

Helicale Kristallisation von Proteinen auf Kohlenstoffnanoröhren: ein erster Schritt zur Entwicklung neuer Biosensoren**

Fabrice Balavoine, Patrick Schultz, Cyrille Richard, Véronique Mallouh, Thomas W. Ebbesen und Charles Mioskowski*

Seit ihrer Entdeckung 1991^[1] haben Kohlenstoffnanoröhren wegen ihrer besonderen Struktur beträchtliches Interesse erregt: Es sind mehrere Mikrometer lange Röhren mit einem Durchmesser von nur wenigen Nanometern. Ihre hervorragenden mechanischen und elektronischen Eigenschaften^[2] haben aus ihnen vielversprechende Nanomaterialien für neue Anwendungen in Chemie und Physik, besonders für neue Entwicklungen in der Nanotechnologie gemacht. Es ist bis jetzt aber nur über wenige Anwendungen in der Biologie berichtet worden. Kleine Proteine wurden in den Hohlraum offener Nanoröhren eingebracht, und diese bildeten so natürliche Nanoreagensgläser.^[3] Es ist ebenfalls von großem Interesse, die äußere Oberfläche dieser Kohlenstoffnanoröhren mit biologischen Makromolekülen wie Oligonucleotiden^[4] oder Proteinen zu beschichten. Solche Vorrichtungen könnten die Entwicklung neuer Biosensoren und bioelektronischer Nanomaterialien fördern, wobei die spezifischen biomolekularen Erkennungseigenschaften der immobilisierten Makromoleküle genutzt würden.

Für diese Zwecke müssen die für die spezifische Erkennung erforderlichen Funktionseinheiten auf der äußeren Oberfläche der Kohlenstoffnanoröhren dicht gepackt vorliegen, und das Protein muß funktional sein. Ein gutes Kriterium für die Erhaltung der funktionalen Eigenschaften des Proteins ist seine Fähigkeit, ein geordnetes Netz zu bilden. Tatsächlich sind die zylindrische Form, die perfekte Geradlinigkeit und die außergewöhnliche Starrheit^[5] der Kohlenstoffnanoröhren ideale Voraussetzungen für das Wachstum helicaler Proteinkristalle auf ihrer Oberfläche (Abbildung 1).

Diese Nanoröhren sind einfach zu handhaben und können in Gramm-Mengen mit der Bogenentladungsmethode^[2] hergestellt werden. Diese Methode führt zur Bildung von mehrwandigen Nanoröhren (MWNTs), die aus mehreren

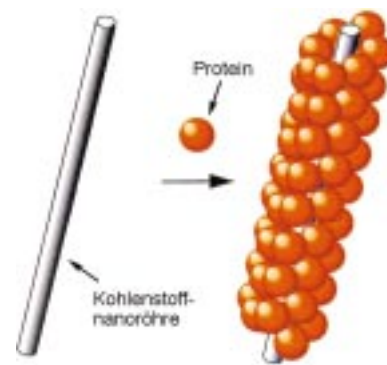


Abbildung 1. Schematische Darstellung der helicalen Kristallisation von Proteinen auf der äußeren Oberfläche einer Kohlenstoffnanoröhre.

coaxialen Graphitschichten bestehen. Der Röhrendurchmesser weist eine breite Verteilung auf, die von 2 bis 30 nm reicht. Ein solches polydisperses Material könnte die Wahrscheinlichkeit der Kristallisation erhöhen, da die helicale Selbstorganisation des Proteins auf derjenigen Nanoröhre stattfinden kann, die den hierfür passenden Durchmesser hat.

