

CAS-Registry-Nummern:

- 1, 3615-37-0; 2, 51921-33-6; 3, 69483-13-2; 4, 132938-41-1; 5, 132938-42-2; 6, 132938-43-3; 7, 133006-26-5; 8 (α -Anomer), 132938-44-4; 8 (β -Anomer), 132938-60-4; 9, 132938-45-5; 10, 132938-46-6; 11, 132938-47-7; 12, 132938-48-8; 13, 132958-86-2; 13a (α -Anomer), 132938-62-6; 13a (β -Anomer), 132938-63-7; 14, 132938-49-9; 15 (α -Anomer), 132958-88-4; 15 (β -Anomer), 132938-50-2; 16, 132938-51-3; 17, 132938-52-4; 18, 132938-53-5; 18 (4-Epimer), 132938-61-5; 19, 130031-63-9; 20, 132938-54-6; 21, 132938-55-7; 22, 132938-56-8; 23a (α -Anomer), 133006-27-6; 23a (β -Anomer), 132938-57-9; 23b (α -Anomer), 133006-28-7; 23b (β -Anomer), 133006-29-8; 24a, 132938-58-0; 24b, 133006-30-1; 25a, 132938-59-1; 25b, 133007-23-5; 26a, 132958-87-3; 26b, 133007-24-6; Calicheamicin, 108212-75-5; Ethylbromacetat, 105-36-2; Dyne-micin A, 124412-57-3.

- [1] a) J. Golik, J. Clardy, G. Dubay, G. Groenewold, H. Kawaguchi, M. Konishi, B. Krishnan, H. Ohkuma, K. Saitoh, T. W. Doyle, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 3461; b) J. Golik, G. Dubay, G. Groenewold, H. Kawaguchi, M. Konishi, B. Krishnan, H. Ohkuma, K. Saitoh, T. W. Doyle, *ibid.* 109 (1987) 3462.
- [2] a) M. D. Lee, T. S. Dunne, M. M. Siegel, C. C. Chang, G. O. Morton, D. B. Borders, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 3464; b) M. D. Lee, T. S. Dunne, C. C. Chang, G. A. Eillestad, M. M. Siegel, G. O. Morton, W. J. McGahren, D. B. Borders, *ibid.* 109 (1987) 3466.
- [3] M. Konishi, H. Ohkuma, K. Matsumoto, T. Tsuno, H. Kamei, T. Miyaki, T. Oki, H. Kawagushi, G. D. VanDuyne, J. Clardy, *J. Antibiot.* 42 (1989) 1449; b) M. Konishi, H. Ohkuma, T. Tsuno, T. Oki, G. D. VanDuyne, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 3715.
- [4] K. C. Nicolaou, R. D. Groneberg, T. Miyazaki, N. A. Stylianides, T. J. Schultz, W. Stahl, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 8193; K. C. Nicolaou, R. D. Groneberg, *ibid.* 112 (1990) 4085.
- [5] K. C. Nicolaou, C.-K. Huang, A. L. Smith, S. V. Wendeborn, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 7416; K. C. Nicolaou, A. L. Smith, S. V. Wendeborn, C.-K. Huang, *ibid.* 113 (1991), im Druck. Für einen anderen Zugang zu Modellen für Dynemicin A vgl.: J. A. Porco, Jr., F. J. Schoenen, T. J. Stout, J. Clardy, S. L. Schreiber, *ibid.* 112 (1990) 7410.
- [6] T. Mukaiyama, Y. Muria, S. Shoda, *Chem. Lett.* 1981, 431; K. C. Nicolaou, R. E. Dolle, D. P. Papahatjis, J. L. Randall, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 4159.
- [7] K. C. Nicolaou, R. D. Groneberg, N. A. Stylianides, T. Miyazaki, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1990, 1275.
- [8] S. David, A. Theiffry, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1979, 1568.
- [9] U. Zenvahi, B. Amit, A. Patchornik, *J. Org. Chem.* 37 (1972) 2281; U. Zenvahi, A. Patchornik, *ibid.* 37 (1972) 2285; E. Ohtsuka, S. Tanaka, M. Ikehara, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 8210; V. N. R. Pillai, *Synthesis* 1980, 1.
- [10] G. Grandler, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* 135 (1985) 203; R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* 98 (1986) 213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 212.
- [11] H. Paulsen, O. Lockhoff, *Chem. Ber.* 114 (1981) 3102.
- [12] Alle neuen Verbindungen wurden spektroskopisch, analytisch und/oder massenspektrometrisch charakterisiert. Die Ausbeuten beziehen sich auf spektroskopisch und chromatographisch reine Verbindungen. Ausgewählte physikalische Daten einiger Verbindungen (Ar = Aryl): 18: hellgelbes Öl; R_f = 0.31 (Kieselgel, 10% Methanol in Dichlormethan), $[\alpha]_D^{25}$ = -49.2 (c = 0.66, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, C_6D_6): δ = 7.56 (d, 2 H, J = 7.6 Hz, Ar), 7.32–7.13 (m, 8 H, Ar), 5.88 (br.s, 1 H, O-H), 5.86 (s, 1 H, E-1), 5.75 br.s, 1 H, O-NH), 4.99 (d, 1 H, J = 11.7 Hz, CH_2Ph), 4.67 (d, 1 H, J = 11.7 Hz, CH_2Ph), 4.54–4.47 (m, 3 H, A-1, $\text{CH}_2\text{-Ph-Hydroxylamin}$), 4.32 (dd, 1 H, J = 10.8, 9.2 Hz, E-Sax), 4.04 (dd, 1 H, J = 9.5, 9.5 Hz, A-3), 4.02–3.94 (m, 1 H, E-3), 3.90 (dd, 1 H, J = 10.8, 4.7 Hz, E-Säq), 3.88 (dd, 1 H, J = 9.5, 7.6 Hz, A-2), 3.57 (dq, 1 H, J = 9.5, 6.0 Hz, A-5), 3.23 (s, 3 H, OCH_3), 2.82 (ddd, 1 H, J = 9.2, 9.2, 4.7 Hz, E-4), 2.57–2.42 (m, 3 H, E-2eq, NCH_2), 2.34 (dd, 1 H, J = 9.5, 9.5 Hz, A-4), 1.54 (dd, 1 H, J = 10.2, 10.2 Hz, E-2ax), 1.36 (d, 3 H, J = 6.0 Hz, A-6), 0.99 (t, 3 H, J = 6.5 Hz, NCH_2CH_3); IR (CHCl_3): $\tilde{\nu}_{max}$ = 2964, 2932, 1456, 1095, 1071 cm^{-1} ; HR-MS ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_2$, ($M + \text{Cs}^+$): 649.1890, gef. 649.1900. 26a: hellgelbes Öl; R_f = 0.39 (Kieselgel, 10% Methanol in Dichlormethan), $[\alpha]_D^{25}$ = -87.3 (c = 0.48, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, C_6D_6): δ = 8.97 (dd, 1 H, J = 4.2, 0.7 Hz, Dyn-Ar), 7.52 (m, 1 H, Dyn-Ar), 7.41–6.98 (m, 12 H, 11 Ar, Propargyl-H), 6.98 (dd, 1 H, J = 7.1, 7.1 Hz, Dyn-Ar), 5.89 (br.s, 1 H, O-H), 5.83 (br.s, 1 H, O-NH), 5.78 (s, 1 H, E-1), 5.28 (d, 1 H, J = 10.0 Hz, Vinyl-H), 5.10 (dd, 1 H, J = 10.0, 1.7 Hz, Vinyl-H), 4.58–4.51 (m, 2 H, CH_2Ph), 4.50 (d, 1 H, J = 7.4, A-1), 4.48–4.40 (m, 1 H, E-Sax), 4.25–4.17 (m, 1 H, E-Säq), 4.13–4.02 (m, 3 H, A-3, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.01–3.94 (m, 1 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.93–3.90 (m, 1 H, E-3), 3.77 (dd, 1 H, J = 9.5, 7.3 Hz, A-2), 3.69–3.52 (m, 1 H, A-5), 3.26 (s, 3 H, OCH_3), 2.78–2.66 (m, 2 H, E-4, NCH_2), 2.65–2.57 (m, 1 H, NCH_2), 2.47 (dd, 1 H, J = 12.0, 2.2 Hz, E-2aq), 2.44 (dd, 1 H, J = 9.5, 9.5 Hz, A-4), 2.31 (dd, 1 H, J = 14.5, 6.5 Hz, Dyn-CH₂), 2.04 (d, 1 H, J = 6.7 Hz, Dyn-CH₂), 1.95–1.83 (m, 4 H, CH_2), 1.43 (dd, 1 H, J = 14.5, 9.3 Hz, E-2ax), 1.33 (d, 3 H, J = 6.1 Hz, A-6), 1.04 (t, 3 H, J = 6.5 Hz, NCH_2CH_3); IR (CHCl_3): $\tilde{\nu}_{max}$ = 2965, 2931, 1733, 1380, 1323, 1146, 1098, 1071 cm^{-1} ; HR-MS ber. für $\text{C}_{49}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_{11}$, ($M + \text{Cs}^+$): 994.2891, gef.

