

Experimentelles

- 2:** Zu 300 mL einer 0.25 M Lösung von $\text{Li}[\text{Al}(\text{PH}_2)_4]$ (75 mmol) in Tetraethylenglykoldimethylether wurden innerhalb von 10 min bei -30°C unter Röhren 11.46 g (67.4 mmol) SiCl_4 gegeben. Dabei bildete sich eine orangefarbene Reaktionslösung. Nach Entfernung der Kühlung wurden die flüchtigen Bestandteile (PH_3 , $\text{HSi}(\text{PH}_2)_3$ und **2**) bei 20°C und 10^{-3} Torr in eine auf -196°C gekühlte Falle kondensiert und danach durch Kondensation in hintereinander verbundene Kühlfallen bei -10° , -60° und -196°C fraktioniert. Dabei kondensieren **2** in der bei -10°C , $\text{HSi}(\text{PH}_2)_3$ in der bei -60°C und PH_3 in der bei -196°C gekühlten Falle. Ausbeute: 1.94 g (12.1 mmol, 18%); Schmp.: -25°C ; $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, C_6D_6 , 25°C): $\delta = 2.04$ (dm); $^{31}\text{P-NMR}$ (101 MHz, C_6D_6 , 25°C): $\delta = -205.0$ (tm, $^1\text{J}(\text{P},\text{H}) = 185.51$ Hz, $^2\text{J}(\text{P},\text{P}) = 14.28$ Hz, $^2\text{J}(\text{H},\text{H}) = 0.37$ Hz, $^4\text{J}(\text{P},\text{H}) = 4.35$ Hz); $^{29}\text{Si-NMR}$ (49 MHz, C_6D_6 , 25°C): $\delta = -12.17$ (nq, $^1\text{J}(\text{Si},\text{P}) = 52.5$ Hz, $^2\text{J}(\text{Si},\text{H}) = 7.5$ Hz); IR (Ar-Matrix, -218°C): $\tilde{\nu} = 2289$ (vs), 1183 (vs), 840 (w), 721 (m), 633 (m), 566 (w), 478 cm^{-1} (vs); MS (EI): m/z (%): 160 (30) [M^+], 127 (100) [$\text{M}^+ - \text{PH}_3$], 93 (61) [$\text{SiPH}(\text{PH}_2)^+$], 61 (17) [SiPH_2^+].
- 3/6:** Zu 10 mL einer 0.31 M Lösung von $\text{Li}[\text{Al}(\text{PH}_2)_4]$ (3.1 mmol) in Ethylenglykoldimethylether wurden bei -45°C unter Röhren 0.60 g (2.8 mmol) GeCl_4 getropft. Unter Gasentwicklung (PH_3) bildete sich eine gelbe Suspension, die filtriert wurde. Das klare Filtrat enthielt laut GC-MS nur **3** und **6** im Verhältnis von 1:2.5. **3:** MS(EI): m/z (%): 206 (10) [M^+], 173 (100) [$\text{M}^+ - \text{PH}_3$], 137 (100) [GeP_2H^+], 107 (82) [GePH^+], 74 (19) [Ge^+], 67 (19) [P_2H_5^+]. **6:** MS(EI): m/z (%): 174 (23) [M^+], 140 (90) [$\text{M}^+ - \text{PH}_3$], 107 (100) [$\text{M}^+ - \text{PH}_2\text{PH}_3$], 74 (40) [Ge^+].

Eingegangen am 30 März 1998 [Z11658]

Stichwörter: Germanium • NMR-Spektroskopie • Phosphor • Silane • Silicium

- [1] A. D. Norman, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6556.
[2] M. Baudler, G. Scholz, W. Oehlert, *Z. Naturforsch. B* **1989**, *44*, 627.
[3] A. E. Finholt, C. Helling, V. Imhof, L. Nielsen, E. Jacobsen, *Inorg. Chem.* **1963**, *2*, 504; M. Driess, K. Merz, H. Pritzkow, R. Janoschek, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2688; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2507.
[4] A. D. Norman, D. C. Wingelet, *Inorg. Chem.* **1970**, *9*, 98.
[5] Die Spektrensimulation wurde mit dem Programm Perch, Version 1/96, University of Knopio (Finnland), durchgeführt.
[6] Ein Einkristall von **2** wurde auf einem Vierkreisdiffraktometer bei 242 K durch ein miniaturisiertes Zonenschmelzen mit fokussierter Infrarot-Laserstrahlung in einer Kapillare mit 0.3 mm Durchmesser gebildet.^[9] **2:** monoklin, Raumgruppe $P2_1/c$, $a = 10.659(3)$, $b = 7.137(2)$, $c = 10.832(3)$ Å, $\beta = 101.72(2)^\circ$, $V = 806.8(4)$ Å³, $Z = 4$, $\rho = 1.318$ g cm⁻³, $\Theta_{\max} = 30^\circ$, 2464 gemessene, 2316 unabhängige Reflexe ($R_{\text{merg}} = 0.0379$), davon 1752 beobachtet ($I > 2\sigma(I)$). Die Intensitätsmessungen erfolgten mit einem Nicolet R3m/V Vierkreisdiffraktometer (MoK_α-Strahlung, $\lambda = 0.71073$ Å, ω -Scan, $T = 123$ K); Strukturlösung mit Direkten Methoden,^[10a] Verfeinerung mit allen gemessenen Reflexen gegen F^2 ,^[10b] Si- und P-Atome anisotrop, die Wasserstoffatomenlagen wurden aus einer Differenz-Fourier ermittelt und mit P-H-Abständen aus der Summe der Kovalenzradien (1.42 Å) als reitende Gruppen mit gruppenweise gleichen isotropen Temperaturfaktoren verfeinert. Eine Verfeinerung ohne Restriktionen führte zu unsinnig verkleinerten P-H-Abständen. $R_1 = 0.0479$, $wR2 = 0.1306$ (alle Daten), 50 Parameter. Modelle mit höherer lokaler Symmetrie (D_{2d} oder S_4) ergaben signifikant höhere R -Werte ($R_1 > 0.10$). Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen (Fax: (+49) 7247-808-666; E-mail: crysdata@fiz-karlsruhe.de), unter der Hinterlegungsnummer CSD-408423 angefordert werden.
[7] GAUSSIAN 94, Revision B.3., M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, T. Keith, G. A. Petersson, J. A. Montgomery, K. Raghavachari, M. A. Al-Laham, V. G. Zakrzewski, J. V. Ortiz, J. B. Foresman, C. Y. Peng, P. Y. Ayala, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, E. S. Replogle, R.

Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, J. S. Binkley, D. J. Defrees, J. Baker, J. P. Stewart, M. Head-Gordon, C. Gonzalez, J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **1995**.

- [8] Übersicht: W. S. Sheldrick in *The Chemistry of Organic Silicon Compounds* (Hrsg.: Z. Rappoport, S. Patai), Wiley, New York, **1989**, S. 254.
[9] R. Boese, M. Nussbaumer in *In Situ Crystallisation Techniques in Organic Crystal Chemistry* (Hrsg. D. W. Jones), Oxford University Press, Oxford, **1994**, S. 20–37.
[10] a) G. M. Sheldrick, *SHELXS86*, Universität Göttingen, **1986**; b) G. M. Sheldrick, *SHELXL93*, Universität Göttingen, **1993**.

Kovalente DNA-Streptavidin-Konjugate als Bausteine für neuartige biometallische Nanostrukturen**

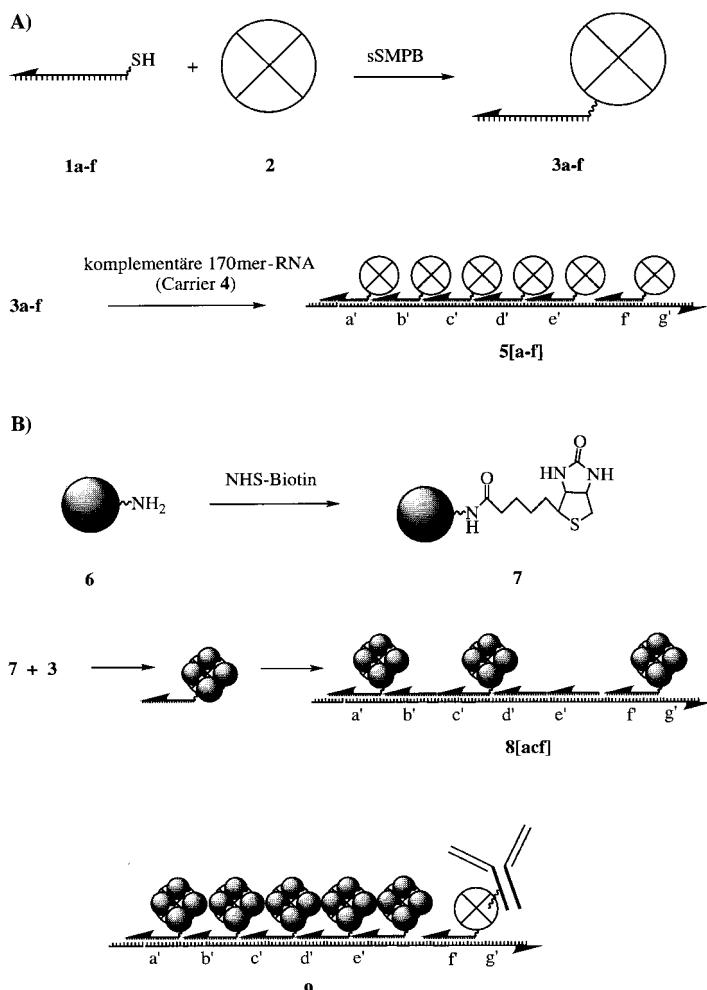
Christof M. Niemeyer,* Wolfgang Bürger und Jörg Peplies

Ein Schwerpunkt der Nanotechnologie ist die Herstellung von Struktur- und Funktionselementen im Nanometerbereich – vorzugsweise durch Selbstorganisation kleiner Molekülbausteine zu größeren Einheiten.^[1] DNA ist wegen ihrer einzigartigen Erkennungseigenschaften, physikalisch-chemischen Stabilität und mechanischen Starrheit ein vielversprechender Werkstoff für die Konstruktion nanostrukturierter Gerüstverbindungen^[2–4] und kann beispielsweise zur genauen räumlichen Positionierung von leitfähigen Polymeren,^[5] Proteinen^[6] oder nanokristallinen Goldclustern^[7–9] verwendet werden. Wir haben über die Synthese von kovalenten Konjugaten aus Einzelstrang-DNA und Streptavidin (STV) berichtet.^[10] Die Oligonucleotideinheit erweitert die native Bindungskapazität des STV für vier Moleküle Biotin um eine hochspezifische Bindungsstelle für die komplementäre Nucleinsäure, so daß die Hybride als molekulare Adapter verwendet werden können, um biotinylierte Komponenten an Nucleinsäuren zu positionieren. Wir berichten nun über die Selbstorganisation der DNA-STV-Addukte **3** zu supramolekularen Aggregaten **5** und über die Verwendung der Adapter zur Herstellung der nanostrukturierten biometallischen Aggregate **8** und **9** aus biotinderivatisierten Metallkolloiden (Schema 1).