Um die Wechselwirkung von Proteinen mit Kohlenstoffnanoröhren zu untersuchen, wurde Streptavidin gewählt, ein wasserlösliches Protein, das von *Streptomyces avidinii* synthetisiert wird.^[6] Wegen seiner hohen Affinität für (+)-Biotin ($K_a \approx 10^{15}$) ist Streptavidin ein nützliches Werkzeug für viele biochemische Anwendungen geworden, z.B. für Markierungsexperimente und die Affinitätschromatographie.^[7] Bei der Inkubation von Streptavidin mit MWNTs wurde eine starke Wechselwirkung der Proteinmoleküle mit den Kohlenstoffröhren festgestellt. Unter geeigneten Bedingungen waren die Röhren fast vollständig von Streptavidin bedeckt, und nur wenige freie Moleküle waren vor dem Hintergrund des Trägerdrahtnetzes im Elektronenmikroskop sichtbar. Diese Beobachtung war nicht überraschend, da Streptavidin an hydrophoben Harzen wie Benzyl-DC-Cellulose gereinigt werden kann,^[8] auf unspezifischen hydrophoben Lipidfilmen zweidimensionale (2D) Kristalle bilden kann^[9] und stark an kohlenstoffbeschichtete Trägerdrahtnetze für die Elektronenmikroskopie bindet. Diese Eigenschaften spiegeln wahrscheinlich die Tatsache wider, daß das Streptavidinmolekül hydrophobe Domänen enthält. Während die meisten Streptavidinmoleküle stochastisch an die Nanoröhren banden und keine geordneten Verbände bildeten (Abbildung 2a), wurde in einigen Fällen beobachtet, daß die Nanoröhren ein laterales Streifenmuster mit gleichmäßigen Abständen von 6.4 nm in einem Winkel von 71° zur Röhrenachse aufwiesen (Abbildung 2b). Ein senkrecht Streifenmuster war ebenfalls sichtbar, was vermuten ließ, daß die Streptavidinmoleküle in einem rechtwinkligen Gitter organisiert waren.

Die helicale Anordnung der Streptavidinmoleküle an der Nanoröhrenoberfläche wurde durch das Muster der optischen Diffraktion bewiesen, das eine charakteristische Schichtverteilung aufwies (Abbildung 3a). Die direkte Ansicht der Bilder und die Analyse des Musters der optischen Beugung, die einen Schichtabstand von $1/12.8 \text{ nm}^{-1}$ ergab, zeigte an, daß die helicale Wiederholungseinheit aus zwei Streifen bestand. Dieser Abstand zwischen zwei Schichten ist in guter Übereinstimmung mit der Größe der Streptavidinmoleküle, wie sie

[*] Dr. C. Mioskowski, Dr. F. Balavoine, C. Richard
CEA Saclay-DSV/DBCM/SMM

F-91191 Gif sur Yvette cedex (Frankreich)

Fax: (+33) 1-69-08-79-91

E-mail: mioskow@aspirine.u-strasbg.fr

Dr. P. Schultz, V. Mallouh

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
1 rue Laurent Fries, BP 163, F-67404 Illkirch cedex (Frankreich)

Dr. T. W. Ebbesen

ISIS, Université Louis Pasteur

4 rue B. Pascal, F-67000 Strasbourg (Frankreich)

und

NEC Research Institute

4 Independence Way, Princeton, NJ 08540 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde vom Commissariat à l'Energie Atomique, vom Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, vom Centre National de la Recherche Scientifique, vom Centre Hospitalier Universitaire Régional und vom NEC Research Institute gefördert. Wir danken Dr. Paulette Vignais für eine Probe reinen HupR-Proteins.

