CaCO_3$ unter Monolayern und Filmen gezeigt, daß die durchschnittliche Oberflächenladungsdichte, nicht aber Epitaxie, das Polymorph und die Orientierung bestimmen.^{26,98,117}

5.5 Retrosynthese von Perlmutter

Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz, nämlich die Remineralisierung der unlöslichen organischen Matrix eines Biominerals, unterscheidet sich deutlich von vielen anderen Arbeiten, die sich mit der Aufklärung der Mechanismen der Biomineralbildung beschäftigen. Üblicherweise werden die Biomineralien in einzelne Komponenten zerlegt und diese analysiert.^{59,115,118} Oft wird der Einfluß bestimmter extrahierter Komponenten, häufig löslicher Proteine, auf die *in vitro*-Kristallisation untersucht,^{60,64} um deren spezifischen *in vivo*-Funktionen zu ermitteln. Somit wird einerseits von einer Dominanz der Proteine in der Steuerung des Mineralbildungsprozesses *in vivo* ausgegangen, andererseits aber vernachlässigt, daß die Bedingungen der *in vitro*-Experimente, die diese Steuerungsprozesse aufklären sollen, sich gänzlich von denen *in vivo* (Mikroumgebung mit anderem pH, Ionenstärke etc., Zusammenwirken mehrerer Biopolymere, u.U. zeitlich begrenzter Einfluß oder variierende Konzentration bestimmter Komponenten,...) unterscheiden und daß die extrahierten Biopolymere nicht zwangsläufig (ausschließlich) den Mineralisationsprozeß steuern müssen. Es wurden zwar zahlreiche Komponenten mit spezifischen *in vitro*-Eigenschaften gefunden, wie z. B. die Nukleation von Aragonit durch ein aus Perlmutter extrahiertes Protein, doch ist es fast unmöglich, zu prüfen, ob sie diese Funktion *in vivo* ebenfalls haben. Zudem sind diese Einzel-Information bei weitem nicht ausreichend, den gesamten Mineralisationsprozeß zu verstehen oder gar zu imitieren. Die Extraktion der verschiedenen Proteine ist mühsam und führt nur zu geringen Ausbeuten, so daß es zusätzlich erschwert wird, genügend „Puzzle-Stücke“ zu erhalten und in einen Gesamtzusammenhang zu bringen.

Der Ansatz dieser Arbeit hingegen basiert auf der Retrosynthese des Biominerals als

solches. Dabei werden die lösliche organische Matrix und die Mineralkomponente des jeweiligen Biominerals entfernt und die verbleibende (sicherlich im Vergleich zum *in vivo*-Zustand veränderte), dreidimensional strukturierte, unlösliche organische Matrix als Gerüst verwendet, um sie *in vitro* wieder mit Mineral aufzufüllen (zu „re“-mineralisieren), wobei nur die jeweilige Mineralkomponente und einfache synthetische Polymere, jedoch keinerlei Proteine zur Verfügung gestellt werden. Gelingt es dabei, die Matrix so zu mineralisieren, daß das ursprüngliche Biomineral rekonstruiert („retrosynthetisiert“) wird, ist es offensichtlich möglich, die Synergie der (löslichen) Proteine zu einem gewissen Grad zu imitieren. Diese Synergie muß demnach einem „allgemeinerem Prinzip“ und nicht spezifischen biomolekularen Erkennungsprozessen folgen, da sie sonst nicht mit dem hier gewählten Ansatz (*in vitro* veränderte unlösliche Matrix, keine löslichen Proteine) kopiert werden könnte. Das Prinzip muß also stärker von physikalischen Prozessen als spezifischen Proteineinflüssen dominiert werden. Natürlich steht es dann noch offen zu beweisen, daß dieses „allgemeine Prinzip“ auch im *in vivo*-Prozeß von Bedeutung ist, doch erscheint es unwahrscheinlich, daß dort trotz der erfolgreichen Anwendung *in vitro* in der Natur völlig andere Mechanismen und Prozesse wichtig sind. Überdies können die Erkenntnisse aus der Retrosynthese direkt auf die Entwicklung neuer Materialien angewendet werden, vor allem, wenn es gelingt, die unlösliche organische Matrix zu ersetzen. Da diese durch die Demineralisierung im Vergleich zu ihrem ursprünglichen Zustand degradiert worden ist, ist anzunehmen, daß sie unter der Beachtung gewisser Charakteristika wie Ladung oder Quellungsgrad synthetisch ersetzt werden kann. Dabei kommen beispielsweise mit Phasenvermittlern beschichtete Polymerstrukturen in Frage.

Die Theorie eines „allgemeinen Prinzips“ und der weniger spezifischen Rolle der einzelnen Proteine im Biomineralisationsprozeß stützt sich zum einen auf neue Studien, in denen zunehmend über amorphe Precursor in Biomineralien berichtet wird (s. Kapitel 2.2.1), zum anderen auf die Tatsache, daß (Meso)Kristalle mit komplexen Morphologien, also typischen Merkmalen von Biomineralien, synthetisch ohne spezifische Proteine generiert werden können (s. Kapitel 2.2.2 und 2.2.4).

Die Möglichkeit der Bildung von Perlmutter über amorphe Precursor und deren mesoskopischer Transformation (als „allgemeines Prinzip“) in der/durch die unlösliche organische Matrix gegebene räumlich begrenzte Mikroumgebung soll in dieser Arbeit überprüft wer-

den. Dazu wurden ACC-Precursor synthetisch generiert und zur Remineralisierung der demineralisierten Perlmuttermatrix eingesetzt. Der potentielle Einfluß von Proteinen ist dabei begrenzt auf die denaturierten, unlöslichen Proteine der strukturierenden Matrix.

5.5.1 Optimierung der Precursor

Die ACC-Precursor müssen so geartet sein, daß sie in irgendeiner Form mit der Matrix wechselwirken können, um Zugang zu ihrer Mikrostruktur zu haben. Dabei müssen sie lange genug stabil sein, um nicht vorher zu kristallisieren und klein genug, um durch die Poren der Matrix in die verschiedenen Schichten gelangen zu können. Überdies gibt es verschiedene Formen von biogenem ACC (s. Kapitel 2.2.1), so daß es nicht auszuschließen ist, daß synthetisch generierte Precursor, die den Kriterien der Größe und Stabilität genügen, dennoch nicht für die Remineralisierung geeignet sind.

Hier werden verschiedene aus früheren Studien bekannte Additive zur Generierung und Stabilisierung von ACC verwendet: Polyethylenoxid-block-Polymethacrylsäure (PEO-b-PMAA), ein dihydrophiles Block-Copolymer (DHBC), Polyacrylsäure und Polyasparaginsäure.

PEO-b-PMAA

Die Zugabe von 1g/l PEO-b-PMAA bei der Kristallisation von $CaCO_3$ führt zunächst zur Bildung von ACC-Nanopartikeln, die hier in Übereinstimmung mit der Literatur⁹² kristalline komplexe Morphologien wie beispielsweise Hanteln bilden. Die Remineralisation der Matrix ist jedoch mit PEO-b-PMAA nicht möglich (s. Kapitel 5.5.2). Möglicherweise sind die Precursor nicht lange genug stabil oder können nicht mit der Matrix wechselwirken. Dies macht deutlich, daß bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein müssen, um zur Mineralisation innerhalb der Matrix zu führen.

Polyacryl- und Polyasparaginsäure

Die Verwendung von Polyacryl- oder Polyasparaginsäure als Additiv zur Fällung von $CaCO_3$ führt zur Stabilisierung von ACC. Es wird dabei sogar über flüssige ACC-

Nanotropfen berichtet, sogenannte „PILP’s“,^{22–25,27} auf die in Kapitel 2.2.1 näher eingegangen wurde. Für das konkrete Beispiel der Perlmuttermatrix könnten die ACC-Tropfen mittels Kapillarkräfte durch die Löcher in der Matrix in verschiedene Schichten transportiert werden, selbst wenn die Tropfen größer als die Löcher sein sollten.

Da die Remineralisierung mit diesen Precursoren erwartungsgemäß erfolgreich war (s. Kapitel 5.5.3), wurden sie hier näher charakterisiert. So wurden die „PILP’s“ in früheren Studien unter anderem mit der Gasdiffusionsmethode hergestellt, die sehr sensitiv auf Änderungen der experimentellen Bedingungen reagiert (s. Kapitel 5.1.1), so daß geprüft werden muß, ob sie sich auch unter den hier gewählten Bedingungen bilden. Beispielsweise wurden 500 μ l-Petrischalen verwendet, hier aber 30 ml-Schnappdeckelgläschen mit 20 ml Lösungsvolumen.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Polyacryl- (pAA, M=5100, 450000 g/mol) und Polyasparaginsäuren (pAsp, M=6000, 20000 und 33400 g/mol) in Konzentrationen zwischen 10 μ g/ml und 1 mg/ml als Additive getestet, zum Teil mit Magnesiumionen als weiteren Zusatz. In allen Fällen tritt nach ca. 6 Stunden eine Trübung auf, doch nur selten gelingt es, unter dem Lichtmikroskop spherische Partikel zu beobachten, die aus koaleszierten „PILP-Tröpfchen“ bestehen könnten (s. Abb. 5.21). Es ist sehr schwer, diese zu finden

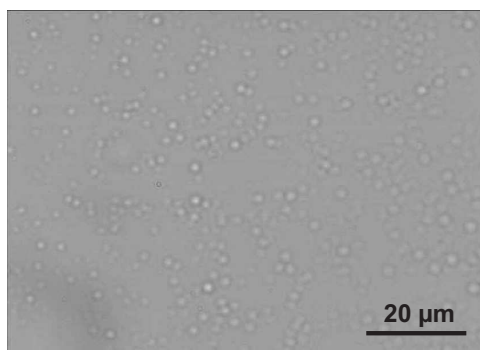


Abbildung 5.21: Typische LM-Aufnahme der Partikel oder Tropfen bei einsetzender Trübung gebildet in 10mM $CaCl_2$ mit pAA oder pAsp als Additiv

und zu fokussieren, so daß ihre Bildung in einigen Proben übersehen worden sein kann. Die Lichtmikroskop-Beobachtungen alleine lassen nicht mit Sicherheit den Schluß zu, daß es sich dabei um flüssige Tropfen handelt. Die Tatsache, daß eine Trübung auftritt, kann ebenfalls nicht als eindeutiger Beweis einer Phasenseparation angesehen werden, da nicht

festgestellt werden kann, ob die Trübung durch eine Phasenseparation oder die „normale“ Nukleation von (festen) $CaCO_3$ -Partikeln oder beidem verursacht wird. So wird auch in Blindproben ohne jegliche Additive eine Trübung beobachtet. Jegliche Versuche, die potentielle PILP-Phase anzufärben und durch Zentrifugation zu separieren, wie es im Fall von einigen geladenen Aminosäuren geglückt ist,¹¹⁹ um ihren Aggregatzustand zu bestimmen, haben lediglich sehr kleine Mengen festen Zentrifugats ergeben. Um zu beweisen, daß es sich bei der beobachteten Spezies tatsächlich um ACC handelt, wurden diese durch Schockfrieren in flüssigem N_2 und anschließender Gefriertrocknung isoliert und ihre Elektronendiffraktogramme aufgenommen. Die Ergebnisse hängen stark davon ab, wie lange nach Einsetzen der Trübung die Partikel isoliert wurden. Geschieht dies nahezu direkt danach, zeigen die Diffraktogramme keine Ringe, sondern allenfalls diffuse Banden, was charakteristisch für eine amorphe Phase ist. Abbildung 5.22 zeigt eine TEM-Aufnahme (links) und das dazugehörige Diffraktogramm (rechts) der isolierten Partikel aus einer 10 mM $CaCl_2$ -Lösung mit 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pAsp (Mw=6000 g/mol) nach 7 Stunden Reaktionszeit. Werden die Partikel jedoch zu spät isoliert oder nicht schnell genug schock-

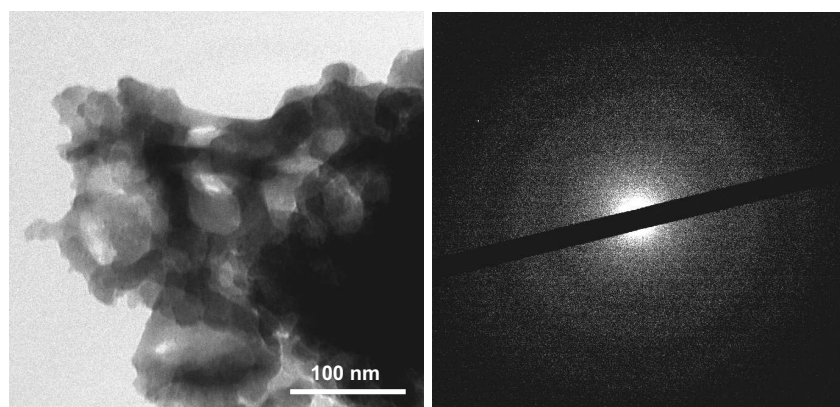


Abbildung 5.22: TEM-Aufnahme (links) und Elektronendiffraktogramm (rechts) von Partikeln isoliert nach 7 Stunden Reaktionszeit (Gasdiffusion) aus 10 mM $CaCl_2$, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pAsp durch Schockfrieren in fl. N_2 und anschließendes Gefriertrocknen. Das Diffraktogramm ist charakteristisch für amorphes Material.

gefroren, zeigen sie die Diffraktogramme von kristallinem $CaCO_3$. Offensichtlich handelt es sich bei der zuerst gebildeten Phase wie bereits vermutet um ACC, das zumindest gegenüber der Präparation für die TEM-Untersuchungen relativ instabil ist und leicht kristallisiert. Ein Nachweis des flüssigen Zustandes wurde in früheren Studien ebenso wie

hier nicht erbracht, doch gibt es zahlreiche Indizien, die auf eine flüssige Phase schließen lassen. Dies ist auch hier der Fall: Es wird die Bildung von filmartigen Strukturen beobachtet, die teilweise deutlich erkennbar aus sphärischen Partikeln bestehen und unter gekreuzten Polarisationsfiltern teilweise dunkel erscheinen, also wahrscheinlich teilweise noch amorph sind. Allerdings werden diese hier nicht nur am Boden,²² sondern auch bei Probennahme aus dem mittleren Bereich des Reaktionsgefäßes gefunden. Die nach einigen Stunden überwiegend beobachtete Species sind sphärische bis ovale Partikel (s. Abb. 5.23 rechts). Der Anteil der filmartigen Strukturen kann durch die Zugabe von Magnesiumionen ($Mg/Ca=3-5/1$) zur Reaktionslösung erheblich erhöht werden, was in Übereinstimmung mit der Eigenschaft von Magnesium ist, ACC zu stabilisieren.^{120,121} Abbildung 5.23 (links und mitte) zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen dieser Strukturen und der ohne Magnesiumzugabe vorwiegend präzipitierten Partikel (rechts). Die hier be-

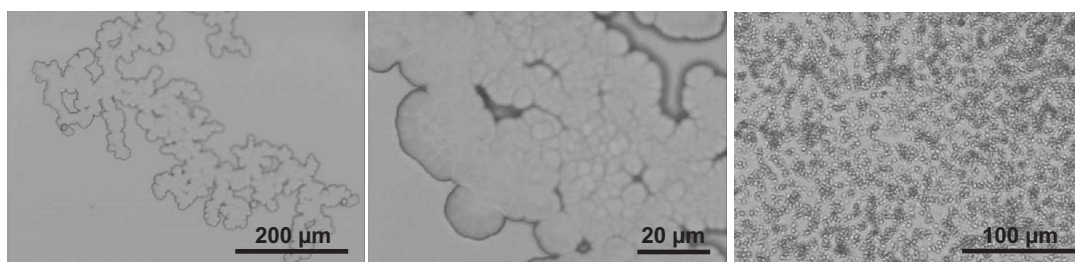


Abbildung 5.23: LM-Aufnahmen der filmartigen Strukturen bei Polyacryl- oder Polyasparaginsäuren als Additive, die vor allem bei Zugabe von Magnesiumionen gebildet werden (links und mitte) und der typischen präzipitierten Partikel ohne zusätzliche Magnesiumionen (rechts).

schriebenen Phänomene sind nicht auf die Gasdiffusionsmethode beschränkt: sie werden auch bei direktem Zusammengeben von $CaCl_2$ - und Na_2CO_3 mit den entsprechenden Additiven beobachtet. Bei der Kitano-Methode werden geringe Mengen an filmartigen Strukturen erst nach einigen Tagen gefunden.