Ausgehend von sechs 5'-Thiol-modifizierten Oligonucleotiden mit unterschiedlicher Basensequenz, **1a–f**, und rekombinantem STV **2** wurden unter Verwendung des heterobispezifischen Crosslinkers Sulfosuccinimidyl-4-(*p*-maleimidophenoxy-

[*] Dr. C. M. Niemeyer, Dipl.-Chem. W. Bürger, J. Peplies
Universität Bremen, FB2-UFT
Biotechnologie und Molekulare Genetik
Leobener Straße, D-28359 Bremen
Fax: (+49) 421-218-7578
E-mail: cmn@biotec.uni-bremen.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, vom Fonds der Chemischen Industrie und von der Tönjes-Vagt-Stiftung gefördert. Wir danken den Mitarbeitern des Instituts für Werkstoffphysik und Strukturforschung der Universität Bremen für Hilfestellung bei den TEM-Aufnahmen und Prof. Dr. D. Blohm für kritische Diskussionen und großzügige Unterstützung.



Schema 1. Schematische Darstellung der DNA-Protein-Hybride. A) Aufbau supramolekularer Aggregate aus DNA-STV-Konjugaten **3**, die durch kovalente Verknüpfung aus 5'-Thiol-modifizierten Oligonukleotiden **1** und Streptavidin **2** synthetisiert wurden. (Die Pfeilspitzen markieren das 3'-Ende der Oligonukleotidkomponenten, die geschlängelten Linien stellen Spacerketten zwischen DNA und Protein dar.) Die Konjugate **3** mit den Basensequenzen **a-f** fügen sich in Gegenwart des RNA-Moleküls **4**, das komplementäre Sequenzabschnitte enthält, durch Selbstorganisation zu supramolekularen Verbänden **5** zusammen. B) Aufbau biometallischer Aggregate. Monoamino-Goldcluster **6** wurden in Biotinderivate **7** überführt und an DNA-STV Addukte **3** gekoppelt. Die resultierenden Hybride bilden in Gegenwart des RNA-Carriers **4** und von Helfernukleotiden **1** supramolekulare Aggregate wie **8[acf]**. (Die Buchstabenfolge in eckigen Klammern entspricht den enthaltenen Proteinbausteinen.) Das einen Antikörper enthaltende Aggregat **9** wurde analog aus goldmarkiertem **3a-e** und einem separat hergestellten Konjugat aus **3f** und einem biotinylierten IgG erhalten.

nyl)butyrat (sSMPB) die DNA-STV-Hybride **3** synthetisiert.^[6] Die Nukleinsäuresequenzen der Adapter **3a-f** stammen von einem Abschnitt aus ca. 170 Basenpaaren des Antisense-Strangs des Bakteriophagen M13mp18 und wurden bezüglich ihres Hybridisierungsverhaltens untersucht.^[10] Als Templat für die supramolekulare Organisation der Adapter wurde durch In-vitro-Transkription ein RNA-Molekül **4** hergestellt, das die zu **3a-f** komplementären Sequenzabschnitte in der Abfolge 5'-a'-b'-c'-d'-e'-f'-g'-3' enthält.

Um die Organisation mehrerer Proteinkomponenten am Carrier-Molekül und die entstandenen Aggregate **5** untersuchen zu können, wurde der häufig zur Analyse von Bio-

molekülwechselwirkungen verwendete elektrophoretische Gel-Shift-Assay^[11] meßtechnisch verändert: Durch Markierung mit einer 5'-Fluorescein-derivatisierten Oligonukleotidsonde (G18), die komplementär zum Bindungsbereich **g'** des RNA-Carriers ist, lassen sich die DNA-Protein-Aggregate mit einem Sequenzierautomaten charakterisieren. Diese Methode eignet sich wegen der hohen Empfindlichkeit und Quantifizierbarkeit der Fluoreszenzdetektion und der gegenüber konventionellen Elektrophoresemethoden deutlich höheren Trennleistung im hochmolekularen Bereich ausgezeichnet zur Analyse supramolekularer DNA-Protein-Aggregate ebenso wie für grundlegende Untersuchungen des Selbstorganisationsprozesses.

In einer ersten Versuchsreihe wurde der schrittweise Aufbau eines Aggregats aus sechs DNA-STV-Addukten untersucht (Abb. 1A). Das Gemisch aus dem RNA-Carrier **4**, der Fluoreszenzsonde G18 und dem Hybrid **3a** im Überschuss (Spur 1 in Abb. 1A) gab neben den Banden der freien Sonde und des RNA-G18-Heteroduplexes lediglich eine weitere Bande im Bereich höherer Molekulargewichte, die dem Aggregat **4·3a·G18** zugeordnet wurde. Daß trotz des Überschusses an **3a** keine höhermolekularen Produkte auftraten, ist ein Hinweis darauf, daß die Aggregation ausschließlich auf spezifischer Watson-Crick-Basenpaarung beruht. Dagegen führte die Zugabe weiterer, zum Carrier komplementärer Addukte wie **3b** (Spur 2 in Abb. 1A) zur Bildung neuer Spezies mit geringerer elektrophoretischer Mobilität. Nachfolgend wurden supramolekulare Aggregate aus bis zu sechs Proteinkomponenten aufgebaut und so definierte Molekülverbände mit relativen Molekulargewichten von mehr als 400 kDa gebildet (Spuren 3–6 in Abb. 1A). Die Quantifizierung der Fluoreszenzbanden ergab eine Zunahme der Aggregationsausbeute mit der Zahl gebundener Konjugate **3**. Dies ist ein Hinweis auf kooperative Effekte beim Selbstorganisationsprozeß, die durch das zunehmende Aufbrechen von Sekundärstrukturen des Nukleinsäure-Carriers und die damit einhergehende Stabilitätserhöhung der DNA-Protein-Aggregate hervorgerufen werden.^[12] Um diesen Effekt zu untersuchen, wurde der Aufbau exemplarischer Aggregate mit Kontrollreaktionen verglichen, in denen die noch freien Positionen des Carriers durch „Helfer-Oligonukleotide“^[12] abgesättigt sind (Abb. 1B). Bei Aggregaten mit zwei Proteinkomponenten, z.B. **5[ad]** und **5[bd]**, bewirkten die Helfer-Oligonukleotide nicht nur eine Verdoppelung der Signallintensitäten, sondern auch die Komplettierung der zuvor unvollständigen gemeinsamen Aggregation beider Proteinkomponenten. Diese Ergebnisse zeigen, daß die oligonukleotidvermittelte Selbstorganisation molekularer Komponenten durch Vermeidung von Sekundärstrukturen im Nukleinsäuregerüst erheblich verbessert werden kann.^[13]