994.2904. 26b: hellgelbes Öl, R_f = 0.38 (Kieselgel, 10% Methanol in Dichlormethan), $[\alpha]_D^{25}$ 125.7 (c = 0.68, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, C_6D_6): δ = 9.83 (dd, 1 H, J = 4.2, 0.7 Hz, Dyn-Ar), 7.56 (dd, 1 H, J = 7.4, 1.4 Hz, Dyn-Ar), 7.32–7.02 (m, 12 H, 11 Ar, Propargyl-H), 6.90 (dd, 1 H, J = 7.1, 7.1 Hz, Dyn-Ar), 5.90 (br.s, 1 H, O-NH), 5.88 (br.s, 1 H, O-H), 5.82 (s, 1 H, E-1), 5.29 (d, 1 H, J = 10.2 Hz, Vinyl-H), 5.11 (dd, 1 H, J = 10.2, 1.7 Hz, Vinyl-H), 4.56–4.51 (m, 2 H, CH_2Ph), 4.49 (dd, 1 H, J = 11.1, 9.0 Hz, E-Sax), 4.48 (d, 1 H, J = 7.4 Hz, A-1), 4.22–4.17 (m, 2 H, OCH₂CH₂O), 4.14 (dd, 1 H, J = 11.1, 4.7 Hz, E-Säq), 4.09 (dd, 1 H, J = 9.5, 9.5 Hz, A-3), 4.06–4.01 (m, 1 H, OCH₂CH₂O), 3.93–3.88 (m, 1 H, OCH₂CH₂O), 3.87–3.81 (m, 1 H, E-3), 3.78 (dd, 1 H, J = 9.5, 7.1 Hz, A-2), 3.58 (dq, 1 H, J = 9.5, 6.1 Hz, A-5), 3.27 (s, 3 H, OCH_3), 2.84 (ddd, 1 H, J = 9.0, 8.0, 4.7 Hz, E-4), 2.77 (m, 2 H, NCH_2), 2.54 (dd, 1 H, J = 12.2, 2.5 Hz, E-2aq), 2.42 (dd, 1 H, J = 9.5, 9.5 Hz, A-4), 2.30 (dd, 1 H, J = 14.6, 10.5 Hz, Dyn-CH₂), 2.06 (dd, 1 H, J = 14.6, 7.1 Hz, Dyn-CH₂), 1.97–1.83 (m, 4 H, Dyn-CH₂), 1.51 (dd, 1 H, J = 12.2, 9.2 Hz, E-2ax), 1.33 (d, 3 H, J = 6.1 Hz, A-6), 1.10 (t, 3 H, J = 6.5 Hz, NCH_2CH_3); IR (CHCl_3): $\tilde{\nu}_{max}$ = 2962, 2957, 2929, 1733, 1386, 1323, 1146, 1097, 1070 cm^{-1} ; HR-MS ber. für $\text{C}_{49}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_{11}$, ($M + \text{Cs}^+$): 994.2891, gef. 994.2904.