Es kann also gezeigt werden, daß durch Zugabe von Polyacryl- oder Polyasparaginsäuren amorphe Precursorpartikel generiert werden, die zu filmartigen Strukturen koaleszieren können. Diese sind jedoch nicht die einzige gebildete Species: ihr Anteil und ihre Stabilität hängen extrem von den experimentellen Bedingungen ab und können durch Magnesiumionen erhöht werden. Es kann nicht nachgewiesen werden, inwieweit diese Precursorphase flüssig ist, zumindest verhält sie sich in gewissen Aspekten wie eine Phase, die fließen

kann (Filmbildung). Auch in den früheren Studien wurde die flüssige Natur dieser Phase nicht nachgewiesen, erscheint jedoch aufgrund deren Verhalten wahrscheinlich. Ohnehin stellt sich die Frage, ob bei einer amorphen Phase, die, vor allem bei Zusatz von Magnesium,¹²² viel Wasser enthält, eine Grenze zwischen festem und flüssigem Zustand gezogen werden kann.

5.5.2 Optimierung der Remineralisation

Werden ACC-Precursor mit PEO-b-PMAA als Additiv erzeugt, wird keine spezifische Mineralisation durch die/in der Matrix beobachtet. Im Lichtmikroskop sind bei der Kristallisation mit der Gasdiffusionsmethode deutlich hantelförmige und sphärische Kristalle auf der Matrixoberfläche zu sehen (s. Abb. 5.24). Dabei handelt es sich jedoch um die gleichen Kristalle, die auch in Lösung gebildet werden und vermutlich auf die Matrixoberfläche sedimentiert sind.⁹² Das IR-Spektrum dieser Probe zeigt, daß sie aus Calcit bestehen.

Bei der Kristallisation mit der Kitano-Methode werden nahezu keine Kristalle auf/in

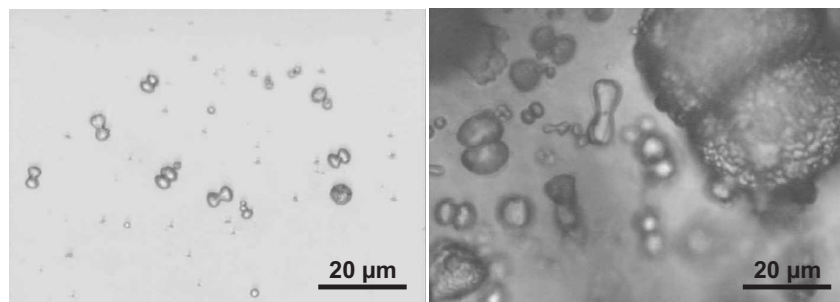


Abbildung 5.24: LM-Aufnahmen der Kristalle in Lösung (links) und auf der Matrix (rechts) nach 24h Gasdiffusion mit 1g/l PEO-block-PMAA als Additiv.

der Matrix gefunden, bei der Double Jet-Methode sind es lediglich runde bis ovale kleine Partikel, die sich in Lösung und auf der Matrix befinden.

In allen diesen Fällen ist das durch das PEO-Block-PMAA gebildete ACC offensichtlich nicht zur Remineralisierung der Matrix geeignet, das heißt, die ACC-Precursor müssen nicht nur generiert werden, sondern überdies bestimmte Voraussetzungen erfüllen (s. Kapitel 5.5.1).

Wird Polyacryl- oder Polyasparaginsäure als Additiv verwendet, hängen die Ergebnisse

von der Methode ab, mit denen das ACC generiert wird: bei der Kitano-Methode ist die Matrix in den meisten Fällen nahezu gar nicht mineralisiert, oder es befinden sich aus der Lösung sedimentierte Kristalle auf ihrer Oberfläche. Dies kann zum einen daran liegen, daß die Matrixstückchen üblicherweise auf den Boden des Reaktionsgefäßes sinken, die Bildung des $CaCO_3$ aber durch das Entweichen des CO_2 hauptsächlich an der Oberfläche statt findet zum anderen, daß in der Kitano-Methode relativ wenig $CaCO_3$ erzeugt wird, wie Blindexperimente zeigen. In einigen wenigen Fällen jedoch scheint die Matrix selbst mineralisiert worden zu sein, wobei jedoch keine Systematik zu Art, Molmasse oder Konzentration des Additivs vorliegt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen und IR-Spektren dieser Proben ähneln dabei denen der im nächsten Kapitel vorgestellten Matrixmineralisation mit der Gasdiffusionsmethode. Da die Kitano-Methode im Gegensatz zur Gasdiffusionsmethode, die sich als sehr gut geeignet zur Remineralisation der Matrix herausgestellt hat, offensichtlich nur sporadisch zur Mineralisation der Matrix führt, wurden nur wenige weitere Untersuchungen zu dieser Methode durchgeführt und das Hauptaugenmerk auf die Gasdiffusionsmethode gerichtet. Daneben wurden einige vergleichende Studien zur Remineralisierung mit der Durchflußzelle (in Kombination mit der Spritzenpumpe) gemacht, da diese Methode ähnliche Ergebnisse wie die Gasdiffusion liefert, jedoch schneller ist und der pH-Wert konstant bleibt.

5.5.3 Remineralisierung der Matrix

Werden die ACC-Precursor mit der Gasdiffusionsmethode unter Verwendung von pAA oder pAsp als Additiv (s. Kapitel 4) erzeugt, ist eine Wechselwirkung zwischen der Matrix und den Precursoren möglich, und die Matrix wird, wie oben erwähnt, mineralisiert. Die im folgenden vorgestellten Ergebnisse sind dabei unabhängig von Konzentration und Molmasse der hier verwendeten Additive (s. Kapitel 4).

Abbildung 5.25 zeigt Lichtmikroskopaufnahmen einer mit $28 \mu\text{g/ml}$ pAsp ($M=6000 \text{ g/mol}$)-Zusatz remineralisierten Probe nach 24 Stunden. Neben einigen aus der Lösung auf die Matrix sedimentierten Kristallen (hier nicht gezeigt) sind deutlich zahlreiche „inselförmige“ Gebilde von bis gut $300 \mu\text{m}$ Länge zu erkennen. Diese erscheinen unter gekreuzten Polarisationsfiltern hell (rechts oben, Einsatz) und bestehen demnach aller Wahrscheinlichkeit

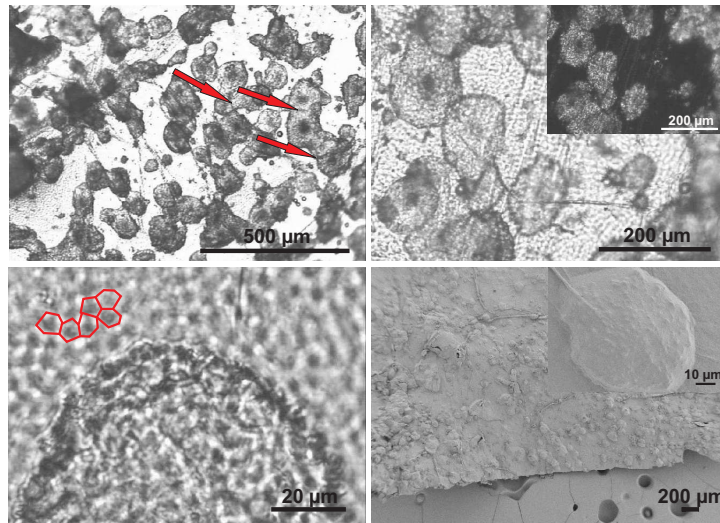


Abbildung 5.25: LM- und SEM-Aufnahmen der mit der Gasdiffusionsmethode in 10 mM $CaCl_2$, 28 $\mu g/ml$ pAsp (M=6000) remineralisierten Matrix nach 24h: Es haben sich „Inseln“ verschiedener Größe gebildet, die unter gekreuzten Polarisationsfiltern am LM hell sind (rechts oben, Einschub). In nicht mineralisierten Bereichen und in den Inseln ist die Wabenstruktur der Matrix auszumachen (rechts oben, links unten, Umrisse in rot angedeutet). Auf SEM-Bildern sind die Inseln ebenfalls deutlich zu erkennen (rechts unten, Einschub: Vergrößerung). Sie befinden sich unter der Matrix-Oberfläche.

zufolge aus kristallinem $CaCO_3$. Solche oder ähnliche Gebilde sind nicht in der Lösung zu finden. Dies ist selbst ohne Kenntnis der genauen Struktur der Inseln ein nahezu eindeutiger Hinweis dafür, daß die Matrix mineralisiert worden ist.

Die Kontrollexperimente beweisen, daß die Inseln durch den Einfluß der Matrix gebildet werden und die Mineralisierung nicht möglich ist, wenn eine der beiden Schlüsselkomponenten - die ACC-Precursor oder die unlösliche Matrix - fehlen. Wird kein pAA oder pAsp zur Reaktionslösung zugesetzt, also keine amorphen Precursor gebildet, werden auf der Matrixoberfläche lediglich einige Calcitrhomboeder beobachtet (s. Anhang Abb. A.1 links), die typisch für die additivfreie $CaCO_3$ -Kristallisation sind. Werden die Precursor in Gegenwart eines Glassubstrates anstatt der Matrix erzeugt, befinden sich die in der Lösung gebildeten Partikel auf dem Substrat (s. Anhang Abb. A.1 rechts). Es wachsen keine inselartigen Gebilde.

Neben den Inseln gibt es nichtremineralisierte Bereiche, doch zeichnet sich das charakteristische Muster der sechseckigen „Waben“ nicht nur dort sondern auch in den Inseln

deutlich ab, wie auf Abbildung 5.25 rechts oben und links unten durch rote Umrisse angedeutet wurde. Die „Waben“ werden durch die Kollagenverbindungen zwischen den Matrixschichten gebildet, die im ursprünglichen Perlmutter die sechseckigen Aragonitplättchen umgeben und folglich nach der Demineralisierung „leer“ sind (s. Kapitel 2.3, „Negativabdruck“) und hier wieder mit Mineral ausgefüllt werden sollen. Die Tatsache, daß das „Wabenmuster“ auch nach der Mineralisierung noch vorhanden ist, läßt darauf schließen, daß die dreidimensionale Struktur der Matrix erhalten und nicht von der neuen Mineralphase „zusammengedrückt“ oder zerstört wird, und zeigt somit, daß die Matrix als Gerüst für die Remineralisierung dienen kann. SEM-Aufnahmen der Matrixoberfläche deuten bereits an, daß die Inseln sich nicht auf der Oberfläche, sondern innerhalb Matrix befinden (s. Abb. 5.25 links unten). LM-Aufnahmen machen überdies deutlich, daß einige der größeren Inseln aus mehreren aneinandergrenzenden kleineren bestehen. Zudem ist es meist nicht möglich, alle Inseln eines Bildausschnittes gleichzeitig zu fokussieren. Sie befinden sich also in verschiedenen Ebenen, was bedeutet, daß mehrere Inseln übereinander liegen, ebenso wie die Aragonitplättchen im Perlmutter. Dies wird sehr schön auf Abbildung 5.26 demonstriert: Sie zeigt LM-Aufnahmen einer in zwei verschiedenen Ebenen fokussierten Stelle (links und rechts oben). Auf beiden ist jeweils eine Mineralschicht scharf, während die andere unscharf ist. In einer Ebene sind die Inseln dabei wesentlich kleiner als in der anderen. An einer anderen Stelle sind zwei Inseln zu erkennen, die aneinanderstoßen und über einer dritten liegen (links unten). Oftmals deuten dunkle Flecken die Inseln außerhalb des Focus an (rechts unten). Vermutlich hängt dabei es von deren Abstand in *c*-Richtung ab, ob sie (nahezu) gleichzeitig fokussiert werden können. Dies erinnert in gewisser Hinsicht bereits an die Struktur des ursprünglichen Perlmutter: Wie bei diesem gibt es ebenso hier mehrere übereinanderliegende Mineralschichten, wobei die Tatsache, daß die Inseln einer Schicht recht groß sind, während sie in einer anderen (noch) klein sind, den „stacks of coins“ beim Perlmutterwachstum ähnelt, bei dem mehrere Schichten gleichzeitig wachsen. Die Plättchen der jüngeren Schichten sind dabei noch schmaler, da ihr Wachstum später begonnen hat. Natürlich sind die lateralen Dimensionen hier anders. Es muß außerdem noch bewiesen werden, daß es sich tatsächlich um Inseln aus $CaCO_3$ handelt, was jedoch angesichts der experimentellen Parameter und der Helligkeit der Inseln unter gekreuzten Polarisationsfiltern der Fall sein sollte. Vor allem

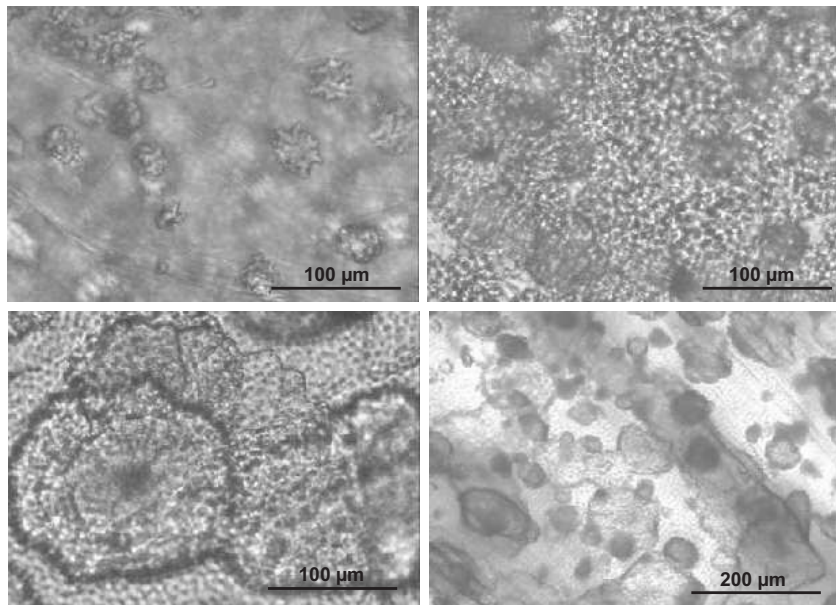


Abbildung 5.26: LM-Aufnahmen, übereinanderliegender „Mineral-Inseln“ der mit der Gasdiffusionsmethode in 10 mM $CaCl_2$, 28 $\mu g/ml$ pAsp (M=6000) remineralisierten Matrix: zwei verschiedene Focii der gleichen Stelle (links und rechts oben); zwei aneinanderstoßende Inseln, die über einer weiteren liegen (links unten); oft deuten sich die Inseln außerhalb des Focii als dunkle Flecken an (rechts unten).

muß jedoch gezeigt werden, daß die Matrix im Innern mineralisiert ist, also die charakteristische Schichtstruktur aus Mineral- und Matrixlagen nachgebildet wurde.