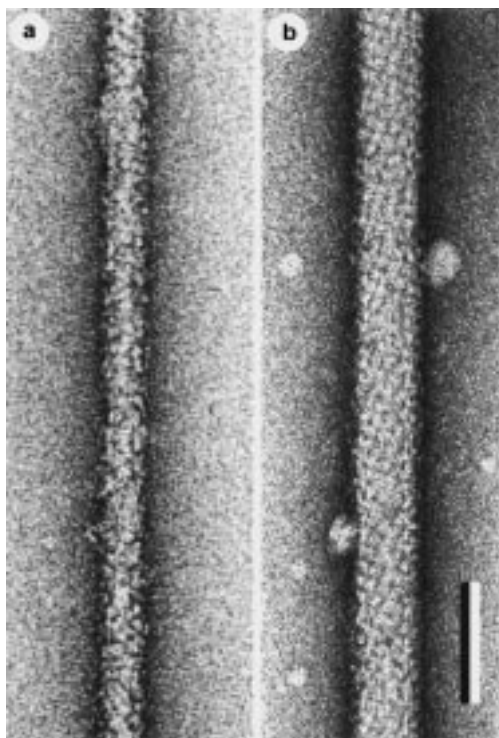


Abbildung 2. Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahme, die mehrwandige Nanoröhren zeigt, die mit Streptavidinmolekülen beschichtet sind und mit Uranylacetat negativ anfärbt wurden. a) Stochastische Bindung von Streptavidinmolekülen auf einem MWNT mit einem Durchmesser, der kleiner als 15 nm ist. b) Helicale Organisation von Streptavidinmolekülen auf einer Kohlenstoffnanoröhre mit einem geeigneten Durchmesser von 16 nm. Die Länge des Balkens entspricht 50 nm.

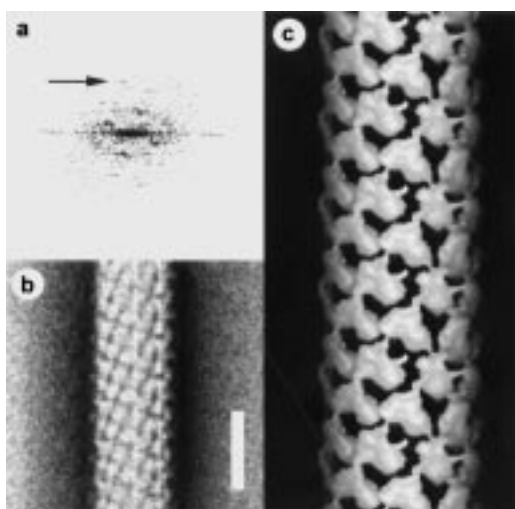


Abbildung 3. Analyse der Streptavidinhelices, die sich auf MWNTs gebildet haben. a) Computerberechnetes Powerspektrum der Fourier-Transformierten einer helicalen Anordnung von Streptavidinmolekülen. Die helicale Wiederholungslänge beträgt 12,8 nm, die Pfeilmarkierung befindet sich bei $1/2,5 \text{ nm}^{-1}$. b) Rauschfreie Ansicht der helicalen Wiederholungseinheiten, die durch Korrelation erhalten wurde. c) Dreidimensionales Modell von Streptavidinanordnungen, die durch Rückprojektion der rauschfreien Wiederholungseinheiten aus Abbildung b entlang der Euler-Winkel, die aus der Analyse des Beugungsmusters abgeleitet wurden, berechnet wurde. Die Länge des Balkens entspricht 25 nm in Abbildung b und 12,5 nm in Abbildung c.