Rastertunnelmikroskopische Beobachtung von spezifisch adsorbiertem Streptavidin auf Biotin-funktionalisierten, selbstorganisierten Monoschichten**

Von Lukas Häußling, Bruno Michel*, Helmut Ringsdorf* und Heinrich Rohrer

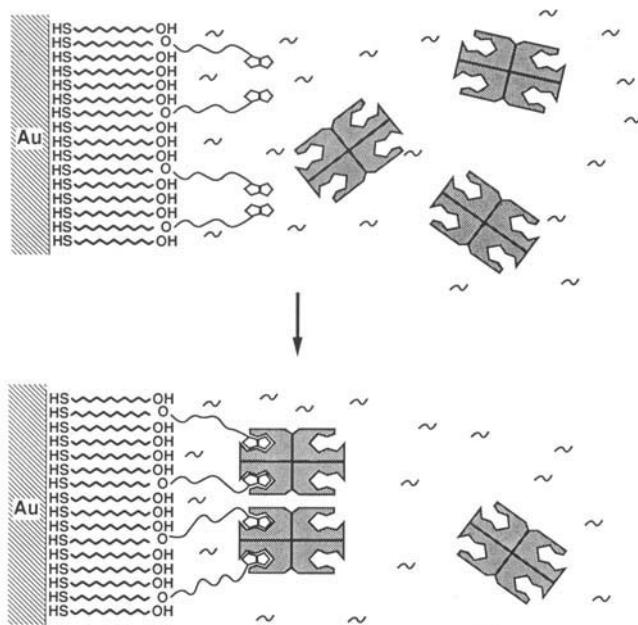
Molekulare Erkennung ist von zentraler Bedeutung nicht nur in der Biologie, sondern auch in der Materialforschung zum Aufbau neuer Materialien mit organisierten Strukturen^[1]. Die Rastertunnelmikroskopie (RTM) und verwandte Methoden^[2] ermöglichen eine direkte Untersuchung adsorbiertener Moleküle^[3–6]. Mit Hilfe funktionalisierter, chemisorbierter Monoschichten lässt sich ein breites Spektrum von Molekülen mit dem RTM studieren.

Die Bindung von Biotin (Vitamin H) durch das bakterielle Protein Streptavidin ist aus mehreren Gründen ein Modellfall der molekularen Erkennung: 1. Die Bindung ist äußerst stark ($K_a = 10^{15} \text{ L mol}^{-1}$) und sehr spezifisch. 2. Biotin lässt sich leicht funktionalisieren und wird dabei in seinem Bindungsverhalten kaum beeinflusst^[7]. 3. Streptavidin hat vier Bindungsstellen für Biotin auf zwei gegenüberliegenden Seiten und kann deshalb zum Verknüpfen verschiedener Funktionalitäten verwendet werden.

Nachdem vor kurzem die zweidimensionale Kristallisation von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin an biotinylierten Lipidmonoschichten gelang^[8], interessierte uns besonders das analoge Experiment an sogenannten selbstorganisierten Monoschichten (Schema 1). Nach Nuzzo und Allara^[9a] sowie Sagiv^[9b] liegen solche aus Lösungen adsorbierten Filme als Monoschicht mit nahezu perfekter zweidimensionaler Organisation vor. Es konnte auch, speziell anhand der Adsorption von Thiolen und Disulfiden auf Goldoberflächen, gezeigt werden^[10a–d], daß sich diese selbstorganisierenden Monoschichten zur großflächigen organisch-chemischen Funktionalisierung von Festkörperoberflächen eignen.

[*] Dr. B. Michel, Dr. H. Rohrer
IBM Research Division
Forschungslaboratorium Zürich
CH-8803 Rüschlikon (Schweiz)
Prof. H. Ringsdorf, Dipl.-Chem. L. Häußling
Institut für Organische Chemie der Universität
J. J.-Becher-Weg 20, W-6500 Mainz

[**] Wir danken Frau G. Bender für ihre engagierte Mitarbeit bei den Synthesen und Herrn H.-G. Batz (Boehringer, Mannheim) für eine Streptavidin-Spende.



Schema 1. Oberflächenerkennung einer gemischten, selbstorganisierten Adsorptionsschicht von **1** und **3** durch Streptavidin.

Um die Erkennungsreaktion zwischen Biotin und Streptavidin an einer funktionalisierten Goldoberfläche durchführen zu können, synthetisieren wir die Thiole **1** und **3** sowie das Disulfid **2**^[11]. 11-Mercaptoundecanol **1** wurde auf Gold(111)^[13] chemisorbiert und der Kontaktwinkel gemessen (Tabelle 1). Abbildung 1a zeigt ein typisches RTM-Bild einer adsorbierten Monoschicht von **1** auf Gold(111)^[14]: eine glatte Oberfläche mit regellos verteilten Vertiefungen (unbedecktes epitaktisches Gold zeigt keine solchen Vertiefungen). Die glatten Bereiche, die nach den RTM-Aufnahmen etwa 95% der Oberfläche ausmachen, zeigen die gleiche terrassenartige Struktur wie unbedeckte Goldfilme. Die Vertiefungen haben eine laterale Ausdehnung von bis zu 35 Å und eine Tiefe von bis zu 11 Å (Abb. 1b,c). Wir schließen daraus, daß das Gold, bis auf diese Vertiefungen, mit einer

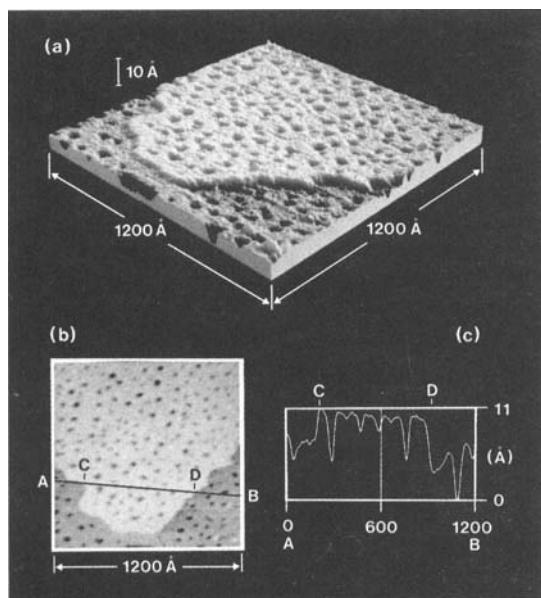


Abb. 1. Chemisorbierte Monoschicht von **1** auf Gold(111). Meßbedingungen: Wolframspitze, 200 mV und 100 pA. a) Perspektivische Darstellung mit simulierter Beleuchtung. b) Aufsicht auf a) in Grauton darstellung mit vertikaler Dimension von 24 Å von schwarz bis weiß. c) Schnitt entlang der Linie AB, von C bis D um eine Monolage Gold erhöht.

dicht gepackten Monoschicht von **1** belegt ist. Die Vertiefungen sind entweder leer oder enthalten lose gepackte Moleküle, die der vorbeirasternden Spitze des RTMs ausweichen. Die 95proz. Bedeckung entspricht auch dem Verhältnis des Platzbedarfs von senkrechten Paraffinketten zum Platzbedarf einer $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ -Überstruktur^[15] der Schwefelatome auf Gold(111), d. h. dicht gepackte Schwefelatome auf der Goldoberfläche und daher nur lose gepackte Kohlenwasserstoffketten darüber.