IR-Spektroskopie gibt einen ersten Hinweis auf die Modifikation der Mineralkomponente: Nach 24 Stunden zeigen IR-Spektren der remineralisierten Matrix die charakteristischen Peaks für Vaterit (743 und 869 cm^{-1}) und Calcit (711 und 869 cm^{-1}). In seltenen Fällen sind die Vaterit-Peaks gar nicht oder kaum vorhanden. Die relative Intensität der Vateritpeaks im Vergleich zu der der Calcitpeaks nimmt bei älteren, länger in der Reaktionslösung belassenen Proben ab. So wird nach ca. 20 Tagen nahezu nur noch Calcit gefunden (s. Abb. 5.27). Dies ist in Übereinstimmung mit dem empirischen Gesetz von Ostwald (s. Kapitel 2.1), nach dem die weniger stabile, zuerst gebildete Phase (hier Vaterit) in Lösung in die thermodynamisch stabilere Phase (hier Calcit) umgewandelt wird. Es wurde dabei keinerlei Korrelation zwischen Konzentration oder Art des Additivs (pAA oder pAsp) und dem Vateritanteil bei gleich alten Proben oder der Geschwindigkeit der Umwandlung zu Calcit gefunden. Das genaue Verhältnis der beiden Kristallmodifikationen kann jedoch bereits durch das Waschen und Trocknen der Proben, wobei sich Vaterit teilweise in Calcit umwandeln kann, beeinflußt werden. Es kann daher nur als

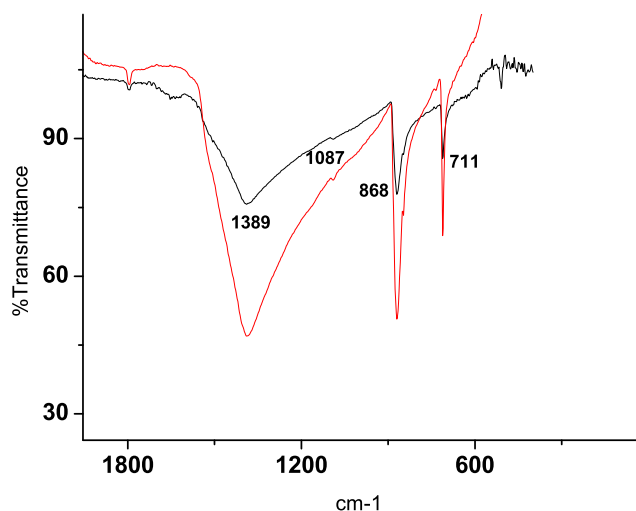


Abbildung 5.27: Das IR-Spektrum der mit $28\text{ }\mu\text{g/ml}$ pAsp ($M_w=6000\text{ g/mol}$) als Additiv remineralisierten Matrix nach 20 Tagen Reaktionszeit zeigt nur noch Calcit. (Rot: Synthetisches Calcit)

erster Anhaltspunkt genommen werden, zumal sich neben den Inseln auch unbekannte und variierende Mengen von unspezifisch in der Lösung gebildeten Kristallen auf der Matrix befinden, die trotz des Waschprozesses nicht vollständig von der Matrix entfernt werden können. Die IR-Spektren des Präzipitats der Lösung zeigen ebenfalls Calcit- und Vateritpeaks.

Um die Strukturierung und Kristallmodifikationen der mineralisierten Bereiche innerhalb der Matrix zu untersuchen, hat sich die Elektronenmikroskopie und -beugung als gut geeignet herausgestellt. Sie kann Größenordnungen im μm - und sub- μm -Bereich, den hier relevanten Größenskalen, auflösen und ermöglicht die Aufnahme von Elektronenbeugungsspektren zur Phasenidentifikation innerhalb ausgewählter Bereiche. Dennoch sind mit den mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen einige Probleme verbunden. Da die Proben nicht homogen und nicht vollständig mineralisiert sind, ist es nicht trivial, die mineralisierten Bereiche am Elektronenmikroskop zu finden. Dies gilt insbesondere für TEM-Untersuchungen: Um die Transmission von Elektronen zu ermöglichen, dürfen die Proben eine bestimmte, von ihrer chemischen Zusammensetzung abhängige Dicke nicht überschreiten. Um dies zu gewährleisten, werden die Proben eingebettet und mikrotomiert. Nach Optimierung des Einbettungsmediums, das die Probe vollständig durchdringen, aushärten und gut zu schneiden sein muß, ohne daß die Probe beispielsweise „bröckelt“, kann die Matrix eingebettet und parallel zur c-Richtung (also quer zu den Matrixlagen) geschnitten werden. Da die Schnitte nur ca. 50-100 nm dick sind, können im Verhältnis zu den makroskopischen Matrixstückchen nur winzige Ausschnitte der gesamten Probe untersucht werden. Da die nichtmineralisierten Bereiche überdies nicht mit dem bloßen Auge von mineralisierten unterschieden werden können, aber ähnlich große, zum Teil sogar größere Ausdehnungen haben, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, in einem nichtmineralisierten Bereich zu mikrotomieren. Natürlich ist es möglich, ein Stück der eingebetten Probe wegzuschneiden, wenn kein Mineral in den Dünnschnitten gefunden wird, um an einer anderen Stelle erneut zu mikrotomieren, doch ist der Erfolg dabei mehr oder weniger dem Zufall überlassen. Es ist nur bedingt möglich, die Positionen der nur am LM erkennbaren mineralisierten Bereiche zu kennzeichnen, da diese Positionen beim Mikrotomieren mit dem bloßen Auge und durch die Einbettungsmasse erkennbar sein müssen. So können lediglich große Bereiche, in denen zufällig eine hohe Dichte an

Mineralinseln vorkommt, gekennzeichnet und mit Glück am Mikrotom wiedergefunden werden. Am SEM hingegen besteht der Vorteil, daß keine Dünnschnitte angefertigt werden müssen und größere Bereiche untersucht werden können. Nachteil ist, daß nur die Oberflächenmorphologie der Probe abgebildet wird. Um das Matrixinnere am SEM dennoch untersuchen zu können, wurden die makroskopischen Stückchen auf -20°C abgekühlt und mit einem Skapell geteilt oder in viele Stücke zerstoßen. So wird die Chance, einen mineralisierten Bereich zu finden, größer als am TEM, doch befindet sich durch das Zerstoßen natürlich auch unspezifisch kristallisiertes CaCO_3 von der Matrixoberfläche verteilt in der Probe. Zudem besteht die Gefahr, die Struktur aus Matrix und Mineral bei der Präparation zu zerstören.

Trotz dieser Schwierigkeiten wurden zahlreiche Proben präpariert, die die Untersuchung

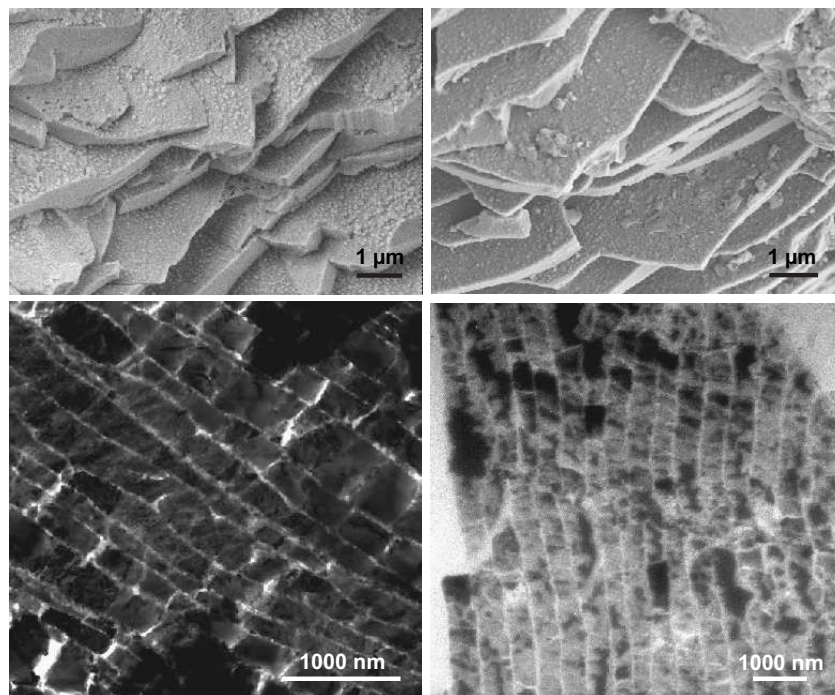


Abbildung 5.28: SEM-Bruchkanten (oben) und TEM-Dünnschnitte (unten) von synthetischem (links) und echtem (rechts) Perlmutter nach 24 Stunden Reaktionszeit.

der remineralisierten Matrix erlauben. Im folgenden wird gezeigt, daß es mit dem retrosynthetischen Ansatz erstmals gelungen ist, künstliches Perlmutter herzustellen, das elektronenmikroskopisch nicht vom Original zu unterscheiden ist.

Es gibt verschiedene Bereiche, die hinsichtlich ihres Mineralgehalts variieren. Abbil-

Abbildung 5.28 zeigt EM-Aufnahmen von Bruchkanten (SEM) und (Quer-)Dünnschnitten (TEM) einer synthetischen Perlmutterprobe an einer Stelle mit hohem Mineralanteil (links) und Aufnahmen echten Perlmutter (rechts) im Vergleich. Kopie und Original sehen vollkommen identisch aus. Die für Perlmutter typische Schichtstruktur ist deutlich zu erkennen. Die SEM-Aufnahmen zeigen die „Nanoasperities“ auf den Plättchen, auf den TEM-Aufnahmen sind die dunklen, elektronendichten Mineralschichten von dünnen, hellen Lagen der organischen Matrix unterbrochen.

Die weitere Analyse der synthetischen Perlmutterproben zeigt Unterschiede zum Original auf, welche auf ihren Bildungsmechanismus schließen lassen und überdies neue Aspekte für die Biomineralisation von Perlmutter in der Natur liefern. Die Plättchen in den remineralisierten Proben sind mit 100-500 nm Höhe etwas dünner und mit bis zu ca. 1,6 μm Länge deutlich kürzer als im Original, wo sie ca. 500 nm dick sind und um die 10 μm laterale Ausdehnung haben. Die geringere laterale Ausdehnung deutet auf eine höhere Nukleationsdichte als im natürlichen Perlmutter hin. Elektronenbeugung an den Plättchen zeigt, daß diese nicht alle die gleiche Orientierung haben, da sie nicht das Beugungsmuster eines Einkristalls zeigen (s. Abb. 5.29 links). Die Beugungsreflexe sind charakteristisch für Calcit, im Gegensatz zu Aragonit im natürlichen Perlmutter. Neben den Plättchen gibt es Bereiche, die weniger stark mineralisiert sind. Diese spiegeln

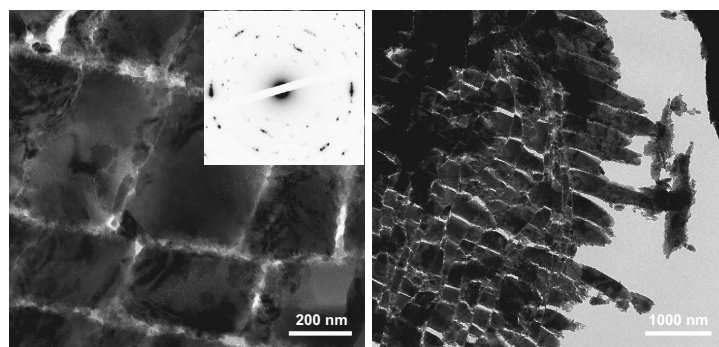


Abbildung 5.29: Plättchen der remineralisierten Matrix mit zugehörigem Elektronenbeugungsbild. Sie haben nicht alle die gleiche Orientierung, die Beugungsreflexe sind charakteristisch für Calcit.

die verschiedenen Schritte der Bildung der Calcitplättchen wider. Abbildung 5.30 zeigt TEM- und SEM-Aufnahmen verschiedener „Mineralisationsstadien“. Es sind Aggregate verschiedener Größe und Form aus Nanopartikeln zu erkennen. Die kleineren sind oft

schmal und hoch, die größeren sind breiter, wobei sie tendenziell unten breiter sind als oben (oben mitte und rechts). Sie wachsen also zuerst (bzw. schneller) in die Höhe, dann in die Breite, bis sie mit ihren Nachbarn zusammenstoßen und den Platz zwischen den Matrixschichten zunehmend ausfüllen. Dies wird auch beim Perlmuttwachstum in der Natur beobachtet. Weiterhin sind die Plättchen, die auf den äußeren Matrixschichten des künstlichen Perlmutts wachsen, deutlich höher als die im Matrixinneren (s. Abb. 5.29 rechts), das heißt, das Wachstum in c-Richtung wird von den Matrixschichten reguliert: berührt ein Plättchen die nächst höhere Matrixschicht, wird sein Höhenwachstum inhiert, so daß es nur noch in die Breite wächst. Diese Limitierung durch die Matrix ist auch für den *in vivo*-Mineralisationsprozeß beschrieben^{63,123,124}

Das Elektronenbeugungsbild der Aggregate besteht aus Punkten, die jedoch anfangen Ringe zu bilden (s. oben mitte, Einschub). Sie sind also polykristallin. Ihre Textur läßt dabei die einzelnen Nanopartikel noch deutlich erkennen. Ss gibt jedoch auch einige Aggregate, die sich zwar in ihrer Form kaum von den anderen unterscheiden, deren Textur jedoch wie die der Plättchen nahezu glatt ist, also keine Nanopartikel mehr erkennen läßt. Die Matrix ist dabei auch in Bereichen sehr geringen Mineralisationsgrades, also nur kleiner und/oder weniger Aggregate (links oben), nicht kollabiert und bietet somit das Gerüst, in dem die Remineralisierung stattfindet.

Mit den Informationen aller EM-Aufnahmen läßt sich ein Bildungsmechanismus des hier synthetisierten künstlichen Perlmutts vorschlagen: Die in der Lösung erzeugten ACC-Precursor oder -Aggregate aus einigen wenigen dieser Precursor, die die einzig zur Verfügung stehenden Nanopartikel sind, werden an der Matrixoberfläche nukleiert, aggregieren und wachsen dort, bis sie schließlich Plättchen bilden. Deren Elektronenbeugungsbild (s. Abb. 5.30 obere Reihe Mitte, Einschub) zeigt anders als das der Aggregate (s. Abb. 5.29) nur wenige Reflexe, d.h. die Plättchen bestehen im Gegensatz zu den polykristallinen Nanopartikel-Aggregaten aus einigen wenigen einkristallinen Bereichen, die wesentlich größer sind als die ursprünglichen Nanopartikel. Sie sind also „oligokristallin“. Dies ist nur möglich, wenn die Plättchen *via* Mesoskalentransformation aus den viel kleineren ACC-Precursoren, die zu größeren einkristallinen Bereichen fusionieren müssen, gebildet werden.