durch eine Röntgenstrukturanalyse ermittelt wurde.^[10] Eine rauschfreie Sicht der helicalen Wiederholungseinheit wurde erhalten, indem ein gemittelttes Bild der mit Streptavidin beschichteten Nanoröhre erstellt wurde, das aus 25 Teilbildern bestand. Die Teilbilder wurden in regelmäßigen Abständen gemacht, die der Entfernung zwischen zwei helicalen Wiederholungseinheiten in der Aufnahme einer 300 nm langen Nanoröhre entsprachen (Abbildung 3b). Die Indizierung der Fourier-Transformierten zeigte, daß die Ordnung der Bessel-Funktionen ein Vielfaches von zwei war, was auf eine helicale Organisation mit zwei Anfangspunkten und den Aufbau jeder der beiden Helices aus acht Streptavidinmolekülen pro Windung hindeutete. Das Beugungsmuster lieferte Informationen über die Struktur bis zu einer Auflösung von $1/2,5 \text{ nm}^{-1}$ bei der fünften Schicht (Pfeil in Abbildung 3a). Die Beobachtung einer großen Zahl von Röhren mit Streifenmustern zeigte an, daß der äußere Durchmesser der Struktur konstant bei $27 \pm 2 \text{ nm}$ lag, was zeigte, daß die Größe der Röhren ein wichtiger Parameter für eine helicale Organisation war. Der Durchmesser der darunterliegenden Kohlenstoffnanoröhre, der in Einzelfällen bestimmt werden konnte, betrug ungefähr 16–17 nm, was darauf hinwies, daß die Proteinschicht eine Dicke von 5 nm hatte. Diese Dicke stimmt mit der Größe der Streptavidinmoleküle überein und verdeutlicht, daß eine einzige Proteinschicht die Nanoröhre bedeckt. Wir haben außerdem festgestellt, daß alle untersuchten kristallinen Anordnungen dieselbe Chiralität und die gleiche helicale Wiederholungseinheit aufwiesen.

Die helicalen Parameter, die durch die Analyse des Musters der optischen Beugung bestimmt worden waren, wurden verwendet, um ein dreidimensionales (3D) Modell der Anordnungen über eine Rückprojektion zu rekonstruieren (Abbildung 3c). Die Struktur läßt erkennen, daß die Orientierung und die Molekülkontakte denen ähnlich sind, die in 2D-Kristallen mit C_{222} -Symmetrie gefunden wurden.^[11] Die Streptavidin-beschichteten Nanoröhren sollten demzufolge an Biotin binden, da für 2D-Kristalle gezeigt wurde, daß zwei Biotinbindungsstellen zur wäßrigen Phase weisen und für die Wechselwirkung mit biotinylierten Molekülen zugänglich sind. Es wurde bereits nachgewiesen, daß Streptavidinkristalle, die sich auf biotinylierten Lipidmonoschichten^[11] oder -röhren^[12] gebildet hatten, mit polybiotinylierten Molekülen von Ferritin aus Pferd milz oder mit biotinylierten Fab-Fragmenten beschichtet werden können. Auf diese Weise können Kohlenstoffnanoröhren, die mit Streptavidinmolekülen beschichtet sind, als bioreaktive Dockingmatrix verwendet werden. Diese Ergebnisse lassen Kohlenstoffnanoröhren mit neuen und vielseitigen Anwendungen in der Biotechnologie erwarten, da mittlerweile viele biotinylierte Komponenten wie Proteine oder DNA-Fragmente zur Verfügung stehen.

Die Bindung von Streptavidin an Kohlenstoffnanoröhren war über einen weiten Bereich von Bedingungen effizient, wobei Temperatur, Inkubationszeit, pH-Wert und Ionenstärke variiert wurden. Jedoch war die Bildung von hochgeordneten helicalen Anordnungen in einer Qualität, die für Strukturuntersuchungen geeignet ist, nur schwer reproduzierbar. Die besten Resultate wurden mit einem Puffer erhalten, der 20 % Methanol enthält, und wir stellen die Hypothese auf, daß Methanol die Stärke der hydrophoben Wechselwirkung

gen verringert, die an der Bindung des Proteins auf die Kohlenstoffnanoröhren beteiligt sind, und auf diese Weise die Protein-Protein-Wechselwirkungen begünstigt, die zu helicalen Anordnungen führen.