Das Bisbiotindisulfid **2** wurde nach dem gleichen Verfahren adsorbiert (Tabelle 1). Anschließend wurde die Biotinfunktionalisierte Goldoberfläche in die Proteinlösung eingetaucht^[16], jedoch ließen sich auch nach 12 h Inkubationszeit bei Raumtemperatur mit dem RTM keine Proteine finden. Nach Weber et al.^[17] liegt die Ursache für die starke Bindung von Biotin an Streptavidin unter anderem darin, daß das Biotinmolekül vollständig in das Innere des Proteins aufgenommen wird. Folglich kann an einer mit Bisbiotindisulfid **2** dicht belegten Goldoberfläche Streptavidin deswegen nicht fest und dauerhaft andocken, weil die Biotinmoleküle nicht genügend Beweglichkeit und Platz haben, um in die Bindungstasche des Proteins gelangen zu können. Das Platzproblem auf der Goldoberfläche läßt sich durch Coadsorption von unsubstituiertem Thiol und Disulfid lösen, das Beweglichkeitsproblem durch die Einführung eines hydrophilen Spacers, wie er beim Mercaptobiотin **3** realisiert wurde.

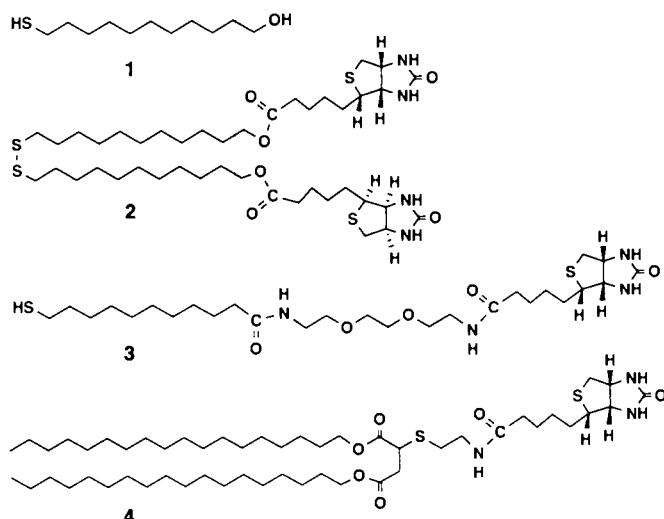


Tabelle 1. Kontaktwinkel von Wasser mit chemisorbierten Thiolen auf Gold(111)-Oberflächen [12].

Verbindung	$t_{\text{Ad.}}$ [h]	$\theta_{\text{ad.}}$ [a] [°]	$\theta_{\text{re.}}$ [a] [°]
1	14	42	7
2	5	66	25
3	18	52	20
1 3 (2:1)	21	60	18
1 3 (50:1)	24	35	8
Gold(111)	70–80	38–50	

[a] adv = advancing (fortschreitend), re = returning (rückziehend).

Verbindung **3** wurde sowohl aus homogener Lösung als auch aus Mischungen mit dem Mercaptoundecanol **1** auf Gold absorbiert. Der Film aus reinem **3** wurde von Wasser ausreichend benetzt (Tabelle 1), in RTM-Aufnahmen deutete sich eine Periodizität von 10 Å in einer Richtung und 20 Å rechtwinklig dazu an (ohne Abb.). Abbildung 2b zeigt eine RTM-Aufnahme einer durch Coadsorption von **1** und **3**

(2:1) erhaltenen gemischten Monoschicht. Die Monoschicht enthält Vertiefungen mit einer lateralen Ausdehnung von 120 Å und einer Tiefe von ca. 3 Å (Abb. 2a,c). Wir interpretieren dies als eine Art Mikrophasenseparation der beiden Komponenten, wobei die Tiefe darauf hindeutet, daß sich der hervorstehende hydrophile Spacer mit der Biotineinheit flach auf die darunter liegende, dicht gepackte Alkanschicht legt. Gelegentlich läßt sich auf diesen höheren Bereichen eine Periodizität von $7.5 \times 10 \text{ Å}$ beobachten, die grob mit den Ausmaßen des hervorstehenden hydrophilen Teils von **3** übereinstimmt. Dies bedeutet allerdings, daß das Verhältnis von 1:3 im adsorbierten Film wesentlich größer ist als in der ursprünglichen Lösung, d. h. **3** wird langsamer adsorbiert als **1**.

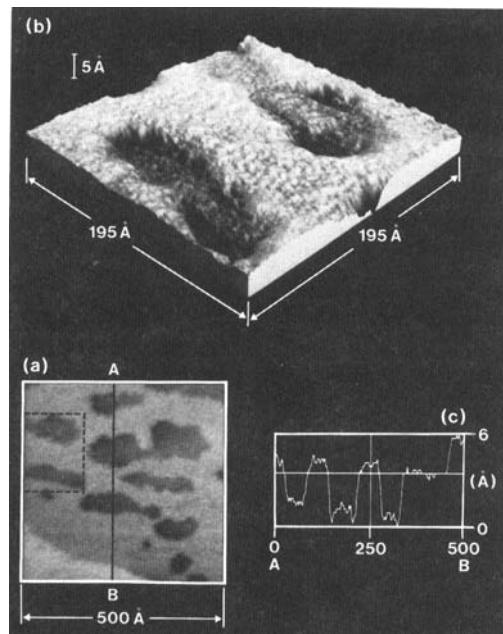


Abb. 2. Chemisorbierte Monoschicht aus **3** und **1** (1:2) auf Gold(111). Meßbedingungen wie in Abb. 1 aufgeführt. a) Aufsicht in Grautondarstellung mit vertikaler Dimension von 54 Å von schwarz bis weiß. b) Perspektivische Darstellung der markierten Zone aus a) mit simulierter Beleuchtung. c) Schnitt entlang der Linie AB, B ist um eine Monolage Gold erhöht.

