

Die Grafik zeigt die Bildung supramolekularer DNA-Nanoringe (siehe Kraftmikroskopieaufnahme in der Mitte rechts) aus oligomeren Konjugaten (Mitte links). Potentielle Anwendungen in den Life Sciences werden durch die Mikrotiterplatte (oben) symbolisiert, der Bezug zur Nanotechnologie durch das Modell unten im Bild. (<http://www.imm.org/Parts/Parts3.html>; Copyright© www.imm.org).

Mehr dazu auf den folgenden Seiten.

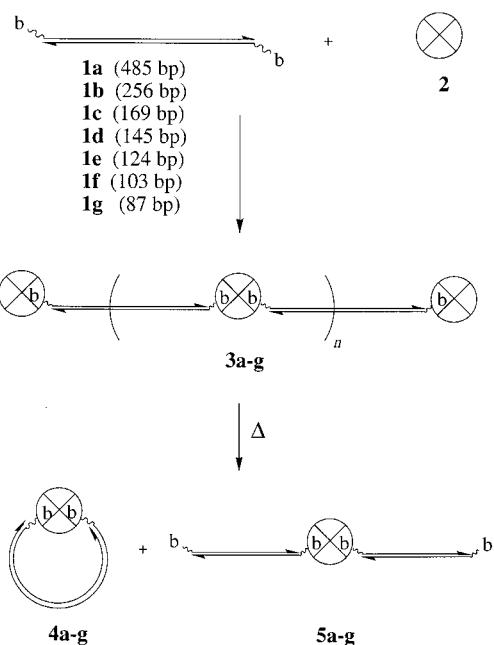
Supramolekulare Nanoringe aus Streptavidin und DNA**

Christof M. Niemeyer,* Michael Adler, Song Gao und Lifeng Chi

Die molekulare Nanotechnologie beschäftigt sich mit dem Aufbau von Struktur- und Funktionselementen aus kleinen programmierten Molekülbausteinen, die sich durch Selbstorganisation zu größeren Einheiten zusammenfügen.^[1] Aufgrund einzigartig spezifischer und nach einfachen Regeln vorhersagbarer Rezeptoreigenschaften, hoher physikalisch-chemischer Robustheit, mechanischer Starrheit und atom-genauer Prozessierbarkeit ist DNA ein vielversprechender Werkstoff zum Aufbau nanodimensionierter Systeme.^[2, 3] So zeigen die Arbeiten von Seeman et al., dass aus DNA nanostrukturierte Gerüstmoleküle,^[2b,c] Oberflächenarchitekturen,^[2d,e] sowie mechanische Funktionseinheiten^[2f] aufgebaut werden können. Darüber hinaus lässt sich die hochspezifische Hybridisierung komplementärer Nucleinsäuren nutzen, um Makromoleküle wie Proteine^[4] oder Nanocluster^[4b, 5] selektiv zu positionieren.

Wir haben kürzlich über nanostrukturierte, oligomere Konjugate **3** berichtet, die durch Selbstorganisation aus bisbiotinylierter DNA **1** und dem Biotin-Bindungsprotein Streptavidin (STV) **2** aufgebaut werden.^[6] Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass in den Oligomeren **3** das Streptavidin trotz seiner Bindungskapazität für vier Moleküle Biotin hauptsächlich als zwei- und dreiwertiges Bindeglied zwischen den Doppelstrang-DNA(dsDNA)-Fragmenten fungiert, sodass dominierend lineare und zweidimensional verzweigte Molekülketten vorliegen (Schema 1). Wegen ihrer verbleibenden Biotin-Bindungskapazität lassen sich die DNA-STV-Oligomere **3** als leistungsstarke Reagentien in der Immuno-PCR^[7] verwenden, einer hochsensitiven Spurenanalyse für Proteine und andere Antigene. Wir berichten hier über die Synthese neuartiger supramolekularer DNA-Nanoringe **4**, die durch thermische Behandlung aus den Oligomeren **3** zugänglich sind.

Im Zuge unserer Untersuchungen der supramolekularen DNA-STV-Oligomere **3** wollten wir deren Denaturierungsverhalten testen. Hierzu wurden zunächst Oligomere hergestellt, indem STV **2** mit verschiedenen Moläquivalenten eines 256 Basenpaar (bp) langen dsDNA-Fragments **1b** gekuppelt wurde. Im Falle eines molaren Überschusses an STV erscheint das typische Fingerprint-Bandenmuster der supramolekularen Oligomere **3b**, bei einem Überschuss an DNA treten