Um das Potential der Kohlenstoffnanoröhren für die Strukturbio- und Biotechnologie weiter aufzuzeigen, haben wir auch die Wechselwirkungen und Kristallisation von HupR untersucht, einem anderen wasserlöslichen Protein. Das DNA-Bindungsprotein HupR des Photosynthese-Bakteriums *Rhodobacter capsulatus* ist an der zellulären Antwort auf Wasserstoff beteiligt und gehört zur Unterfamilie der stickstoffregulierenden Proteine (NtrC).^[13] Wir fanden, daß HupR wie Streptavidin stark mit der Kohlenstoffoberfläche von MWNTs wechselwirkt, und einige Nanoröhren wiesen Streifen auf, die einen Winkel von ca. 81° mit der Röhrenachse bildeten. Die helicale Organisation von HupR war besser reproduzierbar als die von Streptavidin und fand vor allem auch ohne Methanolzusatz statt. Wir stellten fest, daß HupR geordnete Anordnungen auf MWNTs bildete, deren Durchmesser über einen größeren Bereich variierte als bei Streptavidin; der Mindestdurchmesser betrug allerdings 12 nm (Abbildung 4). Das Muster der optischen Beugung

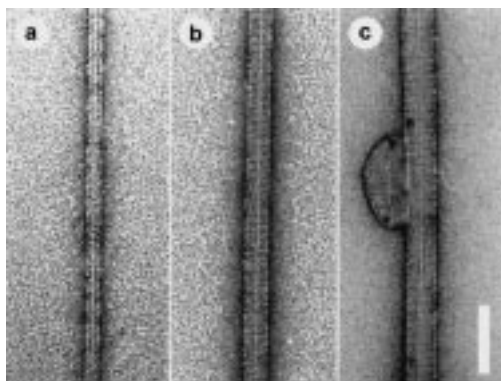


Abbildung 4. EM-Aufnahme von MWNTs, die mit dem HupR-Protein inkubiert und mit Uranylacetat negativ angefärbt wurden. a) Stochastische Bindung von HupR-Proteinmolekülen auf einem MWNT, dessen Durchmesser von 8 nm zu klein ist, um eine helicale Anordnung zu ermöglichen. b und c) Helicale Organisation von HupR-Proteinmolekülen auf Kohlenstoffnanoröhren mit einem Durchmesser von 13 bzw. 18 nm. Die Ausbuchtung auf dem MWNT, die in Abbildung c sichtbar ist, stammt von der Verunreinigung mit amorphen Kohlenstoffpartikeln, die auf der Röhre haften. Die Länge des Balkens entspricht 50 nm.

zeigte einen Schichtabstand von $1/5.4 \text{ nm}^{-1}$ und ließ Strukturdetails bis zu einer Auflösung von $1/2.7 \text{ nm}^{-1}$ erkennen (Abbildung 5a). Der Abstand zwischen den Schichten ist in guter Übereinstimmung mit der Größe der HupR-Moleküle, die durch Elektronenmikroskopie von 2D-Kristallen bestimmt wurde (Abbildung 5).^[14]

Obwohl man bis jetzt noch wenig über die Wechselwirkungen und Selbstorganisation von Proteinen mit bzw. auf den Kohlenstoffröhren weiß, haben wir die Möglichkeit gezeigt, lösliche Proteine auf der Oberfläche von mehrschichtigen Kohlenstoffnanoröhren zu organisieren, die als neue Träger für die Proteinkristallisation geeignet sind und mit Elektronenmikroskopie strukturell untersucht werden können. Tatsächlich ist die Analyse von selbstorganisierten Proteinanord-

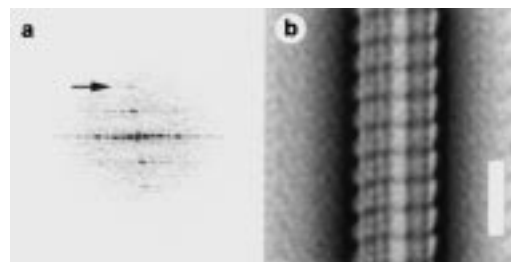


Abbildung 5. Analyse der Helices, die vom HupR-Protein auf MWNTs gebildet werden. a) Computerberechnetes Powerspektrum der Fourier-Transformierten einer helicalen kristallinen Anordnung. Der Abstand zwischen den Wiederholungseinheiten beträgt 5.4 nm, die Pfeilmarkierung zeigt die zweite Schicht bei $1/2.7 \text{ nm}^{-1}$ an. b) Rauschfreie Ansicht der helicalen Anordnung, die durch Korrelation aus dem Durchschnitt von 40 Wiederholungseinheiten erhalten wurde. Die Länge des Balkens entspricht 15 nm.