Eine Monoschicht, die aus einer Lösung von **1** und **3** mit der Zusammensetzung 50:1 adsorbiert worden war, wurde 72 h bei Raumtemperatur mit einer Streptavidinlösung^[16] inkubiert und anschließend mit verdünnter Pufferlösung gründlich abgespült. Im RTM-Bild (Abb. 3) sind die einzelnen Proteinmoleküle zu erkennen, speziell im Höhenprofil entlang der Linie AB. Die Breite von 45 Å stimmt relativ gut mit den Literaturwerten ($42 \times 42 \times 56 \text{ Å}$)^[17] (Gitterkonstante 80 Å)^[18] überein. Neben proteinfreien Stellen gibt es auch solche, die von mehreren Schichten des Proteins bedeckt sind (Abb. 3b). Wirkliche Protein-Monoschichten sind selten zu finden. Die fehlende laterale und vertikale Ordnung dieser Proteinschicht schreiben wir der mangelnden Beweglichkeit der adsorbierten Biotinmoleküle und der daran angedockten Proteine zu.

Um den Effekt sowohl der sterischen Hinderung als auch der lateralen und speziell vertikalen Beweglichkeit zu demonstrieren, spreiteten wir das Bisbiotindisulfid **2** auf Pufferlösung^[16] in einem Langmuir-Trog. Das Schub-Flächen-Diagramm dieser Verbindung ist in Abbildung 4 gezeigt. Wir inkubierten diese Monoschichten mit Streptavidin 30–60 min bei Raumtemperatur bei zwei Oberflächenspannungen. Die Monoschichten aus orientiertem Bisbiotindisulfid

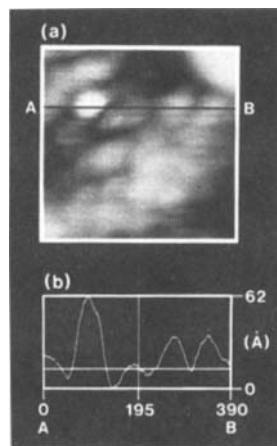


Abb. 3. Angedocktes Streptavidin auf einer gemischten, chemisorbierten Monoschicht von **3** und **1** (1:50). Meßbedingungen wie in Abb. 1 aufgeführt. a) Aufsicht in Grautondarstellung mit vertikaler Dimension von 140 Å von schwarz nach weiß. b) Schnitt entlang der Linie AB.

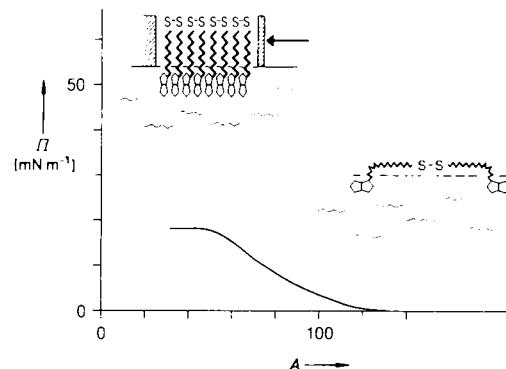


Abb. 4. Schub-Flächen-Diagramm von **2** auf Wasser bei 20 °C. A = Fläche in Å pro Molekül; Π = Oberflächendruck.

und angedocktem Protein übertrugen wir dann durch Langmuir-Schäfer-Technik auf den Goldträger. Abbildung 5a zeigt eine RTM-Aufnahme einer im flüssiganalogen Bereich bei 1 mNm^{-1} nach 30 min erhaltenen Schicht. Im Vordergrund sind Terrassen von 3 Å Höhe zu sehen, die durch Stufen der Goldoberfläche hervorgerufen werden; im Hintergrund erstreckt sich ein großes Proteinaggregat von einigen hundert Angström Höhe (siehe auch Abb. 5b). Diese nadelförmige Aggregation der angedockten Proteine wurde früher nicht beobachtet^[8], allerdings wurde auch nie eine so hohe Proteinkonzentration benutzt. Abbildung 5c zeigt die RTM-Aufnahme einer im gasanalogen Bereich (0 mNm^{-1}) 1 h inkubierten und dann auf Gold übertragenen Monoschicht. Andeutungsweise ist hier die tetragonale Symmetrie der angedockten Proteinschichten zu erkennen; dies erinnert an die zweidimensionalen Kristallstrukturen, die bei Experimenten mit biotinylierten Lipiden an der Wasseroberfläche gefunden wurden^[18].

Um die Fluoreszenzmikroskopieexperimente von Blankenburg et al.^[8] mit der Erkennungsreaktion auf festen Trägern zu vergleichen, spreiteten wir das Biotinlipid **4** auf Pufferlösung^[16] und komprimierten die Monoschicht auf 4 mNm^{-1} (festanaloge Packung). **4** hat bei Raumtemperatur eine festanaloge Packung und ist daher mit dem RTM besser abbildbar. Außerdem konnte durch parallele Experimente an einer Monoschicht unter dem Fluoreszenzmikroskop gezeigt werden, daß sich unter diesem Lipid kleine Proteinaggregate bilden, die sich wiederum besser zur Abbil-

dung mit dem RTM eignen. Dann wurde der Film mit einer Streptavidinlösung ($1 \mu M$) im gleichen Puffer unterschichtet. Nach einer Stunde wurde dieser Film durch Langmuir-Schäfer-Technik auf eine Goldschicht übertragen und durch

stalle an einer Lipidmonoschicht ist bisher noch nicht beobachtet worden. Sie ist möglicherweise durch die ungewöhnlich hohe Proteinkonzentration in diesen Experimenten verursacht worden.