Die verschiedenen Wachstumsstadien, also Nanopartikel, Aggregate und Plättchen, sind

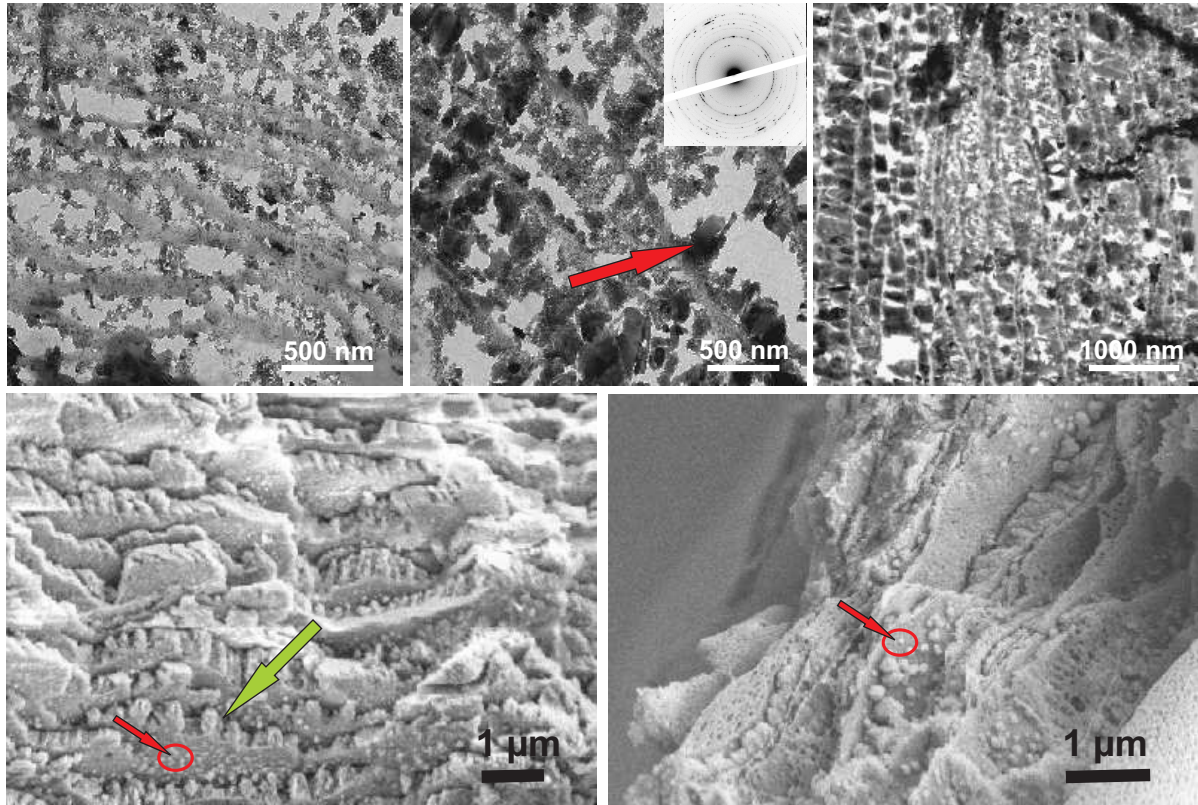


Abbildung 5.30: TEM-Dünnschnitte (oben) und SEM-Bruchkanten (unten) weniger stark mineralisierter Bereiche verschieden alter Proben: Nanopartikel aggregieren (links und mitte, verschieden große Aggregate), und bilden durch Transformation auf der Mesoskala Plättchen (s. Abb. 5.29). Teilweise sind alle Bildungsstadien der Plättchen räumlich dicht beieinander zu sehen (oben rechts). Die Aggregate bestehen nach 24 Stunden Reaktionszeit überwiegend aus Vaterit, danach steigt der Anteil an Calcit (ED-Spektrum Einschub Mitte: Beispiel einer 8 Tage alten Probe). Die Mineralisierung ist nach 24 Stunden abgeschlossen, so daß EM-Aufnahmen älterer Proben sich nicht von denen 24 Stunden alter Proben unterscheiden. SEM-Bruchanten (untere Reihe) vermitteln einen dreidimensionalen Eindruck und zeigen die Nukleation der Nanopartikel auf der Matrix.

oftmals räumlich dicht nebeneinander zu beobachten (s. Abb. 5.30, rechts oben).

Um zu zeigen, daß die Precursor tatsächlich die Bausteine für die Plättchen sind und diese durch deren Aggregation und anschließende Transformation gebildet werden, wurde die Matrix nach 13 Stunden aus der Reaktionslösung isoliert. Die charakteristische Mineral-Matrix-Schichtstruktur ist bereits zu erkennen, doch bestehen die „Plättchen“ im Gegensatz zu älteren Proben aus nicht fusionierten Nanopartikeln (s. Abb. 5.31), wodurch ein potentiell denkbare Ionenwachstum der Plättchen direkt aus der Lösung definitiv ausgeschlossen werden kann. Überdies zeigen diese frühen Stadien, daß die Nanopartikel zuerst oder zumindest schneller aggregieren und den Raum zwischen den Matrixschichten ausfüllen, und erst dann zu „oligokristallinen“ Plättchen transformieren. Die Elektronendiffraktogramme dieser frühen Stadien zeigen polykristallines Vaterit. Es ist durchaus wahrscheinlich, daß es sich dabei um einen Effekt durch die Probenpräparation handelt, bei der instabiles ACC in Vaterit umgewandelt wurde. Diese Möglichkeit wird weiter unten diskutiert.

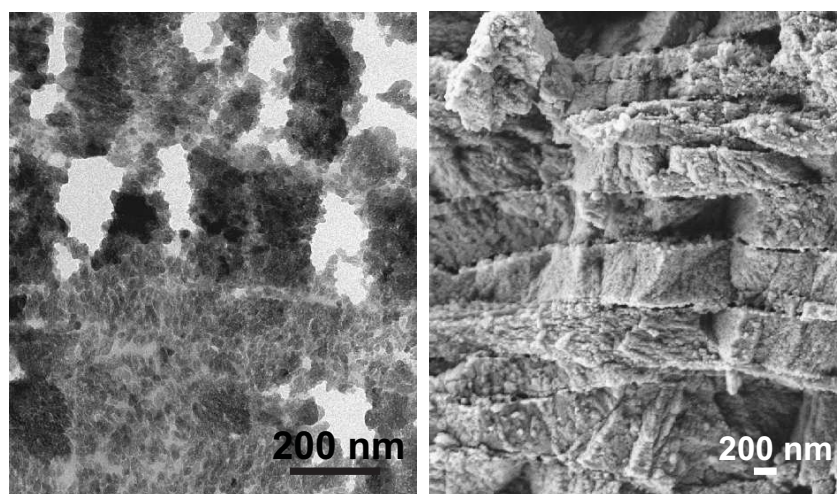


Abbildung 5.31: TEM- und SEM-Aufnahmen einer 13 Stunden alten Probe. Die Schichtstruktur ist bereits ausgebildet. Die „Plättchen“ werden offensichtlich durch die Aggregation von Nanopartikeln gebildet, die in frühen Stadien noch deutlich erkennbar sind.

Nach ungefähr 24 Stunden ist die Remineralisierung der Matrix abgeschlossen: Ihre TEM- und SEM-Aufnahmen unterscheiden sich nicht von denen länger (36 Stunden bis 30 Tage) in der Reaktionslösung belassener Proben. Offensichtlich läuft die Remineralisierung der Matrix nicht vollständig ab, da auch noch nach Reaktionszeiten von über 24 Stunden

neben den Plättchen deren Frühstadien (Aggregate und Nanopartikel) und nicht mineralisierte Bereiche gefunden werden. Eine Erhöhung der $CaCl_2$ -Konzentration, um mehr Material zur Verfügung zu stellen, führt nicht erheblich zur Zunahme des Mineralisationsgrades der Matrix. Es kann jedoch gezeigt werden, daß dieser erhöht werden kann, wenn die Matrix täglich in frische Reaktionslösung gegeben wird. Der Transport in die und die Verteilung der Nanopartikel in der Matrix an sich sind folglich kein oder nur ein sehr geringes Problem, wohl aber die Geschwindigkeit dieser Prozesse. Offensichtlich kann innerhalb einer gewissen Zeit (ca. 24 Stunden) nur eine bestimmte Menge an Precursoren umgesetzt werden, selbst wenn größere Mengen zur Verfügung stehen (höhere $CaCl_2$ -Konzentration). Dies kann damit erklärt werden, daß die Stabilität der Precursor zeitlich begrenzt ist und sie nur während dieser Zeit in die Matrix gelangen und Plättchen ausbilden können. Nach dieser Zeit bricht der Mineralisationsprozeß ab. So hat eine Erhöhung der Precursorkonzentration keinen Einfluß auf den Mineralgehalt, im Gegensatz dazu kann eine tägliche erneute Zufuhr einer geringeren Konzentration diesen erhöhen. Neben oligokristallinen Plättchen und ihren oben beschriebenen Vorstufen gibt es auch oligokristalline Strukturen mit der Morphologie der Aggregate (s. Abb 5.30, mitte oben, Pfeil): Offensichtlich war nicht genug Material vorhanden, um die Matrixzwischenräume vor der Transformation vollständig auszufüllen und Plättchenform anzunehmen.

Es gibt also drei charakteristische Prozesse bei der Remineralisation der Matrix: 1. Die Plättchen werden ausgebildet („Idealfall“). 2. Es ist nicht genügend Material vorhanden, um den Raum zwischen den Matrixschichten vollständig zu füllen, so daß nach der Mesoskalentransformation keine Plättchen, sondern „oligokristalline“ Strukturen unbestimmter Morphologie entstehen. 3. Da pAsp und pAA die ACC-Precursor nur als Intermediate stabilisieren können, kristallisieren die Nanopartikelaggregate nach einer gewissen Zeit unkontrolliert, also ohne die Mesoskalentransformation zu „oligokristallinen“ Plättchen, so daß polykristalline Aggregate gebildet werden. Ebenso sind auch vereinzelt noch nicht - oder nur zu geringem Ausmaß - aggregierte, kristalline Nanopartikel zu finden (s. Abb. 5.30 links oben). Überdies kann die unkontrollierte Kristallisation der ACC-Precursor auch durch die Probenpräparation induziert werden.

Die Elektronendiffraktogramme in Bereichen der Aggregate zeigen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit die Beugungsreflexe von Calcit oder Vaterit. Je länger die Proben in

der Reaktionslösung belassen werden, desto größer ist der Anteil an Calcit. Werden sie nach 24 Stunden oder früher isoliert, liegt nahezu ausschließlich Vaterit vor. Nur in einigen seltenen Fällen werden bereits nach 24 Stunden Aggregate aus Calcit gefunden. Abbildung 5.30 (mitte, Einschub) zeigt das Elektronenbeugungsspektrum der Aggregate einer 8 Tage alten Probe. Es ist charakteristisch für Calcit, ganz schwach wird auch die Gegenwart von wenig Vaterit angezeigt. Die Zunahme des Calcitanteils mit der Reaktionszeit ist zu erwarten und in Übereinstimmung mit den IR-Ergebnissen (s. Abb. 5.27): thermodynamisch weniger stabiles Vaterit wird in Lösung in stabiles Calcit umgewandelt. Um den detaillierten Transformationsprozeß der Nanopartikel aufzuklären und den Zeitpunkt ihrer Kristallisation zu bestimmen, müßten Elektronendiffraktogramme *in situ* aufgenommen werden, so daß Einflüsse durch die Probenpräparation nicht auftreten würden. Das Waschen, Trocknen und Einbetten der Proben ist jedoch unumgänglich. Besonders problematisch ist es daher, festzustellen, ob und wie lange die Precursor in der Matrix amorph sind, da es sich um eine transiente (also höchst instabile) ACC-Phase handelt. Die Detektion solcher Phasen in Biomineralien ist bislang nur äußerst selten gelungen und so aufwendig, daß dies alleine Inhalt einer gesamten Studie sein kann.¹⁷ Trotz dieser Schwierigkeiten kann mit Hilfe der Elektronendiffraktogramme nahezu eindeutig gezeigt werden, daß der Mechanismus der Plättchenbildung in der Matrix wie hier vorgeschlagen auf der Mesoskalentransformation von Precursor-Nanopartikeln beruhen muß: Die Diffraktogramme der Aggregate zeigen Punkte, die anfangen Ringe zu bilden, d.h. die Aggregate sind polykristallin und bestehen aus vielen, statistisch orientierten Kristalliten. Die Diffraktogramme der Plättchen hingegen zeigen nur wenige Reflexe, das heißt, die einkristallinen Bereiche in den Plättchen sind wesentlich größer als in den Aggregaten, was nur möglich ist, wenn entweder mehrere noch amorphe Nanopartikel fusionieren und größere Einkristalle bilden oder die amorphen Nanopartikel erst kristallisieren und dann orientiert aggregieren und fusionieren. Eine dritter in Betracht zu ziehender Mechanismus ist die Auflösung und Rekristallisation der polykristallinen Aggregate in „oligokristalline“ Plättchen. Die Unterscheidung zwischen diesen drei Möglichkeiten kann nicht endgültig getroffen werden, solange es nicht gelingt, sicherzustellen, daß durch die Probenpräparation keinerlei Veränderung an dem System vorgenommen wird. Dann würden entweder amorphe Aggregate gefunden werden, die ersteres beweisen würden, oder poly-

kristalline Aggregate, die die „oligokristallinen“ Plättchen nur durch einen Auflösungs-Rekristallisationsmechanismus bilden könnten. Die zweite genannte Möglichkeit, die orientierte Aggregation der kristallisierten Precursor, kann allerdings mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden, da in diesem Fall bereits die Aggregate „oligokristallin“ und nicht, wie hier beobachtet, polykristallin sein müßten und nur wenige Beugungsreflexe zeigen dürften. Ein Artefakt durch die Probenpräparation ist hierbei sehr unwahrscheinlich, da in diesem Fall potentiell vorhandene „oligokristalline“ in polykristalline Aggregate überführt worden sein müßten. Somit bleiben zwei bislang nicht zu unterscheidende potentielle Transformationsmechanismen der ACC-Precursor aus der Lösung zu Calcitplättchen in der Matrix, die beide mit den Elektronenbeugungsergebnissen in Einklang stehen: Fusion und Kristallisation amorpher Aggregate oder Auflösung und Rekristallisation polykristalliner Aggregate, wobei es sich bei letzterem nicht um eine Transformation auf der Mesoskala handelt. Die SEM-Aufnahmen weisen dabei eindeutig auf die erste Möglichkeit hin: Die Oberfläche der Plättchen des künstlichen Perlmutter ist nicht glatt, wie es im Falle eines Auflösungs- und Rekristallisationsmechanismus zu erwarten wäre, sondern besteht aus Nanopartikeln (s. Abb. 5.28), ähnlich den „Nanoasperities“ im echten Perlmutter (s. Kapitel 2.3).^{65,66} Ein Wachstum über Nanopartikel wäre zudem in Übereinstimmung mit neueren Studien an Perlmutter, die auf amorphe Vorläuferphasen hindeuten.^{16,21} Ein direkter Beweis jedoch kann nur erbracht werden, wenn es gelingt, die offensichtlich extrem instabilen amorphen Aggregate in der Matrix nachzuweisen. Dazu wurde einerseits die Reaktionszeit verkürzt, andererseits die Probenpräparation modifiziert: Wird die Mineralisation nach 8 Stunden gestoppt, ist die Matrix noch nicht mineralisiert. Nach 12-13 Stunden hingegen haben sich bereits zahlreiche Aggregate gebildet, deren Beugungsbild jedoch kristallin ist. Um eine mögliche Kristallisation des in Wasser und Ethanol höchst instabilen ACC's durch den Waschprozeß zu vermeiden, wurden einige Proben mit Methanol anstatt mit Wasser gewaschen. Dennoch ist es nicht möglich, amorphe Aggregate in der Matrix nachzuweisen. Eine denkbare Ursache dafür ist die Kristallisation der Aggregate durch den Trocknungsprozesse. Daher wurden die Proben sofort nach dem Waschen (mit Wasser oder Methanol) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gefriergetrocknet. Dennoch zeigten alle untersuchten Aggregate und Nanopartikel kristalline Diffraktogramme.