nungen mit Elektronenmikroskopie und elektronischer Bildverarbeitung eine sehr wirksame Methode für einen solchen Zweck, weil ein periodisches Signal leicht vom Rauschen abgegrenzt werden kann. Die natürliche Neigung von Membranproteinen, zweidimensionale Kristalle zu bilden, ermöglichte die Bestimmung ihrer Struktur mit Elektronenkristallographie bei nahezu atomarer Auflösung. Um dieses Konzept auf lösliche Proteine auszuweiten, wurden funktionalisierte Lipidmoleküle für die 2D-Kristallisation verschiedener Systeme entworfen.^[15] Ein Hauptnachteil der Strukturbestimmung von 2D-Kristallen ist jedoch die begrenzte Möglichkeit, die Proben zu verkippen, was notwendig ist, um die dritte Dimension erfassen zu können.^[16] In dieser Hinsicht sind supramolekulare Proteinanordnungen mit helicaler Symmetrie von besonderem Interesse, da mehrere Molekülorientierungen mit einem einzigen Bild aufgenommen werden können^[17] und so direkt Informationen über die dreidimensionale Struktur erhalten werden, ohne die Proben verkippen zu müssen. Mehrere biologische Makromoleküle wie Viren^[18] und Membranproteine^[19] oder filamentöse Komponenten des Cytoskeletts wie Mikrotubuli^[20] weisen eine helicale Symmetrie auf, die für elektronenmikroskopische Untersuchungen geeignet sind. Natürlich vorkommende, helicale Anordnungen biologischer Makromoleküle haben jedoch einen oder mehrere der folgenden Nachteile, die ihre allgemeine Verwendbarkeit oder die erreichbare Auflösung begrenzen: Sie können eine begrenzte Zahl kohärent geordneter Wiederholungseinheiten enthalten, sie können bei der Probenherstellung abflachen, oder ihre Bildung könnte nur unter sehr spezifischen Bedingungen erfolgen. Es ist deshalb von Interesse, die Bildung perfekt ausgerichteter helicaler Anordnungen ausreichender Größe für viele verschiedene Proteine kontrollieren zu können.

Es wurde für Lipidanordnungen nachgewiesen, daß sie bei Hydratation röhrenförmige Strukturen bilden und die helicale Kristallisation von Proteinen induzieren.^[12] Mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren erscheinen jetzt als allgemein einsetzbare und vielversprechende alternative Träger für die helicale Kristallisation von biologischen Makromolekülen. Kohlenstoffnanoröhren können in großen Mengen hergestellt werden und verfügen über Eigenschaften wie Geradlinigkeit, Starrheit und Leitfähigkeit, die Lipidröhren nicht aufweisen.

Wir erwarten, daß diese Träger in einem geringeren Maß abflachen und die erreichbare Auflösung verbessern, wenn sie unter geeigneten Fixierbedingungen untersucht werden, z. B. im gefrorenen hydratisierten Zustand.

Die Verwendung von proteinbeschichteten Nanoröhren sollte weit über die erwähnten Anwendungen in der Strukturbiologie hinausreichen. Wahrscheinlich können Kohlenstoffnanoröhren industriell produziert werden, und Fortschritte in verwandten Gebieten werden bald die Manipulation dieser Nanostrukturen ermöglichen. Ein Schritt in diese Richtung wurde vor kurzem durch die Verwendung von Kohlenstoffnanoröhren als Probenspitzen für Rasterkraftmikroskope bezeugt.^[21] Unsere Experimente zeigen, daß es möglich ist, die Nanoröhren zu funktionalisieren, um ihre Erkennungseigenschaften zu verändern. Neue Anwendungen solcher Nanomaterialien scheinen nun auf dem wachsenden Gebiet der Nanobiotechnologie möglich.