Chemisorbierte, selbstorganisierte Monoschichten, z. B. des Mercaptoundecanols **1** werden also auf Festkörperoberflächen für eine langdauernde RTM-Untersuchung genügend fest gebunden. Im Unterschied dazu ist die Beweglichkeit von Monoschichten aus Fettsäuren oder Lipiden auf Festkörperoberflächen zu groß, um der durch die Tunnelspitze ausgeübten anziehenden oder abstoßenden Wechselwirkung zu widerstehen. Wir konnten die aufgrund von

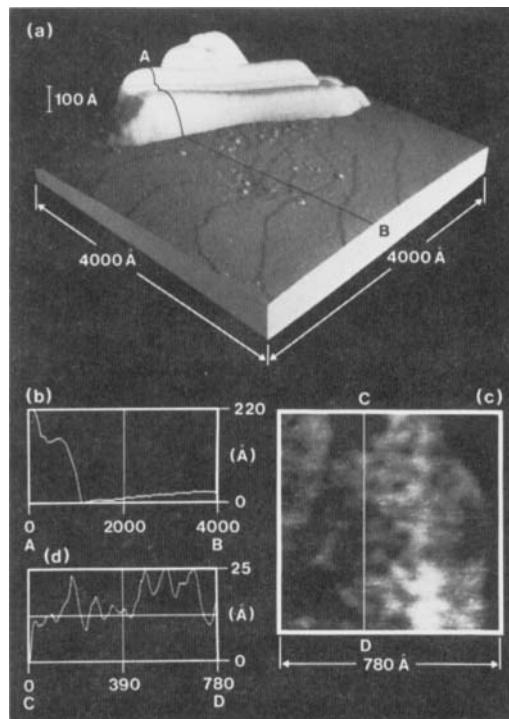


Abb. 5. Verbindung **2** gespreitet auf NaCl Tris-HCl-Lösung (je 10 mM) bei pH 7, unterschichtet mit Streptavidin und übertragen auf Gold(111) mit der Langmuir-Schäfer-Technik. Meßbedingungen: Goldspitze, 200 mV und 100 pA . a) Perspektivische Ansicht eines im flüssiganalogen Bereich gewachsene und dann übertragenen Streptavidin-Aggregats mit simulierter Beleuchtung; die kleinen Stufen im vorderen Bildteil entsprechen monoatomaren Au-Stufen. b) Schnitt entlang der Linie AB. c) Aufsicht auf eine Fläche mit einer im gasanalogen Bereich angedockten und dann übertragenen Streptavidin-Monoschicht mit vertikaler Dimension von 50 \AA von schwarz nach weiß. d) Schnitt entlang der Linie CD.

RTM untersucht. Abbildung 6a zeigt die typische Struktur der Proteinaggregate. Diese sind spiegelsymmetrisch und haben eine längliche Form mit zwei gegenüberliegenden charakteristischen Kerben an den kurzen Seiten. Die Dicke der Aggregate beträgt meist $100\text{--}120 \text{ \AA}$, was zwei Lagen von Streptavidin entspricht. Nur wenige Proteinaggregate sind echte Monoschichten, wie im Schnitt von A nach B in Abbildung 6b zu sehen ist: links sind zwei doppelagglagige Proteinaggregate und rechts ist eine Proteinmonoschicht im Profil zu erkennen. Abbildung 6c zeigt eine Nahaufnahme einer charakteristischen Kerbe eines Proteinaggregates aus Abbildung 6a. Im Querschnitt von C nach D in Abbildung 6d kann man links oben drei einzelne Proteinmoleküle nebeneinander mit ihrer charakteristischen Höckerstruktur und einer Dimension von 40 \AA erkennen. Rechts sind zwei Proteinmoleküle mit einem Abstand dazwischen zu sehen, der der Gitterkonstanten, die man aus Monoschichtexperimenten kennt^[18], entspricht. Die allgemeine Unregelmäßigkeit der Abstände in den Abbildungen 6c und 6d deuten auf eine mangelnde Fernordnung der angedockten Proteinmoleküle hin. In der Abbildung 6e und dem Querschnitt längs der Linie EF in Abbildung 6f sieht man einen Teil eines $400\text{--}500 \text{ \AA}$ dicken Streptavidin-Aggregats. Die Gesamtdicke dieses Aggregates entspricht acht Proteinlagen, wovon vier auf dem Bild zu sehen sind. Diese Mehrlagigkeit der Proteinkri-

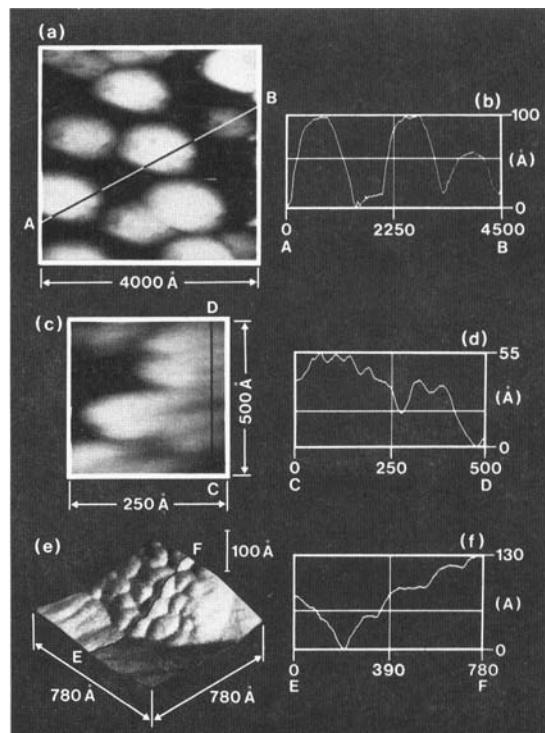


Abb. 6. Biotinlipid **4** gespreitet auf NaCl-Tris-HCl-Lösung (je 10 mM) bei pH 7 (Schub 4 mN m^{-1}). unterschichtet mit Streptavidin und übertragen auf Gold(111) mit der Langmuir-Schäfer-Technik. Meßbedingungen wie in Abb. 1 aufgeführt. a) Aufsicht auf Streptavidin-Aggregate in Grautondarstellung, die vertikale Dimension ist 100 \AA von schwarz nach weiß. b) Schnitt entlang der Linie von AB. c) Nahaufnahme (Aufsicht) der typischen Auskerbung eines Proteinaggregats in a) in Grautondarstellung, die vertikale Dimension ist 55 \AA von schwarz nach weiß. d) Schnitt entlang der Linie von CD. e) Perspektivische Darstellung der Vorderkante eines Streptavidin-Aggregats. f) Schnitt entlang der Linie von EF.