Angeregt durch Arbeiten zur oligonukleotidvermittelten Organisation von Goldclustern^[7–9] wollten wir prüfen, ob sich die Adaptermoleküle **3** zur Herstellung von nanostrukturierter Metallaggregaten eignen (Schema 1B). Dazu wurden präparative Mengen der supramolekularen Aggregate **5** aus Kombinationen der DNA-STV-Einzelkomponenten synthetisiert und durch Gelfiltrationschromatographie von den nicht assoziierten Einzelkomponenten getrennt. Die Kalibrierung der Filtrationssäule ergab für die Aggregate **5[acf]** und **5[a-f]**

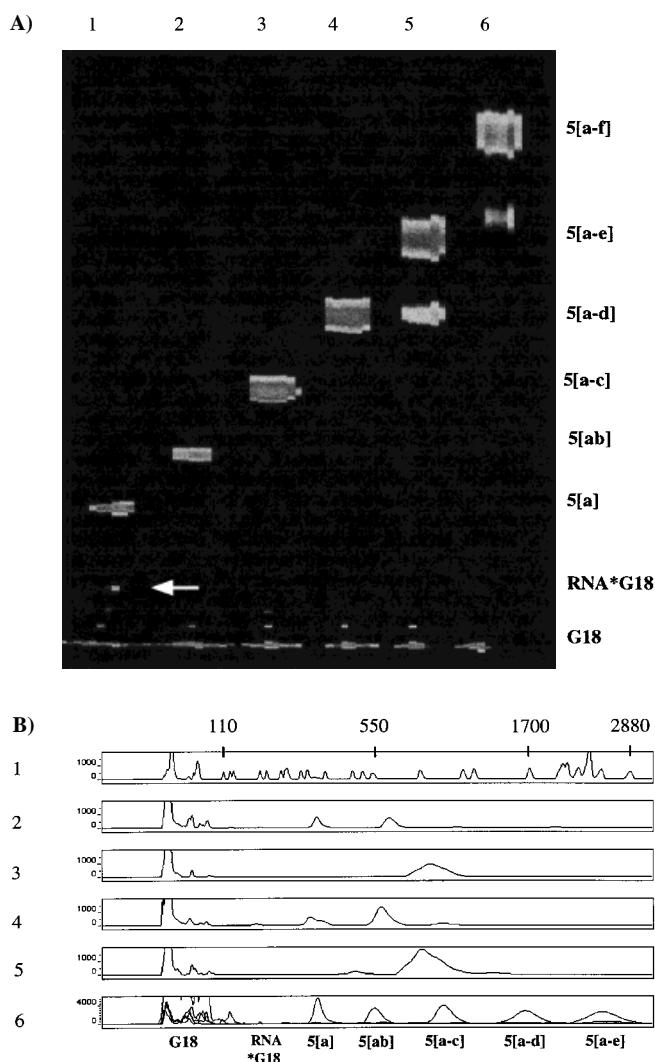


Abb. 1. Untersuchung des supramolekularen Aufbaus der DNA-STV-Aggregate **5** durch Fluoreszenz-Gel-Shift-Analyse. A) Die Spuren 1–6 entsprechen dem schrittweisen Aufbau des oligomeren Aggregats **5[a–f]**. Der Pfeil markiert die Bande der freien RNA **4**. Die zunehmende Zahl gebundener Proteinkomponenten führt zu höherer Bandenintensität. (Die im Original blauen Fluoreszenzbanden sind hier schwarz-weiß dargestellt.) Die penta- und hexameren DNA-Protein-Aggregate (Spuren 5 und 6) zeigen verstärkt Dissoziation, die im Verlauf der Gelelektrophorese durch das Fehlen von Kationen, die die Doppelhelix stabilisieren, begünstigt ist. B) Liniendiagramme der Gel-Shift-Analyse von **5[ad]** und **5[bd]** (Spuren 2 und 4). Die Komplexbildung ist unvollständig, so daß z. B. in Spur 2 binäre Aggregate gleicher Mobilität (**5[a]** und **5[d]**) neben dem ternären Aggregat **5[ad]** vorliegen. „Helper-Oligonukleotide“, die komplementär zu den nicht belegten Sequenzabschnitten sind, bewirken die Komplettierung der Aggregation und führen zur Verringerung der elektrophoretischen Mobilität von **5[ad]** (Spur 3) und **5[bd]** (Spur 5). Spur 1: DNA-Längenstandard (GeneScan-2500 Rox, Längenangabe in Basenpaaren). Spur 6: Überlagerung von fünf Gelspuren des sukzessiven Aufbaus eines pentameren Aggregats analog zur Gel-Shift-Analyse in A).