Experimentelles

Mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren wurden mit der Bogenentladungsmethode^[2] hergestellt und in Form einer Suspension in Methanol aufbewahrt (2 mg mL⁻¹). Für die Inkubation mit Streptavidin wurden 100 µL einer MWNT-Suspension in einem Ethangasstrom getrocknet und in 20 µL einer 40proz. wäßrigen Lösung von Ethanol resuspendiert. Die Lösung wurde in ein Ultraschallbad gestellt, um die MWNTs zu dispergieren, bevor 20 µL einer Streptavidinlösung (10 µg mL⁻¹ in einem Puffer aus 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), pH 8, und 50 mM NaCl) zugegeben wurden. Die Mischung wurde 45 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Das HupR-Protein wurde in einem Puffer aus 10 mM Tris, pH 8, und 350 mM NaCl aufbewahrt. Für die Untersuchung seiner Wechselwirkung mit MWNTs wurde das gleiche Verfahren angewandt mit der Ausnahme, daß die Nanoröhren in reinem Wasser ohne Methanol resuspendiert wurden, bevor das Protein zugegeben wurde. 5 µL dieser Präparationen wurden auf einen 10 nm dicken Kohlenstofffilm gegeben, der zuvor mit einer Glimmentladung in Luft behandelt wurde. Nach einer Absorptionszeit von 2 min wurde das Trägerdrahtnetz mit einer 2proz. Uranylacetatlösung negativ angefärbt.

Die Bilder wurden bei 45000facher Vergrößerung mit einem Transmissionselektronenmikroskop (CM120, Philips) aufgenommen, das bei einer Spannung von 100 kV arbeitet. Dreifach vergrößerte Ausdrucke der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Scanner (Umax Powerlook II) bei einer Auflösung von 375 µm digitalisiert, was einer auf die Probe bezogenen Auflösung von 5 Å entspricht. Die Bilder wurden mit dem IMAGIC-Softwarepaket bearbeitet, um die Fourier-Transformierten sowie die Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen zu berechnen, um gemittelte Bilder der helicalen Wiederholungseinheit herzustellen und um mit einem gewichteten Rückprojektionsalgorithmus ein dreidimensionales Modell zu rekonstruieren.

Eingegangen am 30. Dezember 1998 [Z12857]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1912–1915

Stichwörter: Elektronenmikroskopie • Helicale Strukturen • Nanoröhren • Proteine • Selbstorganisation

[1] S. Iijima, *Nature* **1991**, 354, 56–58.

[2] T. W. Ebbesen in *Carbon Nanotubes – Preparation and Properties* (Hrsg.: T. W. Ebbesen), CRC Press, Boca Raton, FL, **1997**.

[3] J. J. Davis, M. L. H. Green, O. A. H. Hill, Y. C. Leung, P. J. Sadler, J. Sloan, A. V. Xavier, S. C. Tsang, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, 272, 261–266.

[4] a) S. S. Tsang, Z. Guo, Y. K. Chen, M. L. H. Green, H. A. O. Hill, T. W. Hambley, P. J. Sadler, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2291–2294;

Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1997**, 36, 2198–2200; b) Z. Guo, P. J. Sadler, S. C. Tsang, *Adv. Mater.* **1998**, 10, 701–703.

[5] M. M. J. Treacy, T. W. Ebbesen, J. M. Gibson, *Nature* **1996**, 381, 678–680.

[6] L. Chaiet, F. J. Wolf, *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, 106, 1–5.