Kontaktwinkelmessungen im Makroskopischen beobachtete homogene Bedeckung von Goldoberflächen^[9, 10] durch Rastertunnelmikroskopie bestätigen. Unsere Resultate zeigen aber im Nanometerbereich eine heterogene Bedeckung der Oberfläche. Im Gegensatz zu Monoschichten an der Gas-Wasser-Grenzfläche weisen diese chemisorbierten Monoschichten allerdings auf Festkörpern nur geringe laterale und vertikale Mobilität auf^[19]. Erst nach drei Tagen konnten wir beim direkten Andocken auf dem Festkörper Proteinmoleküle nachweisen, während uns das an der Wasseroberfläche schon nach weniger als einer Stunde gelang. Problematisch blieb jedoch weiterhin die mangelnde Adhäsion dieser übertragenen Langmuir-Blodgett-Filme. Gute Adhäsion kann mit Verbindungen vom Typ **2** erhalten werden, die sich auf der Wasseroberfläche spreiten lassen und deren übertragene Monoschichten auf dem Festkörper haft-

ten. Die Tatsache jedoch, daß Proteine und Proteinaggregate mit dem RTM überhaupt abgebildet werden können, ist im Hinblick auf die Charakterisierung funktionalisierter Oberflächen sehr vielversprechend.

Eingegangen am 8. Oktober 1990,
veränderte Fassung am 1. Februar 1991 [Z 4235]

CAS-Registry-Nummern:

1. 73768-94-2; 2. 132722-88-4; 3. 132722-89-5; 4. 122567-71-9; 11-Bromundecanol, 1611-56-9; 11-Bromundecansäure, 2834-05-1; 1,8-Diamino-3,6-dioxaocantan, 929-59-9; Streptavidin, 9013-20-1.

- [1] J. M. Lehn, *Angew. Chem. 100* (1988) 91; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 27* (1988) 89; H. Ringsdorf, B. Schlarb, J. Venzer, *ibid. 100* (1988) 117 bzw. 27 (1988) 113.
- [2] R. J. Behm, N. Garcia, H. Rohrer (Hrsg.): *Scanning Tunneling Microscopy (STM) and Related Methods (NATO ASI Ser. E, 184)* (1991).
- [3] G. Travaglini, H. Rohrer, M. Amrein, H. Gross, *Surf. Sci. 181* (1987) 514.
- [4] J. S. Foster, J. E. Frommer, *Nature 333* (1987) 542.
- [5] a) M. Amrein, A. Stasiak, H. Gross, E. Stoll, G. Travaglini, *Science 240* (1988) 514; b) M. Amrein, R. Dürr, A. Stasiak, H. Gross, G. Travaglini, *ibid. 243* (1989) 1708.
- [6] a) D. P. E. Smith, H. Hörber, C. Gerber, G. Binnig, *Science 245* (1989) 43; b) B. Michel, G. Travaglini, H. Rohrer, C. Joachim, M. Amrein, *Z. Phys. B* 76 (1989) 99.
- [7] M. Wilcheck, E. Bayer, *Trends Biochem. Sci. 14* (1989) 408; *Anal. Biochem. 171* (1988) 1.
- [8] R. Blankenburg, P. Meller, H. Ringsdorf, C. Salesse, *Biochemistry 28* (1989) 8214.
- [9] a) R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc. 105* (1983) 4481; b) J. Sagiv, *ibid. 102* (1980) 92.
- [10] a) C. D. Bain, G. M. Whitesides *Science 240* (1988) 62; b) C. D. Bain, J. Evall, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc. 111* (1989) 7155; c) *ibid. 111* (1989) 7164; d) C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Adv. Mater. 101* (1989) 522; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. Adv. Mater. 28* (1989) 506; *Adv. Mater. 1* (1989) 110.
- [11] Die Verbindung 4 wurde bereits in [8] ausführlich beschrieben. Die Verbindungen 1–3 wurden wie folgt synthetisiert: 1: 11-Bromundecanol (Merck) wurde mit Natriumthiosulfat zum Bunte-Salz umgesetzt. Das kristalline Produkt wurde abgetrennt und aus Ethanol umkristallisiert. Direkte saure Hydrolyse lieferte 1 als Rohprodukt. Umkristallisation aus *n*-Hexan ergab 1 in 95% Ausbeute. 2: Das Bunte-Salz von 11-Bromundecanol wurde nach der Vorschrift von Milligan und Swan [22] zum symmetrischen Disulfid umgesetzt. Das Disulfid wurde isoliert (95% Ausbeute) und mit einem geringen Überschuß von d-Biotin nach der Methode von Siegliche et al. [23] in der Kälte verestert. Das Reaktionsgemisch wurde chromatographisch aufgetrennt und 2 in 13% Ausbeute NMR-spektroskopisch und chromatographisch rein erhalten. 3: Der Aktivester der 11-Bromundecansäure wurde mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaocantan (Deutsche Texaco) im Überschuß umgesetzt und das überschüssige Amin abgetrennt. Die erhaltene Zwischenstufe wurde mit d-Biotin-Aktivester in der Kälte umgesetzt und das Alkylbromid isoliert. Das Rohprodukt wurde mit Natriumthiosulfat zum Bunte-Salz umgesetzt und anschließend sauer hydrolysiert. Chromatographie ($\text{CHCl}_3, \text{CH}_3\text{OH} 1:1$) lieferte NMR-spektroskopisch reines Produkt (3% Ausbeute).
- [12] Zur schnellen und einfachen Charakterisierung der beschichteten Goldoberflächen wurde der Kontaktwinkel der Oberfläche mit einem Wassertropfen an der Dreiphasenlinie Luft Wasser/Gold gemessen. Die Randwinkel wurden mit dem Kontaktwinkelmikroskop G1 (Krüss, Hamburg) bestimmt. Die fortschreitenden und zurückziehenden Kontaktwinkel wurden an Tropfen gemessen, die mit einer mikrometergetriebenen Glasspritze langsam und gleichmäßig vergrößert oder verkleinert wurden. Wir bestimmten dabei den konstant fortschreitenden und rückziehenden Randwinkel.
- [13] Als Unterlage für die RTM-Untersuchungen diente epitaktisch auf frisch gespaltenem Glimmer aufgewachsenes Gold. Nach dem Spalten wurde der Glimmer mit bidestilliertem Wasser gewaschen und bei einem Druck von weniger als 10^{-7} mbar mit 2500 Å Gold bedampft. Das Gold wurde mit einer Geschwindigkeit von 5 Å s^{-1} auf den auf 300 °C erhitzten Glimmer aufgedampft [21]. Die Oberfläche dieses Materials zeigt (111)-Kristallflächen, die über Regionen von 1000 Å atomar flach sind.
- [14] Die RTM-Untersuchungen wurden unter Normalbedingungen an Luft mit einem Bioscope-RTM [20] ausgeführt. Die Bilder wurden bei einem Tunnelstrom (I_t) von 100 pA und einer Tunnelspannung (V , Spitze-Probe) von 200 mV aufgenommen. Wir benutzten elektrochemisch geätzte Gold- und Wolframspitzen. Beide ergaben die gleichen Ergebnisse.
- [15] R. G. Nuzzo, E. M. Korenic, L. H. Dubois, *J. Chem. Phys. 93* (1990) 767.
- [16] 10–100 µM Streptavidin in 10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 7.4.
- [17] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science 243* (1989) 85.
- [18] a) M. Ahlers, R. Blankenburg, D. W. Grainger, P. Meller, H. Ringsdorf, C. Salesse, *Thin Solid Films 180* (1989) 93; b) S. A. Darst, M. Ahlers, P. H.