Diese Ergebnisse lassen folgenden Schluß zu: Entweder wird das ACC selbst durch die spezielle Probenpräparation nicht ausreichend stabilisiert, so daß es kristallisiert, oder die Aggregate sind nur teilweise amorph. In diesem Fall kann eine amorphe Phase im ED nicht identifiziert werden, da für diese die Abwesenheit von Beugungsreflexen charakteristisch ist- oder die ACC-Precursor kristallisieren bereits außerhalb der Matrix. Letzteres ist jedoch eher unwahrscheinlich, da dann die Plättchen nur über einen Auflösungs-Rekristallisationsmechanismus oder orientierte Aggregation gebildet werden könnten, was beides bereits auf Grund der experimentellen Indizien ausgeschlossen wurde (s.o.). Somit bleibt als einzige experimentelle Alternative, *a priori* stabilere ACC-Precursor zu generieren, um so die amorphen Aggregate vor deren Kristallisation in der Matrix nachzuweisen und damit den vorgeschlagenen Mineralisationsmechanismus zu beweisen.

Dies kann durch Zugabe von Magnesiumionen im Überschuß geschehen (vgl. Kapitel 5.5.1):¹²⁰⁻¹²²

Nachweis von ACC in der Matrix

Bei Magnesium-Calcium-Verhältnissen von 3/1 oder 5/1 - in Meerwasser liegt das Mg/Ca Verhältnis in diesem Bereich¹¹⁶ -, ist es auch nach langer Reaktionszeit möglich, amorphe Aggregate in der Matrix nachzuweisen. Abbildung 5.32 zeigt TEM-Aufnahmen von Aggregaten (links und mitte) und ihr zugehöriges ED-Spektrum (Einschub) einer mit der Gasdiffusionsmethode mineralisierten Probe aus einer 10 mM $CaCl_2$ -, 30 mM $MgCl_2$ -Lösung mit 56 $\mu g/ml$ pAA ($M = 5100$) nach 5 Wochen Reaktionszeit. Das ED-Spektrum ist charakteristisch für amorphes Material. Offensichtlich kann durch das Magnesium auch nach langer Zeit ACC in der Matrix stabilisiert werden, welches nicht einmal bei der Probenpräparation nicht kristallisiert. Neben den ACC-Aggregaten gibt es kristalline Plättchen (rechts), deren Morphologie weniger perfekt als in den „magnesiumfreien“ Proben ist. Dies ist in Übereinstimmung mit der stark ACC-stabilisierenden Wirkung des Magnesium: Die ACC-Precursor aggregieren zwar, der folgende Transformationsprozeß wird jedoch verlangsamt. So gibt es Bereiche, in denen die Matrix komplett mit Nanopartikeln und kleinen Aggregaten ausgefüllt ist, die auch nach 5 Wochen in Lösung nicht zu Plättchen fusioniert sind. SEM-Aufnahmen dieser Bereiche zeigen, daß die Matrixporen groß genug sind, um einen Transport der Partikel durch die Matrixschichten

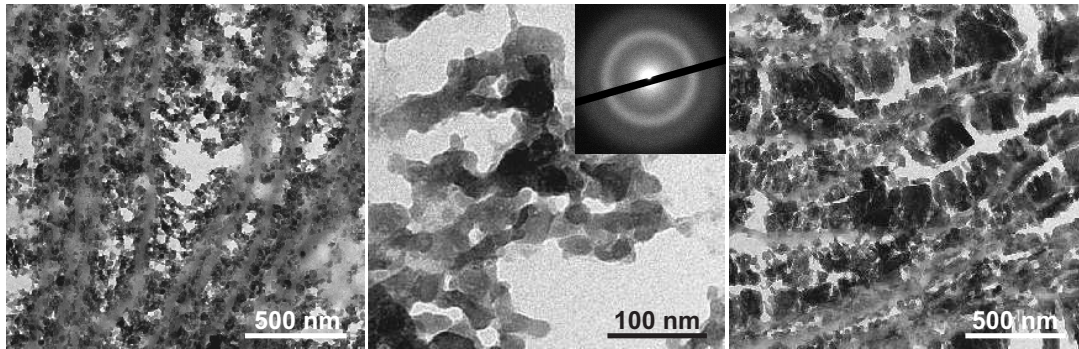


Abbildung 5.32: TEM- Aufnahmen und ED-Spektrum von remineralisierten Proben bei Verhältnissen Mg/Ca=3/1 mit 56 $\mu\text{g/ml}$ pAA (Mw=5100) nach 5 Wochen. Es kann gezeigt werden, daß die Aggregate amorph sind. In anderen Bereichen sind Plättchen gebildet worden, die jedoch weniger gut ausgebildet sind als in den „magnesiumfreien“ Proben

zu ermöglichen (s. Abb. 5.33).

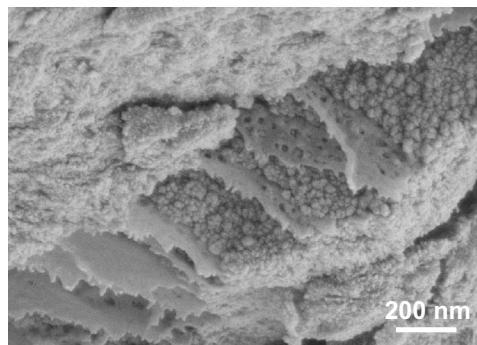


Abbildung 5.33: SEM-Aufnahme einer 5 Wochen in Gegenwart von Magnesium (Mg/Ca=3/1) remineralisierten Probe. Die Matrixzwischenräume sind vollständig mit Nanopartikeln ausgefüllt, die jedoch nicht zu Plättchen fusioniert sind. Die Nanopartikel sind klein genug, um die Matrixporen passieren zu können.

Da die Magnesiumzugabe den Remineralisationsmechanismus als solchen nicht wesentlich im Vergleich zu „magnesiumfreien“ Proben ändert, sondern wegen der Stabilisierung der amorphen Precursorpartikel nur verlangsamt, wie aus Abb. 5.32 und 5.33 ersichtlich, kann mit dem Nachweis der amorphen Nanopartikelaggregate in der Matrix, der oben vorgeschlagene Mechanismus bestätigt werden: Das synthetische Perlmutter wird durch die Mesoskalentransformation, genauer der Aggregation, Fusion und anschließender Kristallisation von ACC-Nanopartikeln in der unlöslichen Perlmuttermatrix gebildet. Es ist dabei

durchaus möglich, daß durch ein „Fine-Tuning“ in Bezug auf die Stabilität der Precursor dieser Prozeß optimiert werden kann: Ist die Stabilität beispielsweise zu groß, findet die Mesoskalentransformation wie im Falle der Magnesiumzugabe hier nur bedingt statt, ist sie zu gering, kristallisieren die Precursor zu Nanokristalliten, bevor sie mesoskopisch transformieren können.

Die WAXS-Diffraktogramme dieser Proben entsprechen keiner der bekannten Kalziumcarbonat- oder anderer Phasen, die in der Gegenwart von Magnesium gebildet werden könnten, wie Magnesiumcalcit, exakt. Die größte Übereinstimmung liegt hierbei zum Diffraktogramm von $CaCO_3$ -Monohydrat vor (s. Abb. 5.34), doch treten auch zu diesem kleine Abweichungen auf. Die Ursachen dafür können im Einbau von Magnesiumionen oder Einschluß von Wasser in das Gitter in anderen Mengen als bei den bekannten Phasen sein. Der gleiche Effekt wurde auch bei der Präzipitation von $CaCO_3$ in Lösung unter

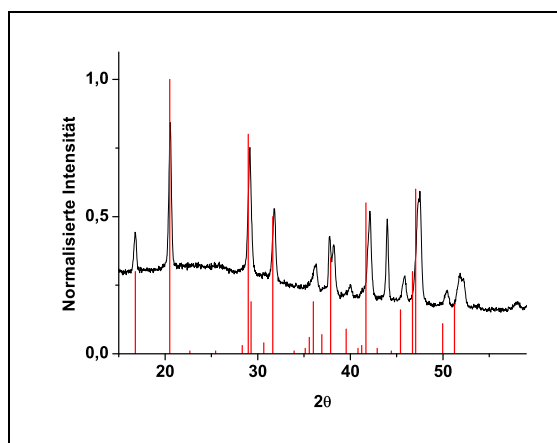


Abbildung 5.34: WAXS Pulver-Diffraktogramm der mit der Gasdiffusionsmethode remineralisierten Matrix bei einem Verhältnis $Mg/Ca=5/1$ nach 5 Wochen. Es entspricht keiner der bekannten $CaCO_3$ - oder anderer Phasen, die in der Gegenwart von Magnesium gebildet werden könnten, exakt, die größte Übereinstimmung wird zum Diffraktogramm von $CaCO_3$ -Monohydrat gefunden.

sonst gleichen Bedingungen gefunden und ist somit typisch für diese Reaktionsbedingungen und nicht auf den Matrixeinfluß zurückzuführen.

Die Bandbreite der Bedingungen, unter denen die Synthese des künstlichen Perlmutts möglich ist (verschiedene Arten, Molmassen, Konzentrationen an Additiven, mit und ohne Mg-Zusatz), beweist eindeutig, daß das Wachstum der Mineralphase des künstlichen

Perlmutter einem „allgemein gültigem“ Mechanismus, nämlich der Mesoskalentransformation von ACC, folgt, für den zwar bestimmte Voraussetzungen gelten (wie die Generierung von ACC und einer Wechselwirkung zwischen Precursor und Matrix), jedoch keine spezifischen Bedingungen wie bestimmte Proteine bei bestimmter Ionenstärke. Dies kann noch weiter untermauert werden:

Retrosynthese mit der Durchflußzelle

Die Remineralisierung ist nicht auf die Gasdiffusionsmethode beschränkt. Auch die Durchflußzelle kann für die Retrosynthese von Perlmutter eingesetzt werden. Hierbei wird $CaCO_3$ präzipitiert, indem eine $CaCl_2$ - und eine Na_2CO_3 -Lösung, die beide jeweils pAA oder pAsp enthalten, zusammengeführt werden (s. Kapitel 4). Es werden dabei eine schnelle, kontinuierliche Bildung von ACC und ein ständiger Durchfluß frischer Precursorlösung ermöglicht, also große Materialmengen zur Verfügung gestellt. Als weiterer Vorteil kann die Remineralisierung unter dem Lichtmikroskop *in situ* verfolgt werden: Bereits nach 1,5 Stunden sind „Mineralinseln“ wie bei der Gasdiffusionsmethode gewachsen. Der Anteil mineralisierter Bereiche ist hier bereits nach 4 Stunden deutlich größer als nach 24 Stunden Remineralisierung mit der Gasdiffusionsmethode. Dies entspricht den Erwartungen, da der Matrix in der Durchflußzelle ununterbrochen Precursor zugeführt werden. TEM-Aufnahmen zeigen, daß der Mineralisationsprozeß weniger „gut“ als bei der Gasdiffusionsmethode abläuft: die Morphologie der Plättchen ist weniger perfekt, zudem gibt es viele Lücken zwischen den einzelnen Plättchen. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da ein ständiger Strom aus Precursorlösung mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 oder 0,02 ml/min durch die Matrix fließt bzw. gepumpt wird und die Nukleation und Aggregation erschweren kann, indem er die Partikel „mitreißt“. Eine Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit, um dies zu vermeiden, ist dabei nur bedingt sinnvoll, da dann einerseits die ACC-Precursor in den Schläuchen und der Zelle kristallisieren, wie bereits bei 0,02 ml/min zu bemerken, und sie andererseits nicht mehr „frisch“ sind. Ebenso wie bei der Gasdiffusionsmethode ist die Remineralisierung bei allen hier untersuchten Konzentrationen und Additiven (s. Kapitel 4) möglich.

Im Gegensatz zur Gasdiffusionsmethode ist der pH-Wert bei der Mineralisierung mit der Durchflußzelle konstant bei 8,5. Da bei beiden Methoden eine Remineralisierung der Ma-

trix möglich ist, deutet dies übereinstimmend mit den ζ -Potential-Messungen (s. Kapitel 5.4.5) darauf hin, daß sich der Zustand der Matrix in Bezug auf die Ladung von nahezu neutralem pH bis pH 9.5 (Gasdiffusionsmethode) und darüber (ζ -Potential-Messung bis pH 10.4) nicht oder nur geringfügig ändert. Es kann also eine konstante Ladungsdichte und -verteilung auf der Matrixoberfläche bei allen Remineralisationsexperimenten angenommen werden.

Dies kann ein Schlüsselfaktor für die Retrosynthese sein: So könnten eine bestimmte Ladungsdichte und -verteilung auf der Matrix und die Generierung von ACC-Precursoren zu den oben erwähnten Voraussetzungen gehören. Sind diese gegeben, kann der Mineralisationsprozeß auch ohne spezifische Biomoleküle ganz oder zu einem gewissen Ausmaß imitiert werden. Es ist beispielsweise denkbar, eine synthetische Matrix zu verwenden, auf die ein Polyelektrolyt adsorbiert ist. Gestützt wird dies von früheren Studien, die beweisen, daß Ladungen eine wichtige Rolle bei der $CaCO_3$ -Kristallisation spielen.^{26,98,117} Spekulativ kann nun behauptet werden, daß *in vivo* eine andere Ladungsdichte als bei den *in vitro*-Bedingungen hier vorliegt, die Aragonit induziert. Dies kann allerdings durch die hier durchgeführten Experimente nicht verifiziert werden. Dennoch beweisen die Ergebnisse, daß die Herstellung komplexer, mit der Natur nahezu identischer Kompositstrukturen durch die Nutzung „allgemeinerer“, physikalisch-chemischer Prinzipien (hier Mesoskalentransformation) zumindest für das Beispiel Perlmutter möglich ist, und die Rolle der Biopolymere somit in gewissem Ausmaß imitiert werden kann.

5.5.4 Deproteinierte Matrix

Um die Rolle der unlöslichen Proteine bei der Retrosynthese näher zu charakterisieren, liegt es auf der Hand, das Remineralisationsverhalten der demineralisierten, deproteinierten Matrix zu untersuchen und mit dem der demineralisierten zu vergleichen. Wie in Kapitel 5.4.4 beschrieben, ist es jedoch zum einen mit der hier verwendeten Protease Subtilisin nicht möglich, die Proteine vollständig zu entfernen. Zum anderen verliert die Matrix mit fortschreitender Deproteinierung ihre Stabilität und wird entlang der Schichten gespalten. Es ist daher nicht sinnvoll, eine zusätzliche Protease zu verwenden, um die Proteine vollständig zu entfernen, da dabei das für die Remineralisierung essentielle

dreidimensionale Matrixgerüst zerstört werden würde, während die nur mit Subtilisin behandelte Matrix zwar mechanisch wesentlich empfindlicher als die unbehandelte ist, ihre Schichtstruktur jedoch zumindest teilweise noch erhalten.

Die Remineralisierung mit der Gasdiffusion einer so behandelten Probe aus 10 mmol/l $CaCl_2$ mit 28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pAsp (Mw = 6000) nach 24 Stunden zeigt, daß die Matrix trotz der Degradation durch die Subtilisin-Behandlung für die ACC-Precursor zugänglich ist und diese die Matrixzwischenräume komplett ausfüllen und aggregieren können. Plättchen werden nicht gebildet. Die ED-Spektren dieser Proben zeigen polykristallines Vaterit. Der Transformationsprozeß der ACC-Precursor zu Calcitplättchen *via* Fusion und Kristallisation findet demnach nicht statt.

Daraus läßt sich schließen, daß die Bildung der Calcitplättchen bzw. die Mesoskalentransformation der ACC-Precursor mit den unlöslichen Proteinen der demineralisierten Matrix gekoppelt ist, welche hier zu einem nicht bekannten Grad durch das Subtilisin abgebaut und degradiert wurden. Es ist dabei nahezu unmöglich, deren genaue Funktion im Transformationsprozeß zu ermitteln, solange sie nicht genau bekannt sind. Selbst in wesentlich einfacheren Systemen mit weniger Komponenten, beispielsweise bei der additivgesteuerten Kristallisation, bei der das Additiv bekannt ist, ist es oftmals nur schwer möglich, den genauen Mechanismus der Kristallisation zu ermitteln.