[7] E. A. Bayer, H. Ben-Hur, M. Wilchek, *Methods Enzymol.* **1990**, 184, 80–89.

[8] W. D. Schwidop, P. Klossek, R. Muller, R. Claus, *J. Chromatogr.* **1990**, 520, 325–331.

[9] T. Furuno, H. Sasabe, *Biophysical J.* **1993**, 65, 1714–1717.

[10] W. A. Hendrickson, A. Pähler, J. L. Smith, Y. Satow, E. A. Merritt, R. P. Phizacker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 2190–2194.

[11] S. A. Darst, M. Ahlers, P. H. Meller, E. W. Kubalek, R. Blankenburg, H. O. Ribi, H. Ringsdorf, R. D. Kornberg, *Biophysical J.* **1991**, 59, 387–396.

[12] a) P. Ringle, W. Müller, H. Ringsdorf, A. Brissin, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 620–625; b) E. M. Wilson-Kubalek, R. E. Brown, H. Célia, R. A. Milligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 8040–8045.

[13] P. Richaud, A. Colbeau, B. Toussaint, P. M. Vignais, *J. Bacteriol.* **1991**, 173, 5928–5932.

[14] C. Vénien-Bryan, F. Balavoine, B. Toussaint, C. Mioskowski, E. A. Hewat, B. Helme, P. M. Vignais, *J. Mol. Biol.* **1997**, 274, 687–692.

[15] L. Lebeau, P. Schultz, H. Célia, P. Mésini, S. Nuss, C. Klinger, S. Olland, P. Oudet, C. Mioskowski in *Handbook of nonmedical applications of liposomes*, Vol. II, (Hrsg.: Y. Barenholz, D. D. Lasic), CRC Press, Boca Raton, FL, **1996**, S. 155–188.

[16] L. A. Amos, R. Henderson, P. N. T. Unwin, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1982**, 39, 183–231.

[17] D. J. DeRosier, P. B. Moore, *J. Mol. Biol.* **1970**, 52, 355–369.

[18] T. W. Jeng, R. A. Crowther, G. Stubbs, W. Chiu, *J. Mol. Biol.* **1989**, 205, 251–257.

[19] N. Unwin, *J. Mol. Biol.* **1993**, 229, 1101–1124.

[20] A. Hoenger, E. P. Sablin, R. D. Vale, R. J. Fletterick, R. A. Milligan, *Nature* **1995**, 376, 271–274.

[21] a) H. Dai, J. H. Hafner, A. G. Rinzler, D. T. Colbert, R. E. Smalley, *Nature* **1996**, 384, 147–150; b) S. S. Wong, E. Joselevich, A. T. Wooley, C. L. Cheung, C. M. Lieber, *Nature* **1998**, 394, 52–55.

[22] M. Van Heel, W. Keegstra, *Ultramicroscopy* **1981**, 7, 113–130.

Dendritisch quervernetzende chirale Liganden – hohe Standfestigkeit eines polystyrolgebundenen Ti-TADDOLat-Katalysators unter Diffusionskontrolle**

Holger Sellner und Dieter Seebach*

Polymergebundene Reagentien und Katalysatoren^[1] haben durch die kombinatorische Synthese^[2] wieder an Bedeutung gewonnen. Neben dem klassischen Vorgehen des Anheftens einer funktionellen Gruppe oder eines Liganden an ein Polymer, z. B. das Merrifield-Harz, findet man neuerdings auch Beispiele für das Einbetten der interessierenden Gruppe

[*] Prof. Dr. D. Seebach, Dipl.-Chem. H. Sellner
Laboratorium für Organische Chemie der Eidgenössischen
Technischen Hochschule Zürich
ETH-Zentrum, Universitätstrasse 16, CH-8092 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41)1-632-11-44
E-mail: seebach@org.chem.ethz.ch

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekte Nr. 20-50674.97 und 2027-048157) unterstützt.