Molekulargewichte von ca. 240 bzw. 440 kDa. Als Metallkomponenten wurden kommerziell erhältliche Goldcluster **6** von 1.4 nm Größe mit einem Monoaminosubstituenten verwendet. Nach Derivatisierung mit *N*-Hydroxysuccinimidyl-biotin lassen sich die Metallkolloide **7** an die DNA-STV-Adapter binden. Das Vorliegen von Goldpartikeln in den Protein-Hybriden wurde bei der chromatographischen Isolie-

rung durch die charakteristische Absorption bei 420 nm verifiziert.

Bei der Untersuchung der Biometallaggregate durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ließen sich mehrere, an ein STV-Molekül gebundene Goldcluster optisch nicht differenzieren. Die mittleren Teilchengrößen betragen – abhängig von der Stöchiometrie der Kopplung – 1.3 ± 0.2 , 2.3 ± 0.3 , 3.6 ± 0.3 und 4.5 ± 0.3 nm und sind nach Modellbetrachtungen^[14] in Einklang mit Mono-, Di-, Tri- bzw. Tetra-Addukten von **7** mit STV. TEM-Aufnahmen der goldmarkierten Aggregate zeigen sowohl gestreckte als auch gewinkelte Strukturen (Abb. 2). Aggregate aus drei Protein-Komponenten **8[acf]** haben Teilchengrößen von ca. 4.5 nm und zwei charakteristische Teilchenabstände von ca. 5 ± 2 und 10 ± 3 nm (Abb. 2A). Dieses Ergebnis korreliert mit der

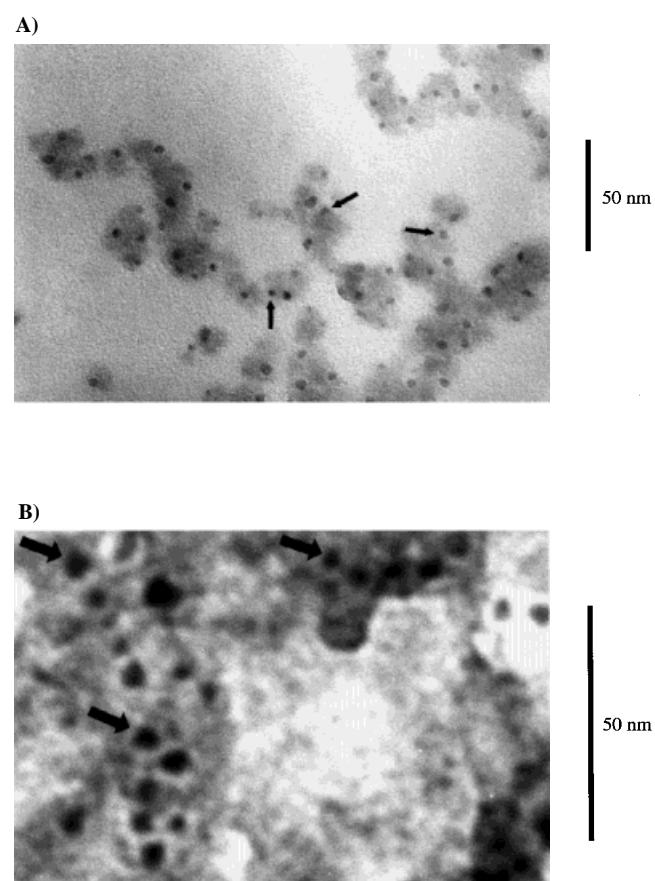


Abb. 2. TEM-Aufnahmen von goldclustermarkierten supramolekularen Aggregaten. A) DNA-Protein-Aggregat **8[acf]** aus drei DNA-STV-Adaptoren und RNA. Die Zentralteilchen typischer Aggregate sind durch Pfeile markiert. B) Aggregat **9** aus fünf goldmarkierten Adaptoren **3a–e**, Anti-Maus-IgG-Konjugat **3f** und RNA. Da die vier STV-gebundenen Cluster nicht aufgelöst sind, erscheinen einzelne goldmarkierte Adapter als runde kontrastreiche Strukturen. Die schattigen Bereiche im Hintergrund werden von der zunächst aufgebrachten Protein-Matrix – Poly-D,L-Lysin in A), Maus-IgG in B) – hervorgerufen.

schematischen Aggregatstruktur (Schema 1), da die beiden Nucleinsäure-Spacerregionen aufgrund der Lücken im Rückgrat der Doppelhelix eine hohe Flexibilität aufweisen.

Als nächstes sollte eine funktionelle Proteinkomponente in die Biometallaggregate integriert werden. Zur Herstellung des Immunglobulin(IgG)-haltigen Konstruktes **9** wurden in