Da die Retrosynthese von Perlmutter jedoch dann erfolgreich ist, wenn die Matrix nicht mit Subtilisin behandelt wird, obwohl sie bei den *in vitro*-Experimenten hier weit von ihrem natürlichen Zustand entfernt ist, kann es sich bei den Funktionen der Proteine nicht um nur für diese spezifische Wechselwirkungen handeln. Diese bedürften einer bestimmten Mikroumgebung mit definiertem pH, Ionenstärke, anderen Proteinen etc. Folglich müssen „einfachere“ bzw. „allgemeinere“, das heißt, nicht auf diese Proteine limitierte Mechanismen wirken. Von Bedeutung können dabei beispielsweise, wie oben diskutiert, Parameter wie der Einfluß der Ladung, Hydrophilie oder einfach der sterischen Struktur der Matrixoberfläche sein, die von den unlöslichen Proteinen bestimmt werden könnten.

Kapitel 6

Abschließende Diskussion

Sowohl die Untersuchung von natürlichem Perlmutter (s. Kapitel 5.4.1) als auch dessen *in vitro*-Retrosynthese (s. Kapitel 5.5.3) liefern zahlreiche Hinweise, daß das Wachstum von Perlmutter über amorphe Nanopartikel abläuft und nicht, wie klassisch beschrieben, über Ionen und hochspezifische biomolekulare Erkennungsprozesse.

Diese Ergebnisse sind weder mit den üblicherweise als einkristallin beschriebenen Aragonitplättchen im Perlmutter noch mit einer Dominanz spezifischer Biomolekülwechselwirkungen beim Mineralwachstum vereinbar. Jedoch steigt seit einiger Zeit die Zahl der Studien, die die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern können: So wurde gezeigt, daß die Perlmutterplättchen nicht kontinuierlich sind, sondern aus Nanokristalliten bestehen.^{37, 65, 66, 125, 126} Weiterhin wurden Hinweise für amorphe Vorläuferphasen in Perlmutter^{16, 21} und anderen Biomineralien (s. Kapitel 2.2.1) gefunden. Auch gab es bereits einige Studien, die für Biomineralisationsprozesse physikalisch-chemische Prozesse vorschlagen.^{25, 127, 128}

Die Tatsache, daß mit der Retrosynthese ohne die Zugabe von Proteinen künstliches Perlmutter hergestellt werden kann, das aus einer anderen Kristallphase (Calcit statt Aragonit) besteht, legt das Wirken „allgemein“ gültiger Mechanismen bei der Perlmutterbildung nahe. Diese können unter geeigneten Voraussetzungen auch *in vitro* ablaufen und sind nicht auf das definierte Mikroumgebungssystem limitiert, das *in vivo* vorliegt. So widerspricht beispielsweise die Bildung von Calcit dem Epitaxie-Modell, das sich für die Perlmutterbildung etabliert hat und nach dem Aragonit gebildet werden müßte (s. Kapitel 2.3.1).

Obwohl viele Studien zur Aufklärung des Mineralisationsmechanismus und der Rolle be-

stimmter Proteine die Aragonitbildung als einen essentiellen Punkt ansehen, deutet die Retrosynthese deutet darauf hin, daß der Mineralisationsprozeß „allgemeiner“ gültig und nicht auf Aragonit beschränkt ist. Dies wird dadurch gestützt, daß es auch Mollusken-schalen gibt, welche nur aus Calcit bestehen,¹²⁹ und ihre Funktion offensichtlich dennoch erfüllen.

Wie für alle Mechanismen, die aus *in vitro*-Experimenten abgeleitet werden, muß auch im Falle der hier vorgeschlagenen Perlmutterbildung *via* Mesoskalentransformation von ACC-Precursoren geprüft werden, inwieweit diese *in vivo* gültig ist. Doch ist unwahrscheinlich, daß *in vivo* einerseits völlig andere Mechanismen wie hochspezifische biomolekulare Wechselwirkungen von Bedeutung sind, die Mineralisierung aber andererseits *in vitro* ohne diese Wechselwirkungen zu imitieren ist.

Kapitel 7

Zusammenfassung

In dieser Arbeit ist es gelungen, die Bedeutung physikalisch-chemischer Mechanismen in der Biomineralisation gegenüber der bisher angenommenen Dominanz spezifischer biomolekularer Erkennungsmechanismen aufzuzeigen.

Dazu wurden drei Ansätze verfolgt: Zum einen wurden Studien zur Calciumcarbonat-kristallisation durchgeführt. Zum anderen wurde das Biomineral Perlmutter intensiv untersucht. Als drittes wurde ein Modellsystem entwickelt, mit dem künstliches Perlmutter synthetisiert und ein Mechanismus für die Perlmuttermineralisation vorgeschlagen werden konnte.

Im ersten Schritt wurden in einem simplen Kristallisationsansatz komplexe Calciumcarbonatüberstrukturen ohne die Verwendung von Additiven synthetisiert. Es wurde gezeigt, daß diese durch orientierte Anlagerung von Nanopartikeln gebildet werden, bei der dipolare Felder eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Dieser Mechanismus war bislang für Calciumcarbonat unbekannt und ermöglicht die Synthese komplexer Kristallmorphologien, wodurch die Frage aufgeworfen wird, ob er bei der Biomineralbildung von Bedeutung sein kann.

Durch Einsatz minimaler Mengen eines einfachen, synthetischen Additivs bei der Kristallisation wurden zu Überstrukturen angeordnete Aragonitplättchen synthetisiert, die von einer wenige nm dicken Schicht aus amorphen Calciumcarbonat umgeben sind. Eine solche Schicht wurde auch bei den Aragonitplättchen Perlmutter entdeckt (s.u.) und bietet möglicherweise in verschiedenen Systemen eine Erklärung für die Stabilisierung der sonst metastabilen Aragonitphase.

Im zweiten Schritt wurden bei der Untersuchung von natürlichem Perlmutter zwei bislang unbekannte Strukturmerkmale entdeckt: Es gibt Bereiche, die nicht aus den charakteristischen Plättchen bestehen, sondern wesentlich weniger stark mineralisiert sind. Die Mineralphase besteht in diesen Bereichen aus Nanopartikeln. Es wurde weiterhin gezeigt, daß die Aragonitplättchen von einer wenige nm dicken Schicht aus amorphem Calciumcarbonat umgeben ist. Die gängigen Modelle der Perlmutterbildung sind mit diesen Beobachtungen nicht zu vereinbaren und somit zu hinterfragen. Dagegen deuten diese Ergebnisse ein Wachstum von Perlmutter über ACC-Nanopartikel an.

Unter der Annahme der Bedeutung physikalisch-chemischer Mechanismen in der Biomineralisation wurde schließlich als dritter Schritt ein Ansatz zur *in vitro*-Retrosynthese von Biomineralien ausgehend von ihrer unlöslichen Matrix entwickelt.

Mit diesem Ansatz ist es erstmals gelungen, künstliches Perlmutter auf synthetischem Wege herzustellen, das morphologisch nicht vom Original zu unterscheiden ist. Die existierenden Unterschiede konnten zeigen, daß der Mineralisationsprozeß nicht auf ein spezifisches Mikroumgebungssystem beschränkt, sondern „allgemeiner gültig“ sein muß.

Bei der Retrosynthese gibt es zwei Schlüsselfaktoren: Zum einen die demineralisierte unlösliche Perlmuttermatrix als dreidimensionales Gerüst für das künstliche Perlmutter, zum anderen amorphe Precursorpartikel, die die Mineralphase bilden. Es werden keinerlei Proteine oder andere Biomoleküle verwendet. Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit, den Mineralisationsprozeß an einem *in vitro*-Modellsystem zu verfolgen, was für das *in vivo*-System, wenn überhaupt, nur unter starken Einschränkungen möglich ist.

Es wurde gezeigt, daß das künstliche Perlmutter über die Mesoskalentransformation von ACC-Precursoren innerhalb der Matrix gebildet wird und als möglicher Mechanismus bei der Biomineralisation von natürlichem Perlmutter diskutiert.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit konsequent gezeigt werden, daß die Imitation von Biomineralisationsprozessen in *in vitro*-Ansätzen möglich ist, wobei chemisch-physikalische Parameter dominieren.

In zukünftigen Studien sollten einerseits die mechanischen Eigenschaften des künstlichen Perlmutter untersucht werden, wofür sich in Vorversuchen im Rahmen dieser Arbeit die Nanoindentierung als geeignet herausgestellt hat. Es sollte geprüft werden, ob das hier ermittelte Prinzip zur Mineralisierung in der Materialentwicklung angewendet werden

kann. Andererseits sollte die Retrosynthese auf andere Systeme ausgeweitet und *in vivo*-Studien durchgeführt werden, um die Gültigkeit der vorgeschlagenen Mechanismen zu überprüfen.

Anhang A

Anhang

A.1 Modifizierung der Matrix

Um das künstliche Perlmutter wie *in vivo* mit Plättchen aus Aragonit zu synthetisieren, sollte der in Kapitel 5.3 beschriebene Ansatz genutzt werden. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten: Werden die PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMAA-Mikrogelpartikel direkt als Additiv in die Reaktionslösung gegeben, kann die Matrix nicht mineralisiert werden, wobei ein offensichtlicher Grund bereits die Größenverhältnisse sind: die Abstände zwischen den Matrixschichten sind mit maximal 500 nm deutlich kleiner als die - in Abhängigkeit von Ionenstärke und pH- ungefähr 1000 nm großen Partikel, so daß diese bereits aus sterischen Gründen nicht ins Matrixinnere gelangen können, um dort die Mineralisation zu beeinflussen. Zudem generieren sie keine ACC-Precursor in der Lösung, welche jedoch eine unabdingliche Komponente zu sein scheinen, um Mineralphase in die Matrix zu transportieren. Daher ist es sinnvoll, einen anderen Ansatz zu wählen und die Matrix als solche mit Aragonit induzierenden Additiven zu „beschichten“ oder in irgendeiner Weise zu modifizieren und unabhängig davon in der Lösung die ACC-Precursor erzeugen. So kann ACC in die Matrix transportiert werden und dessen Kristallisationsprozeß durch die Modifizierung möglicherweise so beeinflußt werden, daß Aragonit gebildet wird. Die Verknüpfung der modifizierenden Komponente mit der Matrix ist allerdings nicht unproblematisch, da die Zusammensetzung der Matrixproteine nur teilweise und ihre Verteilung und Anordnung auf der Oberfläche der Matrixschichten kaum bekannt ist. Werden daher die Proteine entfernt, um das Chitin als bekannte Komponente aus dem Innern der

Matrixschichten (vgl. Kapitel 2.3) zu isolieren, so daß die zu modifizierende Komponente bekannt ist, wird durch die Deproteinierung die dreidimensionale Struktur der Matrix und somit das Templat für die Remineralisierung zerstört (vgl. Kapitel 5.4.4, 5.5.4). Es ist also unumgänglich, die mehr oder weniger unbekannt Proteine auf der Matrixoberfläche zu belassen, wodurch kaum geeignete Reaktionsbedingungen für die Modifizierung vorherzusagen oder gar eine kontinuierliche Beschichtung der Oberfläche zu erwarten ist. Da jedoch, wie in Kapitel 5.3 gezeigt, schon minimale Mengen an PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMAA-Mikrogelpartikeln große Mengen an Aragonit bilden können, besteht potentiell die Möglichkeit, daß bereits eine unregelmäßige und wenig dichte Modifizierung ausreicht, um in der gesamten Matrix Aragonit zu induzieren. Die Mikrogelpartikel als solche sind, wie oben ausgeführt, größer als die Abstände zwischen den Matrixschichten, so daß es unwahrscheinlich erscheint, sie zur Modifizierung der Oberflächen im Innern der Matrixstücke nutzen zu können. Ein Weg das Größenproblem zu umgehen, ist, anstelle der Mikrogelpartikel als Ganze nur ihre einzelnen Blöcke oder sogar deren Monomere für die Modifizierung einzusetzen, die klein genug für die Matrixzwischenräume sind. Dies bietet zugleich eine gewisse Variationsmöglichkeit der verschiedenen Komponenten, um Polymere verschiedener Zusammensetzung zu erzeugen.

Die Polymere wurden dabei in Gegenwart der Matrix mittels radikalischer Polymerisation synthetisiert, mit der Aussicht, daß sie dabei zumindest an einige der Matrixproteine gebunden werden können. Als Edukte wurden der PDEAEMA-Block alleine (s.u. 2 und 5), der PDEAEMA-Block mit NIPAM (s.u. 3 und 6) und der PDEAEMA-Block mit NIPAM und t-BuMA (s.u. 4). Zusätzlich wurde die Reaktion auch in Gegenwart der PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMAA-Mikrogelpartikel durchgeführt (s.u. 1), welche durch das Erwärmen während der Reaktionsführung aufgrund der Mikrogeleigenschaften schrumpfen. Im Falle des PDEAEMA-Blocks (s.u. 2 und 5) und PDEAEMA-Block mit NIPAM als Edukte (s.u. 3 und 6) wurden zwei verschiedene Radikalstarter getestet.

Die Matrixstücke wurden direkt nach den Modifizierungsexperimenten gewaschen und in die Remineralisierungsexperimente gegeben. Trotz der Beanspruchung durch die Reaktionsbedingungen (s.u.: Erhitzen auf 60°C, kontinuierliche Rotation, Radikale) sind die Stücke nicht zerstört, sondern lediglich teilweise entlang der Schichten gespalten worden. Dies zeigt die extreme Stabilität der Perlmuttermatrix, vor allem innerhalb der einzelnen

Schichten. Die Stücke wurden intensiv gewaschen und direkt für die Remineralisierungsexperimente, die wie bei der unbehandelten Matrix durchgeführt wurden (s. Kapitel 4), weiterverwendet. Für jede der fünf Modifizierungsvarianten wurde die Matrix nach je 24 Stunden und 4 Tagen Mineralisationszeit mittels LM, TEM, und ED untersucht. Im LM sind die typischen Inseln zu erkennen. Übereinstimmend dazu zeigen TEM-Aufnahmen, daß die Matrix im Innern zwar mineralisiert wurde. Die "Remineralisierungsqualität" ist jedoch bei allen Proben deutlich schlechter als bei unbehandelten, unter identischen Bedingungen remineralisierten Proben. So machen hier Aggregate oder Nanopartikel den größten Mineralanteil aus. Es wurden wesentlich weniger Plättchen gebildet, in denen die Nanopartikel zudem nicht fusioniert sind. Die ED-Spektren dieser Charakteristika (nicht fusionierte Plättchen, Aggregate, Nanopartikel) sind bei allen Proben typisch für Vaterit. Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß es mit den hier gewählten Edukten und Reaktionsbedingungen nicht möglich ist, Aragonit innerhalb der Matrix zu bilden. Ursachen dafür können sein, daß die jeweiligen Komponenten in den Modifizierungsexperimenten nicht oder nicht in ausreichendem Maße an die Matrix gebunden wurden oder aber diese zwar modifiziert werden konnte, damit aber dennoch nicht die Voraussetzungen für die Nukleation von Aragonit geschaffen wurden. Es ist davon auszugehen, daß der Anteil potentiell an die Matrix gebundener Komponenten sehr gering ist, so daß es sehr aufwendig wäre, eine Modifizierung der Oberfläche nachzuweisen und die Zusammensetzung der Komponenten zu bestimmen. Da durch die hier durchgeführten Experimente kein Aragonit bei der Retrosynthese von Perlmutter induziert wurde, wurde auf eine weitere Analyse der behandelten Matrix verzichtet. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Matrix eine extreme Behandlung wie hier bei einer chemischen Reaktion gut überstehen kann und weiterhin für die ACC-Precursor zugänglich ist, also als dreidimensionales Templat bei der Remineralisierung dienen kann. In zukünftigen ausführlichen Studien sollte daher die Möglichkeit der Oberflächenmodifizierung der Matrix systematisch zur Nukleation von Aragonit in der Retrosynthese untersucht werden.