Meller, E. W. Kubalek, R. Blankenburg, H. O. Ribi, H. Ringsdorf, R. D. Kornberg, *Biophys. J.* im Druck.

- [19] K. L. Wolf: *Physik und Chemie der Grenzflächen. Bd. 2*. Springer, Berlin 1959, S. 143.
- [20] B. Michel, G. Travaglini, *J. Microsc. (Oxford) 151* (1988) 681.
- [21] V. M. Hallmark, S. Chiang, J. F. Rabolt, J. D. Swalen, R. J. Wilson, *Phys. Rev. Lett. 59* (1987) 2879.
- [22] B. Milligan, J. Swan, *J. Chem. Soc. 62* (1962) 2172.
- [23] W. Steglich, B. Neises, *Angew. Chem. 90* (1978) 556; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 17* (1978) 522.

Synthese von Prothymosin α (ProTx), einem aus 109 Aminosäuren aufgebauten Protein**

Von Kleomenis Barlos*, Dimitrios Gatos
und Wolfram Schäfer

Die Synthese von Proteinen nach dem Prinzip der Festphasenpeptidsynthese oder durch Fragmentkondensation in Lösung ist trotz der Verwendung extrem reiner Aminosäurerivate und effizienter Kupplungs- und Deblockierungsmethoden schwierig. In der Tat wurden bisher nur wenige Synthesen von Proteinen, z. B. von Ribonuclease^[1], Interleukin 3^[2], Ubiquitin^[3] und Angiogenin^[4] beschrieben. Effektiver gelingt die Synthese von Proteinen mit biotechnologischen Verfahren^[5]. Damit können jedoch nur Proteine mit biologisch codierbaren Strukturmerkmalen hergestellt werden. Große Peptide und Proteine gewinnen jedoch zunehmend an Bedeutung, besonders für die Immunologie und Krebstherapie^[6 a]. Die Entwicklung einer allgemeinen, einfachen und in jeder Stufe gut durchschaubaren Synthesemethodik für reine und posttranslational modifizierte Proteine ist deshalb von erheblichem Interesse^[6 b].

Eine solche Synthese könnte, wie bereits früher postuliert^[7], durch die sequentielle Verknüpfung geschützter Peptidfragmente an einem Harz erfolgen. Das nach jeder Fragmentkondensation entstehende Peptid oder Protein muß einfach vom Harz abgespalten und analysiert werden können. Die Peptidfragmente, deren funktionelle Seitenketten mit leicht abspaltbaren Schutzgruppen vom *tert*-Butyl- und Triphenylmethyl(Trityl)-Typ blockiert sind, sollten einfach, schnell und mit möglichst hoher Ausbeute und Reinheit darstellbar sein. Dieses ist derzeit nur nach der Festphasenmethode unter Einsatz speziell entwickelter Harze möglich.

Bei der Überprüfung einer Reihe säureempfindlicher Harze des Diphenylmethyl- und des Triphenylmethyl-Typs^[8, 9] erwies sich das 2-Chlortriptyl-Harz **2**^[8] als besonders geeignet (Abb. 2). Seine wichtigsten Eigenschaften sind: a) Die Veresterung der C-terminalen Aminosäure des gewünschten Proteins gelingt schnell, racemisierungsfrei und in hoher Ausbeute. Die Fmoc-Aminosäuren reagieren mit **2** in Dichlormethan mit Diisopropyl(ethyl)amin (DIEA) als Chlorwasserstoffacceptor in 25 min bei Raumtemperatur. Da die Veresterung ohne elektrophile Aktivierung der Aminosäuren erfolgt, verläuft die Reaktion racemisierungsfrei. b) Das große Volumen des 2-Chlortriptyl-Harzes verhindert vollständig die Diketopiperazinbildung beim Durchlaufen der Di-

[*] Prof. Dr. K. Barlos, Dr. B. Gatos
Chemisches Institut der Universität
GR-Patras (Griechenland)
Prof. Dr. W. Schäfer
Max Planck Institut für Biochemie
W-8033 Martinsried

[**] Diese Arbeit wurde vom griechischen Ministerium für Industrie, Energie und Forschung (K. B.) sowie vom Bundesministerium für Forschung und Technologie (PtB 038824) (W. S.) gefördert. Wir danken Dr. C. N. Baxevanis und Dr. M. Papamihail (Abteilung Immunologie, Krebsforschungsinstitut, Athen) für die Prüfung der biologischen Aktivität des synthetischen ProTx.