getrennten Ansätzen zunächst das DNA-STV-Hybrid **3f** mit biotinyliertem Antikörper gegen IgG der Maus und die Hybride **3a–3e** mit biotinderivatisierten Goldclustern gekoppelt. Nach Organisation der Komponenten am RNA-Carrier und chromatographischer Reinigung wurde das Produkttaggregat auf seine Funktionalität geprüft. Dazu wurden TEM-Netze mit Maus-IgG beschichtet und kurz mit einer Lösung von **9** in Kontakt gebracht. Während bei Kontrollreaktionen mit Kaninchen-IgG keine Metallkolloide beobachtet wurden, zeigten TEM-Aufnahmen der Antigen-modifizierten Oberflächen deutliche Clusteransammlungen, in denen auch isolierte Kettenstrukturen erkennbar waren (Abb. 2B). Die Metallaggregate haben mittlere Teilchendurchmesser und Partikelabstände von 4.6 ± 0.3 bzw. 2.7 ± 0.4 nm. Daraus ergibt sich für die Nucleinsäuredomäne in den DNA-STV-Einzelkomponenten eine Länge von etwa 7.3 nm. Dies entspricht dem erwarteten Wert von 7.1 nm für eine 21-bp-Doppelhelix. Die Länge der drei Kettenstrukturen beträgt ca. 33 ± 2 nm und korreliert ebenfalls mit dem theoretischen Wert von ca. 37 nm für eine 108-bp-Doppelhelix, wenn man die Flexibilität des 1.2-nm-Spacers zwischen Oligonukleotid und STV berücksichtigt.

Diese Experimente belegen, daß kovalente Konjugate aus Oligonukleotiden und Streptavidin als vielseitige Adaptermoleküle für den Aufbau neuartiger nanostrukturierter Molekülverbände eingesetzt werden können. Weitere grundlegende Untersuchungen im Hinblick auf Struktur, Stabilität, Bildungseigenschaften und Modifizierbarkeit von supramolekularen Aggregaten auf Nucleinsäurebasis werden zeigen, ob biotechnische Anwendungen wie die Entwicklung von Sensor- oder Schaltelementen, von synthetischen Multienzymkomplexen oder Interface-Strukturen zwischen elektronischen und biologischen Systemen realisierbar sind.

Experimentelles

Kovalente DNA-STV-Addukte aus 5'-thiolierten Oligonukleotiden (NAPS, Göttingen) und rekombinantem STV (Boehringer, Mannheim) wurden unter Verwendung des heterobispezifischen Crosslinkers sSMPB (Pierce) in ca. 10–15% Ausbeute synthetisiert.^[6] Die Basensequenzen der verwendeten Oligonukleotide **1a–f** lauten: 5'-Thiol-TCCGTGTG AAATTG TTATCCGCT-3' (**1a**); 5'-Thiol-GTA ATC ATG GTC-ATA GCT GTT-3' (**1b**); 5'-Thiol-CCGGGTACCGAG CTC GAATTG-3' (**1c**); 5'-Thiol-CAG GTC GACTCTAGAGGATCC-3' (**1d**); 5'-Thiol-AGT GCCAAG CTT GCATGCCGCTG-3' (**1e**); 5'-Thiol-GTT TCCCA GTC-ACG ACG TTG TAA-3' (**1f**). Zur Herstellung des RNA-Carriers **4** wurde ausgehend von M13mp18-DNA ein doppelsträngiges 189-bp-DNA-Fragment mit den Primern M13T7 (5'-GTA ATC ATG GTC ATAGCTGTT-GTA ATC ATG GTC ATAGCTGTT-3') und M13G3 (5'-GTA ATC ATG GTC ATAGCTGTT-3') durch Polymerasekettenreaktion (PCR) synthetisiert. Der Primer M13T7 enthält die Promoter-Region für T7-RNA-Polymerase (unterstrichen). Die In-vitro-Transkription des gereinigten PCR-Produkts lieferte ca. 10 Mol-Äquiv. der entsprechenden 170-mer-RNA, die konventionell durch Elektrophorese an Acrylamidgel (10%) mit 7M Harnstoff unter Verwendung eines DNA-Längenstandards (GIBCO) charakterisiert wurde.

Fluoreszenz-Gel-Shift-Analysen wurden mit einem ABI Prism-377-DNA-Sequenzierautomaten (Perkin Elmer) durchgeführt. Die Basensequenz der 5'-Fluorescein-derivatisierten G18-Oligonukleotidsonde (NAPS) lautet: 5'-Fluorescein-GTA ATG GTC ATAGCTGTT-3'. In einem typischen Experiment wurden 3 pmol der Hybridkomponenten (3 µM Stammlösungen in Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)-Puffer, pH 7.3 mit 150 mM NaCl) mit 0.5 pmol RNA **4** und 0.5 pmol G18-Sonde gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Sind keine temperaturempfindlichen Komponenten ent-

halten, kann die Aggregation auch in 2 min bei 50 °C erfolgen. Von den so hergestellten Proben wurde 1 µL auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamid-Gel (4%) aufgetragen und durch Elektrophorese bei 750 V und 50 mA in 3.5 h bei 20 °C getrennt. Die Fluoreszenzbanden wurden mit dem Programm ABI-Prism-GeneScan 2.0.2 (Perkin Elmer) analysiert.

20 nmol aminomodifizierte 1.4-nm-Goldcluster (Monoamino-Nanogold, Nanoprobe) in 100 µL Phosphatpuffer wurden mit 10 Äquiv. NHS-Biotin (Pierce) 1 h bei Raumtemperatur umgesetzt und chromatographisch gereinigt (Superdex-Peptide-FPLC-Säule, Pharmacia). Zur Konjugation mit **3** wurden 100 pmol der DNA-STV-Hybride mit 2–8 Mol-Äquiv. **7** gemischt, 1 h inkubiert, 100 pmol RNA **4** zugegeben und erneut 1 h inkubiert. In einigen Ansätzen wurden zunächst die Aggregate **5** präpariert, chromatographisch gereinigt (Superdex-200, Pharmacia) und anschließend mit **7** umgesetzt. Nach erneuter Reinigung wurden die Aggregate durch Ultrafiltration konzentriert (Centricon, Millipore) und photometrisch quantifiziert. Zur Herstellung von **9** wurden vor der RNA-Zugabe in getrennten Ansätzen **3a–e** mit **7** und **3f** mit biotinderivatisiertem Ziege-anti-Maus-IgG (Dianova) gekuppelt. Zur TEM-Charakterisierung wurden Kupfernetze (400 mesh) mit einer dünnen Graphitfolie (Plano) verwendet, die mit Proteinen (IgG aus Maus oder Kaninchen oder Poly-D,L-Lysin (Boehringer-Mannheim) 1 mg mL⁻¹ in phosphatpufferter NaCl-Lösung (PBS)) beschichtet wurden. Zur Immobilisierung wurde ein 5-µL-Tropfen der Gold-markierten Aggregate (1–10 nm) auf das Netz gegeben und 2 min inkubiert. Die TEM-Bilder wurden mit einem EM-420 Gerät (Philips) bei 120 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen.