Experimenteller Teil Modifizierung

Je 27-55 mg (Feuchtgewicht) Matrixstücke wurden in eine Lösung von 10 ml H_2O mit den entsprechenden Edukten (s.u. 1-4) gegeben. Die Lösungen wurden auf 60°C erhitzt, und die Reaktion durch Zugabe der jeweiligen Radikalstarter (s.u. 1-4) gestartet und 20 Stunden bei 60 °C unter kontinuierlicher Rotation der Proben (ca. 20 U/min.) fortgeführt. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf Zimmertemperatur beendet.

Die Matrixstücke wurden in Wasser gewaschen und direkt für die Remineralisationsexperimente weiterverwendet: Diese wurden wie in Kapitel 4 beschrieben mit der Gasdiffusionsmethode mit einer Konzentration von 10 mM $CaCl_2$ und 28 $\mu\text{g/ml}$ pAsp (M = 6000) durchgeführt.

Edukte in 10 ml H_2O :

1) 0,21g PDEAEMA-b-PNIPAM-b-PMAA, Starter 0,04 g Ce^{4+} in 0,5 ml HNO_3 (1 mol/l)

2) 0,21 g PDEAEMA

Starter Ce^{4+} in 0,5 ml HNO_3 (1 mol/l)

3) 0,21 g PDEAEMA und 0,3 g NIPAM, Starter 0,04 g Ce^{4+} in 0,5 ml HNO_3 (1 mol/l)

4) 0,21 g PDEAEMA, 0,3 g NIPAM und 0,4 g t-BuMA, Starter 0,04 g Ce^{4+} in 0,5 ml HNO_3 (1 mol/l)

5) 0,21 g PDEAEMA, Starter 0,04 g 2,2'-Azobis[2-methyl-N-(2-hydroxyethyl)propionamid]

6) 0,21 g PDEAEMA und 0,3 g NIPAM, Starter 0,04 g 2,2'-Azobis[2-methyl-N-(2-hydroxyethyl)propionamid]

A.2 Kontrollexperimente der Retrosynthese

In Abwesenheit einer der beiden Schlüsselkomponenten - amorphe Precursor oder die Matrix - ist die Retrosynthese nicht möglich. Dies ist auf Abbildung A.1 dargestellt. Wird keine pAsp oder pAA zugesetzt, also keine ACC-Precursor gebildet, werden auf der Matrix typische Calcitrhomboeder beobachtet, sie wird nicht mineralisiert. Werden die Precursor in Gegenwart eines Glassubstrates anstatt der Matrix erzeugt, präzipitieren spherische Partikel auf dem Substrat.

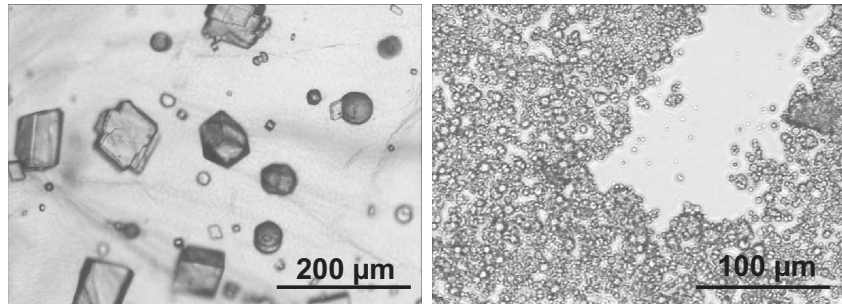


Abbildung A.1: LM-Aufnahmen von der Matrix (links) und einem Glassubstrat (rechts) der Kontrollexperimente:

A.3 Probenpräparation für die TEM-Untersuchungen

Pulverförmige Proben wurden in H_2O oder Methanol dispergiert. ein Tropfen wurde auf ein mit Kohlenstoff bedampftes Kupfernetz gegeben und eintrocknen gelassen.

Für die Ultradünschnitte wurden die Proben in entsprechend kleine Stücken geteilt und in LR White Resin (Medium Grade) eingebettet. Nach einer Trocknungszeit von 5-7 wurden die Proben an einem Leica Ultracut UCT mikrotomiert.

A.4 Abkürzungsverzeichnis

ED	Elektronenbeugung
HRTEM	Hochauflösungstransmissionselektronenmikroskopie
LM	Lichtmikroskopie
M	Molmasse
mM	millimolar
pAA	Polyacrylsäure
pAsp	Polyasparaginsäure
PDEAEMA	Poly-(Diethylaminoethylmethacrylat)
PMAA	Polymethacrylsäure
PNIPAM	Poly-(N-Isopropylacrylamid)
SEM	Rasterelektronenmikroskopie
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
WAXS	Röntgenweitwinkelstreuung

Literaturverzeichnis

- [1] Kleber, Bautsch, and Bohm. *Einführung in die Kristallographie*. VEB Verlag Technik, Berlin, **1977**.
- [2] G. Wulff. On the question of speed of growth and dissolution of crystal surfaces. *Zeitschrift für Kristallographie und Mineralogie*, 34:449–530, **1901**.
- [3] J. O. Titiloye, S. C. Parker, and S. Mann. Atomistic simulation of calcite surfaces and the influence of growth additives on their morphology. *J. Cryst. Growth*, 131:533–545, **1993**.
- [4] S. Mann, J. M. Didymus, N.P. Sanderson, E. J. Aso-Samper, and B.R. Heywood. Morphological influence of functionalized and non-functionalized α,ω -Dicarboxylates on calcite crystallization. *J. Chem. Soc. Faraday. Trans.*, 86:1873–1880, **1990**.
- [5] S. Mann. The chemistry of form. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39:3392–3406, **2000**.
- [6] H. A. Lowenstam and S. Weiner. *On Biomineralization*. Oxford University Press, New York, **1989**.
- [7] S. M. Kidwell. Shell composition has no net impact on large-scale evolutionary patterns in mollusks. *Science*, 307:914–917, **2005**.
- [8] M. Epple. *Biomaterialien und Biomineralisation*. Teubner, Wiesbaden, **2003**.
- [9] L. Pereira-Mouriès, M.-J. Almeida, C. Ribeiro, J. Peduzzi, M. Barthèlemy, C. Milet, and E. Lopez. Soluble silk-like organic matrix in the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima*. *Eur. J. Biochem.*, 269:4994–5003, **2002**.
- [10] F. Marin and G. Luquet. Molluscan shell proteins. *C. R. Palevol*, 3:469–492, **2004**.
- [11] S. Weiner, W. Traub, and H. A. Lowenstamm. Organic matrix in calcified exoskeletons. In P. Westbroek und E. W. de Jong, editor, *Biomineralization and Biological Metal Accumulation*, pages 205–224. D. Reidel Publishing Company, **1983**.
- [12] J. R. Clarkson, T. J. Price, and C. J. Adams. Role of metastable phases in the spontaneous precipitation of calcium-carbonate. *J. Chem. Soc.-Faraday Trans.*, 88:243–249, **1992**.
- [13] L. Addadi, S. Raz, and S. Weiner. Taking advantage of disorder: Calcium carbonate and its roles in biomineralization. *Adv. Mater.*, 15:959–970, **2003**.
- [14] C. Günther, A. Becker, G. Wolf, and M. Epple. In vitro synthesis and structural characterization of amorphous calcium carbonate. *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 631:2830–2836, **2005**.

- [15] J. Aizenberg, G. Lambert, S. Weiner, and L. Addadi. Factors involved in the formation of amorphous and crystalline carbonate: A study of an ascidian skeleton. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:32–39, **2002**.
- [16] I. M. Weiss, N. Tuross, L. Addadi, and S. Weiner. Mollusc larval shell formation: Amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *J. Exp. Biolog.*, 293:478–491, **2002**.
- [17] Y. Politi, T. Arad, E. Klein, S. Weiner, and L. Addadi. Sea urchin spine calcite forms via a transient amorphous calcium carbonate phase. *Science*, 306:1161–1164, **2004**.
- [18] J. Aizenberg, S. Weiner, and L. Addadi. Coexistence of amorphous and crystalline calcium carbonate in skeletal tissues. *Connective Tissue Research*, 44:20–25, **2003**.
- [19] H. Cölfen and S. Mann. Geordnete mesoskopische strukturen durch selbstorganisation und transformation von hybrid-nanostrukturen. *Angew. Chem.*, 115:2452–2468, **2003**.
- [20] K. Simkiss and K. M. Wilbur. *Biom mineralization- Cellbiology and Mineral Deposition*. Academic Press, Inc., New York, **1989**.
- [21] L. Addadi, D. Joester, F. Nudelman, and S. Weiner. Mollusc shell formation: A source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem. Eur. J.*, 12:980–987, **2006**.
- [22] L. A. Gower and D. A. Tirell. Calcium carbonate films and helices grown in solutions of poly(aspartate). *J. Cryst. Growth*, 191:153–160, **1998**.
- [23] M. J. Olszta, D. J. Odom, E. P. Douglas, and L. B. Gower. A new paradigm for biomineral formation: Mineralization via an amorphous liquid-phase precursor. *Connective Tissue Research*, 44:326–334, **2003**.
- [24] M. Faatz, F. Gröhn, and G. Wegner. Amorphous calcium carbonate: Synthesis and potential intermediate in biomineralization. *Adv. Mater.*, 16:996–1000, **2004**.
- [25] D. Volkmer, M. Harms, L. Gower, and A. Ziegler. Morphosynthese lamellierter perlmutterartiger $CaCO_3$ -Dünnschichten und -Beschichtungen. *Angew. Chem.*, 117:645–650, **2005**.
- [26] E. DiMasi, V. M. Patel, S. Munisamy, M. Olszta, and L. B. Gower. Synthetic seashells: Biomimetic mineral nucleation at a langmuir monolayer. *NLS Activity Report*, **2001**.
- [27] M. J. Olszta, E. P. Douglas, and L. B. Gower. Scanning electron microscopic analysis of the mineralization of type 1 collagen via a polymer-induced liquid-precursor (pilp) process. *Calcif. Tissue Int.*, 72:583–591, **2003**.
- [28] H. Cölfen and M. Antonietti. Mesocrystals: Inorganic superstructures made by highly parallel crystallization and controlled alignment. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44:2–17, **2005**.
- [29] S. Weiner, I. Sagi, and L. Addadi. Choosing the crystallization path less traveled. *Science*, 309:1027–1028, **2005**.
- [30] R. L. Penn and J. F. Banfield. Morphology development and crystal growth in nanocrystalline aggregates under hydrothermal conditions: Insights from titania. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 63:1549–1557, **1999**.

- [31] S.-F. Chen, S. H. Yu, T. X. Wang, J. Jiang, H. Cölfen, B. Hu, and B. Yu. Polymer-directed formation of unusual $CaCO_3$ pancakes with controlled surface structures. *Adv. Mater.*, 17:1461–1465, **2005**.
- [32] J. Polleux, N. Pinna, M. Antonietti, and M. Niederberger. Ligand-directed assembly of preformed titania nanocrystals into highly anisotropic nanostructures. *Adv. Mater.*, 16:436–439, **2004**.
- [33] H. G. Yang and H. C. Zeng. Self-construction of hollow SnO_2 octahedra based on two-dimensional aggregation of nanocrystallites. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43:5930–5933, **2004**.
- [34] R. Kniep and S. Busch. Biomimetic growth and self-assembly of fluorapatite aggregates by diffusion into denatured collagen matrices. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 35:2624–2627, **1996**.
- [35] S. Busch, H. Dolhaine, A. DuChesne, S. Heinz, O. Hochrein, F. Laeri, O. Podebrand, U. Vietze, T. Weiland, and R. Kniep. Biomimetic morphogenesis of fluorapatite-gelatin composites: Fractal growth, the question of intrinsic electric fields, core/shell assemblies, hollow spheres and reorganization of denatured collagen. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 10:1643–1853, **1999**.
- [36] I. Sethmann, A. Putnis, O. Grassmann, and P. Löbmann. Observation of nano-clustered calcite growth via a transient phase mediated by organic polyanions: A close match for biomineralization. *American Mineralogist*, 90:1213–1217, **2005**.
- [37] M. Rousseau, E. Lopez, P. Stempfèle, M. Brendlè, L. Franke, A. Guette, R. Naslain, and X. Bourrat. Multiscale structure of sheet nacre. *Biomaterials*, 26:6254–6262, **2005**.
- [38] S. Wohlrab, N. Pinna, M. Antonietti, and H. Cölfen. Polymer-induced of dl-alanine nanocrystals to crystalline mesostructures. *Chem. Eur. J.*, 11:2903–2913, **2005**.
- [39] N. Jongen, P. Browen, J. Lemaitre, J. C. Valmalette, and H. Hoffmann. Precipitation of self-organized copper oxalate polycrystalline particles in the presence of hydroxypropyl-methylcellulose (HPMC): Control of morphology. *J. Colloid Interface Sci.*, 226:189–198, **2000**.
- [40] B. Judat and M. Kind. Morphology and internal structure of barium sulfate-derivation of a new growth mechanism. *J. Colloid Interface Sci.*, 269:341–353, **2004**.
- [41] T. Vossmeier, G. Reck, L. Katsikas, E. T. K. Haupt, B. Schulz, and H. Weller. A „double-diamond superlattice“ built up of $Cd_17S_4(SCH_2CH_2OH)_{26}$ clusters. *Science*, 267:1476–1478, **1995**.
- [42] E. V. Shevchenko, D. V. Talapin, A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Haase, and H. Weller. Colloidal synthesis and self-assembly of $CoPt_3$ nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:11480–11485, **2002**.
- [43] J. J. Petres, G. Dezelic, and B. Tezak. Monodispers sols of barium sulfate electron-microscopic study of internal structure of particles. *Croat. Chem. Acta*, 41:183, **1969**.
- [44] M. Antonietti and G. A. Ozin. Promises and problems of mesoscale materials chemistry or why meso? *Chem. Eur. J.*, 10:28–41, **2004**.
- [45] C. P. Collier, T. Vossmeier, and J. R. Heath. Nanocrystal superlattices. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 49:371–404, **1998**.

- [46] F. X. Redl, K. S. Cho, C. B. Murray, and S. O. Brien. Three-dimensional binary superlattices and semiconductor quantum dots. *Nature*, 423:968–971, **2003**.
- [47] F. Song, A. K. Soh, and Y. L. Bai. Structural and mechanical properties of the organic matrix layers of nacre. *Biomaterials*, 24:3623–3631, **2003**.
- [48] J. S. Lee, Y. J. Lee, E. L. Tae, Y. S. Park, and K. B. Yoon. Synthesis of zeolite as ordered multicrystal arrays. *Science*, 301:818–821, **2003**.
- [49] A. Sellinger, P. M. Weiss, A. Nguyen, Y. Lu, R. A. Assink, W. Gong, and C. J. Brinker. Continuous self-assembly of organic-inorganic nanocomposite coatings that mimic nacre. *Nature*, 394:256–260, **1998**.
- [50] Z. Tang, N. A. Kotov, S. Magonov, and B. Ozturk. Nanostructured artificial nacre. *Nat. Mater.*, 21:413–418, **2003**.
- [51] Y. Levi-Kalisman, G. Falini, L. Addadi, and S. Weiner. Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-tem. *Critical Reviews in Biochemistry*, 20:365–408, **2002**.
- [52] J. D. Currey. Mechanical properties of mother of pearl in tension. *Proc. R. Soc. Lond.*, 196:443,, **1977**.
- [53] F. Song and Y. L. Bai. Effects of nanostructures on the fracture strength of the interfaces in nacre. *J. Mater. Res.*, 18:1741–1744, **2003**.
- [54] H. Nakahara. An electron microscope study of growing surface of nacre in two gastropod species, *Turbo cornutus* and *Tegula pfeifferi*. *Venus*, 38:205–211, **1979**.
- [55] S. Weiner. Organization of extracellularly mineralized tissues: A comparative study of biological crystal growth. *Critical Reviews in Biochemistry*, 20:365–408, **1986**.
- [56] R. Giles, S. Manne, S. Mann, D. E. Morse, G. D. Stucky, and P. K. Hansma. Inorganic overgrowth of aragonite on molluscan nacre examined by atomic force microscopy. *Biol. Bull.*, 188:8–15, **1995**.
- [57] C. M. Zaremba, A. M. Belcher, M. Fritz, Y. Li, S. Mann, P. K. Hansma, D. E. Morse, J. S. Speck, and G. D. Stucky. Critical transitions in the biofabrication of abalone shells and flat pearls. *Chem. Mater.*, 8:679–690, **1996**.
- [58] T. E. Schäffer, C. Ionescu-Zanetti, R. Proksch, M. Fritt, D. A. Walters, N. Almqvist, C. M. Zaremba, A. M. Belcher, B. L. Smith, G. D. Stucky, D. E. Morse, and P. K. Hansma. Does abalone nacre form by heteroepitaxial nucleation or by growth through the mineral bridges? *Chem. Mater.*, 9:1731–1740, **1997**.
- [59] I. M. Weiss, C. Renner, M. G. Strigl, and M. Fritz. A simple and reliable method for the determination and localization of chitin in abalone nacre. *Chem. Mater.*, 13:3252–3259, **2002**.
- [60] G. Falini, S. Albeck, S. Weiner, and L. Addadi. Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science*, 271:67–69, **1996**.
- [61] S. Weiner and W. Traub. Macromolecules in mollusc shells and their functions in biomineralization. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 304:425–434, **1984**.

- [62] S. Weiner and W. Traub. X-ray diffraction study of the insoluble organic matrix of mollusk shells. *FEBS Letters*, 111:311–316, **1980**.
- [63] A. M. Belcher and E. E. Gooch. Protein components and inorganic structure in shell nacre. In E. Baeuerlein, editor, *Biom mineralization*. WILEY-VCH, **2001**.
- [64] S. Blank, M. Arnoldi, S. Khoshnavaz, L. Treccani, M. Kuntz, K. Mann, G. Grathwohl, and M. Fritz. The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals. *PNAS*, 212:280–291, **2003**.
- [65] R. Z. Wang, A. G. Evans, N. Yao, and I. A. aksay. Deformatipon mechanisms in nacre. *J. Mater. Res.*, 16:2485–2493, **2001**.
- [66] W.-C. Chang X. Li, Y. J. Chao, R. Wang, and M. Chang. Nanoscale structural and mechanical characterization of a natural nanocomposite material: The shell of red abalone. *Nano Lett.*, 4:613–617, **2004**.
- [67] A. Checa. A new model for periostracum and shell formation in unionidae (bivalvia, mollusca. *Tissue and Cell*, 32:405–416, **2000**.
- [68] I. M. Weiss, S. Kaufmann, K. Mann, and M. Fritz. Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 267:17–21, **2000**.
- [69] H. Nakahara. Calcification of gastropod nacre. In P. Westbroek und E. W. de Jong, editor, *Biom mineralization and Biological Metal Accumulation*, pages 225–230. D. Reidel Publishing Company, **1983**.
- [70] S. Weiner. Aspartic acid-rich proteins: Major components of the soluble organic matrix of mollusc shells. *Calcif. Tissue Int.*, 29:163–167, **1979**.
- [71] M. Rousseau, E. Lopez, A. Coutè, G. Mascarel, D. C. Smith, R. Naslain, and X. Bourrat. Sheet nacre growth mechanism: a voronoi model. *Journal of Structural Biology*, 149:149–157, **2005**.
- [72] R. Allmann. *Roentgenpulverdiffraktogramme*. Verlag Sven, **1980**.
- [73] W. L. Bragg. *Nature*, 90, **1912**.
- [74] S. L. Flegler, J. W. John, and K. L. Klomparens. *Elektronenmikroskopie*. SPEKTRUM Akademischer Verlag, **1995**.
- [75] P. Schlossmacher, A. Thessen, and G. Nenner. Zeiss’s record breaking ultra high resolution TEM. *European Semiconductor*, 27:1–4, **2005**.
- [76] D. Skoog and J. Leary. *Instrumentelle Analytik: Grundlagen-Geräte-Anwendungen*. Springer, **1996**.
- [77] R. H. Müller. *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **1995**.
- [78] L. Addadi, J. Moradian, E. Shay, N .G. Maroudas, and S. Weiner. A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84:2732–2736, **1987**.

- [79] Y. Kitano, K. Park, and D. W. Hood. Pure aragobite synthesis. *J. Geophys. Res.*, 67:4873, **1962**.
- [80] M. Sedlák, M. Antonietti, and H. Cölfen. Synthesis of a new class of double-hydrophilic block copolymers with calcium binding capacity as builders and for biomimetic structure control of minerals. *Macromol. Chem. Phys.*, 199:247–254, **1998**.
- [81] A. C. Neira, M. S. Fernández, J. Retuert, and J. L. Arias. Effect of the crystallization chamber design on the polymorphs of calcium carbonate using the sitting-drop method. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, ESX-1(H6.18.1.-6):522–529, **2004**.
- [82] W. Hao, S. Qiang, Z. Ying, W. Dujin, and X. Duanfu. Crystallization habit of calcium carbonate in the presence of sodium dodecyl sulfate and/or polypyrrolidone. *J. Cryst. Growth*, 260:511–516, **2004**.
- [83] L. Dupont, F. Portemer, and M. Figlarz. Synthesis and study of a well crystallized $CaCO_3$ vaterite showing a new habitus. *J. Mater. Chem.*, 7:797–800, **1997**.
- [84] B. R. Heywood, S. Rajam, and S. Mann. Oriented crystallization of $CaCO_3$ under compressed monolayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 87:735–743, **1991**.
- [85] M. Sedlak and H. Cölfen. Synthesis of double-hydrophilic block copolymers with hydrophobic moieties for the controlled crystallization of minerals. *Macromol. Chem. Phys.*, 202:587–597, **2001**.
- [86] L. Pastero, E. Costa, E. Bruno, M. Rubbo, G. Sgualdino, and D. Aquilano. Morphology of calcite ($CaCO_3$) crystals growing from aqueous solutions in the presence of Li^+ ions. surface behavior of the (0001) form. *Cryst. Growth Des.*, 4:485–490, **2004**.
- [87] Y. Kojima, A. Sodomoto, T. Yasue, and Y. Arai. Control of crystal shape and modification of calcium carbonate prepared by precipitation from calcium hydrogencarbonate solution. *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 100:1128–1135, **1992**.
- [88] S. Mann, B. R. Heywood, S. Rajam, and J. D. Birchall. Interfacial control of nucleation of calcium carbonate under organized stearic acid monolayers. *Proc. R. Soc. London A*, 423:457–471, **1989**.
- [89] N. Gehrke und H. Cölfen, N. Pinna, M. Antonietti, and N. Nassif. Superstructures of calcium carbonate crystals by oriented attachment. *J. Cryst. Growth Des.*, 5:1317–1319, **2005**.
- [90] A. M. Belcher, X. H. Wu, R. J. Christensen, P. K. Hansma, G. D. Stucky, and D. E. Morse. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollus-shell proteins. *Nature*, 381:56–58, **1996**.
- [91] C. FINDER, M. Wohlgemuth, and C. Mayer. Analysis of particle size distribution by particle tracking. *Part. Part. Syst. Charact.*, 21:372–378, **2004**.
- [92] H. Cölfen and L. Qi. A systematic examination of the morphogenesis of calcium carbonate in the presence of a double-hydrophilic block copolymer. *Chem. Eur. J.*, 7:106–116, **2001**.
- [93] J. Rieger. A new approach towards an understanding of scaling in the presence of polycarboxylates. *Tenside Surfactants Deterg.*, 39:221–225, **2002**.
- [94] R. R. Netz. Debye-hückel theory for slab geometries. *Eur. Phys. J. E*, 3:131–141, **2000**.

- [95] T. X. Wang, H. Cölfen, and M. Antonietti. Nonclassical crystallization: Mesocrystals and morphology change of $CaCO_3$ crystals in the presence of a polyelectrolyte additive. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:3246–3247, **2005**.
- [96] R. L. Penn. Kinetics of oriented aggregation. *J. Phys. Chem.*, B 108:12707–12712, **2004**.
- [97] E. M. Wong, J. E. Bonervich, and P. C. Searson. Growth kinetics of nanocrystalline ZnO particles from colloidal suspensions. *J. Phys. Chem. B*, 102:7770–7775, **1998**.
- [98] D. Volkmer, M. Fricke, C. Agena, and J. Mattay. Interfacial electrostatics guiding the crystallization of $CaCO_3$ underneath monolayers of calixarenes and resorcarenes. *J. Mater. Chem.*, 14:2249–2259, **2004**.
- [99] G. Wörheide. The reef cave dwelling ultraconservative coralline demosponge *astroclera willeyana* lister 1900 from the indo-pacific. *Facies*, 38:1–88, **1998**.
- [100] Y. Kitano. A study of the polymorphic formation of calcium carbonate in thermal springs with an emphasis on the effect of temperature. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 35:1980–1985, **1962**.
- [101] K. M. Wilbur and A. M. Bernhardt. Effects of amino-acids, magnesium and molluscan extrapallial fluid on crystallisation of calcium-carbonate-in vitro experiments. *Biol. Bull.*, 166:251–259, **1984**.
- [102] N. Wada, K. Yamashita, and T. Umegaki. Effects of carboxylic acids on calcite formation in the presence of mg-ions. *J. Colloid Interface Sci.*, 212:357–364, **1999**.
- [103] F. C. Meldrum and S. T. Hyde. Morphological influence of magnesium and organic additives on the precipitation of calcite. *J. Cryst. Growth*, 213:544–558, **2001**.
- [104] A. L. Litvin, S. Valiyaveetil, D. L. Kaplan, and S. Mann. Template-directed synthesis of aragonite under supramolecular hydrogen-bonded langmuir monolayers. *Adv. Mater.*, 9:124–127, **1997**.
- [105] B. R. Heywood and S. Mann. Molecular construction of oriented inorganic materials: Controlled nucleation of calcite and aragonite under compressed langmuir monolayers. *Chem. Mater.*, 6:311–318, **1994**.
- [106] D. Rautaray, A. Banpurkar, S. R. Sainkar, A. V. Limaye, N. R. Pavaskar, S. B. Ogale, and M. Sastry. Room-temperature synthesis of aragonite crystals at an expanding liquid-liquid interface in a radial hele-shaw cell. *Adv. Mater.*, 15:1273–1278, **2003**.
- [107] H. K. Park, I. Lee, and K. Kim. Controlled growth of calcium carbonate by poly(ethylenimine) at the air/water interface. *Chem. Commun.*, 1:24–25, **2004**.
- [108] N. Nassif, N. Gehrke, N. Pinna, N. Shirshova, K. Tauer, M. Antonietti, and H. Cölfen. Synthesis of stable aragonite superstructures by a biomimetic crystallization pathway. *Angew. chem. Int. Ed.*, 44:6004–6009, **2005**.
- [109] H. Cölfen. Double-hydrophilic block copolymers: Synthesis and application as novel surfactants and crystal growth modifiers. *Macromol. Rapid Commun.*, 22:219–252, **2001**.
- [110] S. H. Yu and H. Cölfen. Bio-inspired crystal morphogenesis by hydrophilic polymers. *J. Mater. Chem.*, 14:2124–2147, **2004**.

- [111] K. Tauer, V. Khrenov, N. Shirshova, and N. Nassif. Preparation and application of double hydrophilic block copolymer particles. *Macromol. Symp.*, 226:187–201, **2005**.
- [112] N. Nassif, N. Pinna, N. Gehrke, M. Antonietti, C. Jäger, and H. Cölfen. Amorphous layer around aragonite platelets in nacre. *PNAS*, 102:12653–12655, **2005**.
- [113] P. Fratzl, I. Burgert, and H. S. Gupta. On the role of interface polymers for the mechanics of natural polymeric composites. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6:5575–5579, **2004**.
- [114] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254, **1976**.
- [115] B.-A. Gotliv, L. Addadi, and S. Weiner. Mollusk shell acidic proteins: In search of individual functions. *Chem. Bio. Chem.*, 4:522–529, **2003**.
- [116] E. K. Berner and R. A. Berner. Global environment. *Prentice Hall Inc, Upper Saddle River New Jersey*, **1996**.
- [117] D. Volkmer, M. Fricke, M. Gleiche, and L. Chi. Elucidating the role of charge density on the growth of $CaCO_3$ crystals underneath calix[4]arene monolayers. *Mater. Sci. Eng., C*, 25:161–167, **2005**.
- [118] K. Mann, I. M. Weiss, S. Andrè, and H.-J. Gabius und M. Fritz. The amino-acid sequence of the abalone (*Haliotis laevis*) nacre protein perlucin. *Eur. J. Biochem.*, 267:5257–5264, **2000**.
- [119] S. Wohlrab, H. Cölfen, and M. Antonietti. Crystalline, porous microspheres made from amino acids by using polymer-induced liquid precursor. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44:4087–4092, **2005**.
- [120] E. Loste, R. M. Wilson, R. Seshadri, and F. C. Meldrum. The role of magnesium in stabilising amorphous calcium carbonate and controlling calcite morphologies. *J. Cryst. Growth*, 254:206–218, **2003**.
- [121] P. K. Ajikumar, L. G. Wong, G. Subramanyam, R. Lakshminarayanan, and S. Valiyaveetil. Synthesis and characterization of monodispersed spheres of amorphous calcium carbonate and calcite spherules. *J. Cryst. Growth*, 5:1129–1134, **2005**.
- [122] S. Raz, S. Weiner, and L. Addadi. Formation of high-magnesian calcites via an amorphous precursor phase: Possible biological implications. *Adv. Mater.*, 12:38–42, **2000**.
- [123] H. Nakahara, G. Bevelander, and M. Kakei. Electron microscopic and amino acid studies on the outer and inner shell layers of *Haliotis rufescens*. *Venus*, 41:33–46, **1982**.
- [124] X. Shen, A. M. Belcher, P. K. Hansma, G. D. Stucky, and D. E. Morse. Molecular cloning and characterization of lustrin a, a matrix protein from shell of *Haliotis rufescens*. *J. Biol. Chem.*, 272:32472–32481, **1997**.
- [125] K. Takahashi, H. Yamamoto, A. Onoda, M. Doi, T. Inaba, M. Chiba, A. Kobayashi, T. Taguchi, T. Okamura, and N. Ueyama. Highly oriented aragonite nanocrystal-biopolymer composites in an aragonite brick of the nacreous layer of *Pinctada fucata*. *Chem. Comm.*, 7:996–997, **2004**.

- [126] B. J. F. Bruet, H. J. Qi, M. C. Boyce, R. Panas, K. Tai, L. Frick, and C. Ortiz. Nanoscale morphology and indentation of individual nacre tablets from gastropod mollusc *Trochus niloticus*. *J. Mater. Res.*, 20:2400–2419, **2005**.
- [127] P. S. B. Digby. Mobility and crystalline form of the lime in cuticle of the shore crab, *Carcinus maenas*. *J. Zool., (Lond.)*, 154:273–286, **1967**.
- [128] G. H. Nancollas and W. Wu. Biomineralization mechanisms: a kinetics and interfacial energy approach. *J. Cryst. Growth*, 211:137–142, **2000**.
- [129] B. Runnegar. Crystallography of the foliated calcite shell layers of bivalve molluscs. *Alcheringa*, 8:273–290, **1983**.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers/der Verfasserin