Eingegangen am 29. Dezember 1997,
veränderte Fassung am 9. April 1998 [Z11301]

Stichwörter: DNA-Hybridisierung • Nanostrukturen • Supramolekulare Chemie

- [1] a) R. P. Feynman in *Miniatrization* (Hrsg.: H. D. Gilbert), Reinhold, New York, **1961**, S. 282; b) K. E. Drexler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 5275; c) J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, VCH, Weinheim, **1995**, S. 193; d) D. Philp, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1242; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1154.
- [2] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, 99, 237.
- [3] N. C. Seeman, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 357.
- [4] C. M. Niemeyer, *Angew. Chemie* **1997**, 109, 603; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 585.
- [5] B. H. Robinson, N. C. Seeman, *Protein Eng.* **1987**, 1, 295.
- [6] C. M. Niemeyer, T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 5530.
- [7] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, 382, 607.
- [8] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, Jr., P. G. Schultz, *Nature* **1996**, 382, 609.
- [9] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science* **1997**, 277, 1078.
- [10] Vergleichende Untersuchungen zur Hybridisierungskinetik von **1a–f** und **3a–f** ergaben erhebliche Affinitätsunterschiede für die Sequenzen **a–f**: Die Hybridisierungseffizienz bei Raumtemperatur nimmt in der Reihe **a > b, f > c, d > e** ab und korreliert mit strukturchemischen Eigenschaften der Oligonukleotide. Die Anknüpfung von STV bewirkt geringe Änderungen dieser sequenzspezifischen Bindung: Assoziation und Dissoziation von **3a–f** sind gegenüber **1a–f** bis zu fünfmal langsamer. C. M. Niemeyer, W. Bürger, R. J. M. Hoedemakers, *Bioconjugate Chem.* **1998**, 9, 168.
- [11] *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Wiley, New York, **1996**.
- [12] Dieser Effekt wurde z. B. für die Bindung von 12-mer-Oligonukleotiden an ein RNA-Molekül beschrieben: G. Godard, J.-C. Francois, I. Duroux, U. Asseline, M. Chassignol, N. Thuong, C. Helene, T. Saison-Behmoaras, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 4789.
- [13] Auch wenn die Denaturierungstemperatur von STV bei 75 °C liegt (M. González, L. Bagatolli, I. Echabe, J. Arrondo, C. Argaraña, C. R. Cantor, G. Fidelio, *J. Biol. Chem.* **1997**, 11288), erfordert die oligonukleotidvermittelte Proteinaggregation wegen der thermischen Instabilität vieler Biomoleküle, wie auch der Goldcluster **6**, die

Einhaltung moderater Hybridisierungstemperaturen. Die RNA **4** bildet bei diesen Temperaturen Sekundärstrukturen mit ähnlicher Stabilität ($\Delta G \approx -44.6 \text{ kcal mol}^{-1}$) wie die Oligonucleotid-Doppelhelices^[10] ($\Delta G = -34.2$ bis $-44.7 \text{ kcal mol}^{-1}$). Dadurch wird die thermodynamische Stabilität der binären Aggregate **5** je nach Sequenz unterschiedlich stark beeinflußt. Versuche mit geänderten Aggregationszeiten und -temperaturen lassen darauf schließen, daß sich das System unter den angegebenen Bedingungen im thermodynamischen Gleichgewicht befindet. Der Einfluß durch Helfer-Oligonucleotide hängt somit nicht nur von der Basensequenz, sondern auch von der Zahl der DNA-STV-Hybride ab. Während die Bildung binärer Aggregate je nach Sequenz durch Helfer-Oligonucleotide positionsabhängig (z.B. bei **5[d]**, **5[e]**) bis etwa zum 20fachen erhöht wird, zeigt der Vergleich ternärer Aggregate – abhängig von den verwendeten Bausteinen – eine bis zu dreifach höhere Signalintensität. Diese Steigerungsraten sind in Einklang mit der berechneten Sekundärstruktur von **4**, wonach insbesondere der Sequenzabschnitt d'-e'-f' als stabile doppelhelicale Domäne vorliegt. Bei Aggregaten mit vier und mehr Proteinkomponenten wird kaum eine Steigerung erreicht.

- [14] Das Protein mißt ca. $4 \times 4.2 \times 5.6 \text{ nm}$, die vier Biotin-Bindungszentren im Inneren des Moleküls bilden einen verzerrten Tetraeder mit einer mittleren Kantenlänge von ca. 2.3 nm ; P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science* **1989**, *243*, 85. Die Markierung von Avidin mit ähnlichen Goldclustern (1 nm) ergab einen Abstand von ca. 2 nm zwischen den Biotin-Bindungstellen; D. E. Safer, J. Hainfeld, J. S. Wall, J. E. Reardon, *Science* **1982**, *218*, 290.

Oligomere mit intercalierenden Cytosin-Cytosin⁺-Basenpaaren und Peptidrückgrat: Analoga des DNA-i-Motivs**

Ulf Diederichsen*

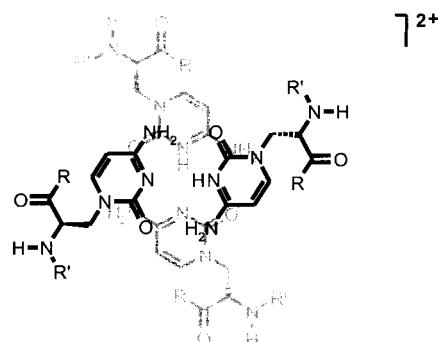
Die Enden von Chromosomen werden von telomerer DNA gebildet, die aus einem Guanin-reichen Strang sowie der komplementären Cytosin-reichen DNA in bis zu 1000 Wiederholungssequenzen besteht.^[1] Die Organisation des Guanin-reichen Stranges in Tetraden ist ein bekanntes Strukturmotiv, in dem das Donor/Acceptor-Muster des Guanins eine gleichzeitige Paarung über die Watson-Crick- und die Hoogsteen-Seite erlaubt.^[2] Unerwartet war hingegen, daß auch Cytosin-reiche Oligomere Tetraden bilden, da Pyrimidine keine Hoogsteen-Seite aufweisen und grundsätzlich einen kleineren Beitrag zur Stabilität durch Basenstapelung beisteuern. Durch Semiprotonierung eines C-C-Basenpaares bei pH 4.5–6.5 kann jedoch eine dreizähnige Paarung im reversen Watson-Crick-Modus unter paralleler Anordnung der DNA-Stränge verwirklicht und durch Intercalation von zwei C-C⁺-paarenden Doppelsträngen weitere Stabilisierung in einer C-Tetrade erreicht werden.^[3–5]

[*] Dr. U. Diederichsen

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching
Fax: (+49) 89-2891-3210
E-mail: ud@linda.org.chemie.tu-muenchen.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Di 542 2-1, Di 542 3-1), vom Fonds der Chemischen Industrie und von der Leonhard-Lorenz-Stiftung gefördert. Ich danke Herrn Professor H. Kessler, Garching, für seine Unterstützung.

Die Wechselwirkung der Basenpaarebenen beruht lediglich auf einer Wechselwirkung der Carbonyl- und Aminogruppen, die mit entgegengerichtetem Dipol übereinander zu liegen kommen (Schema 1). Diese Anordnung der Basenpaare



Schema 1. Benachbarte C-C⁺-Basenpaarebenen in einer dem DNA-i-Motiv analogen Alanyl-PNA-Tetrade.

leistet einen erheblichen Beitrag zur Stabilisierung, der sich in einem Basenpaarabstand von nur 3.1 \AA äußert. Derartige C-C⁺-DNA-Tetramere werden in Anlehnung an die Intercalation zweier Doppelstränge als i-Motiv bezeichnet und wurden von Gehring et al. in einer NMR-Strukturanalyse des DNA-Oligomers d(TCCCC)^[3] und von Chen et al. basierend auf einer Kristallstruktur von d(C₄) beschrieben.^[4] Inzwischen sind die C-Tetraden aus intercalierenden C-C⁺-Doppelsträngen als DNA-Strukturmotiv etabliert.^[5] Die Intercalation erfordert ein Aufwinden der Doppelhelix und führt beim i-Motiv zu einer Helicität von nur 12.4° – 16° . Die Cytosin-Cytosin-Selbstpaarung hat uns im Rahmen unserer Untersuchung von Alanyl-PNA^[6] besonders interessiert, da die fast bis zur Linearität gestreckte Rückgratstruktur im i-Motiv für Alanyl-PNA eine analoge Struktur erwarten ließ.

Alanyl-PNA besteht aus einem regulären, alternierend konfigurierten Peptidrückgrat aus Alanylseinheiten mit Nucleobasen in β -Position und paart in Doppelsträngen mit gestrecktem Rückgrat. Die Linearität der Alanyl-PNA-Paarungskomplexe ist strukturimmanent, da der Abstand aufeinanderfolgender Seitenketten dem DNA-Stapelungsabstand von 3.4 \AA sehr nahe kommt. Die Alternanz der Nucleoaminoäure-Konfiguration ist erforderlich, um die Nucleobasen auf einer Seite des Rückgrats zu orientieren.

Zur Untersuchung der C-C-Paarung haben wir die Oktamere H-(AlaC-AlaC)₄-Lys-NH₂ **1** und H-(AlaC-AlaC)₄Lys-NH₂ *ent*-**1** (AlaC=β-(Cytosin-1-yl)alanin, *d*-konfigurierte Aminosäuren sind unterstrichen; Lysinamid wurde C-terminal aus Löslichkeitsgründen eingeführt) synthetisiert,^[7] bei denen der Abstand der Nucleobasen keine Intercalation zuläßt und weiteres Strecken des Doppelstranges nicht möglich ist. Hingegen erlaubt bei den Oligomeren H-(Gly-AlaC)₄-Lys-NH₂ **2** und H-(Gly-AlaC)₄Lys-NH₂ *ent*-**2** das in jeder zweiten Einheit vorhandene Glycin räumlich die Intercalation linearer Doppelstränge (Schema 2). Die Synthese der Oligomere in jeweils beiden enantiomeren Formen war erforderlich, da aufgrund der Paarungsselektivität von Alanyl-PNA der für die C-C-Paarung einzige mögliche reverse Watson-Crick-Modus nur mit antiparalleler Strangorientie-