Schema 1. Synthese supramolekularer DNA-Streptavidin Nanoringe **4**. Ausgehend von 5',5'-bisbiotinylierter Doppelstrang-DNA (dsDNA) unterschiedlicher Länge, **1a–g**, und Streptavidin (STV) **2** werden oligomere DNA-STV-Konjugate **3a–g** hergestellt. Die schematische Darstellung von **3** ist vereinfacht, da durch drei- und vierfach-konjugiertes STV Verzweigungspunkte auftreten (siehe Abbildung 2 d). Die oligomeren Konjugate **3** werden 2 min auf 95 °C erhitzt und anschließend im Eisbad rasch abgekühlt, sodass sich als Hauptprodukte die supramolekularen DNA-Nanoringe **4a–g** und die linearen DNA₂-STV-Konjugate **5a–g** bilden. Zur Vereinfachung sind komplementäre DNA-Strände als parallele Linien dargestellt, deren 3'-Enden durch Pfeilspitzen markiert sind. Es ist unklar, ob die beiden an STV gebundenen DNA-Fragmente an benachbarten oder gegenüberliegenden Untereinheiten gebunden sind. Letzteres sollte jedoch nach dem Modell von Sinha und Chignell zu stabileren Komplexen führen.^[19]

dagene die charakteristische, verschmierte Bande für hochmolekulare Oligomere sowie Banden für freie dsDNA- und DNA-STV-Konjugate unterschiedlicher Stöchiometrie, z.B. DNA₂-STV, auf^[6] (Abbildung 1, Spuren 1–4). Die unterschiedlichen Präparationen von **3b** wurden anschließend durch zweiminütiges Erhitzen auf 95 °C denaturiert und dann rasch im Eisbad abgeschreckt. Durch diese Behandlung vereinfacht sich das Bandenmuster erheblich, wobei die gebildeten Produkte je nach anfänglicher Kupplungsstöchiometrie in unterschiedlichen Mengenverhältnissen anfallen (Abbildung 1, Spuren 5–8). Bei den Hauptprodukten handelt es sich um das Konjugat **5b** der Stöchiometrie dsDNA₂-STV (Position d in Abbildung 1) und den Nanoring **4b** (Position b).^[8] Ferner zeigt der Vergleich von Spur 4 und 8, dass lediglich im Falle eines dsDNA-Überschusses freies **1b** gebildet wird (Position a). Die densitometrische Quantifizierung der Bandenintensitäten ergab, dass die Bildung von **4b** in 60 % Ausbeute am effizientesten verläuft, wenn das anfängliche Verhältnis der Kupplungspartner DNA:STV 1:2 beträgt.

Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Produktbildung eine starke Konzentrationsabhängigkeit aufweist. So sinkt bereits bei einer Verdoppelung der Konzentration an **3** von ca. 0.2 μM auf 0.4 μM der relative Anteil an gebildetem **4** auf ca. 45 %. Bei einer Denaturierungskon-

[*] Dr. C. M. Niemeyer, Dipl.-Chem. M. Adler
Universität Bremen, FB2-UFT
Biotechnologie und Molekulare Genetik
Leobener Straße, 28359 Bremen (Deutschland)
Fax: (+49) 421-218-7578
E-mail: cmn@biotec.uni-bremen.de
Dipl.-Phys. S. Gao, Priv.-Doz. Dr. L. Chi
Physikalisches Institut der Universität Münster
Wilhelm-Klemm-Straße 10, 48149 Münster (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SPP 1072), vom Fonds der Chemischen Industrie und von der Tönjes-Vagt-Stiftung gefördert. Wir danken Prof. D. Blohm und Prof. H. Fuchs für großzügige Unterstützung.

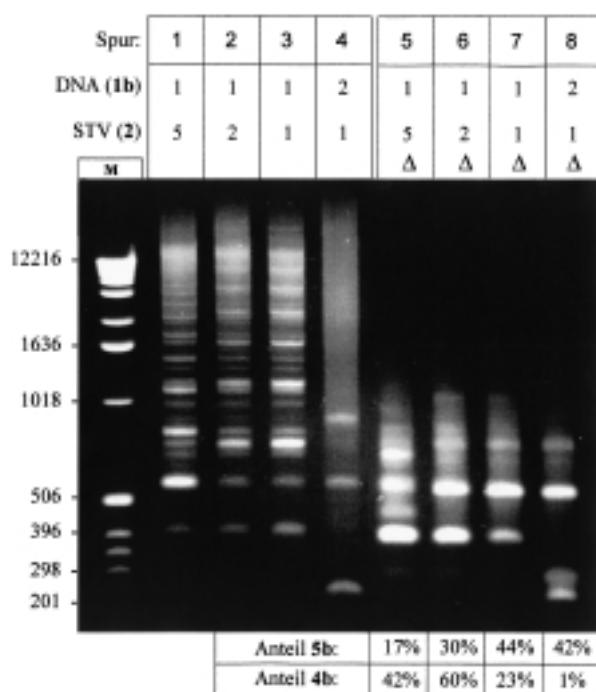


Abbildung 1. Elektrophoretische Untersuchung zur Synthese der Nanoringe **4b**. Gezeigt ist ein nichtdenaturierendes 1.5% Agarose-Gel nach Anfärbung mit Ethidiumbromid. In den Spuren 1–4 sind oligomere DNA-STV-Konjugate **3b** aufgetragen, die aus unterschiedlichen Kupplungsstöchiometrien von STV und dsDNA **1b** hergestellt wurden. Die Denaturierung und rasche Abkühlung überführt die unterschiedlichen Präparationen **3b** in niedermolekulare Produkte, wobei als Hauptprodukte das Konjugat DNA₂-STV **5b** und der Nanoring **4b** anfallen (Spur 5–8). Die Abhängigkeit der Produktbildung von der anfänglichen Kupplungsstöchiometrie DNA:STV wird durch die prozentualen Angaben unter den Spuren 5–8 deutlich, die durch densitometrische Analyse der Bandenintensitäten bestimmt wurden; Spur M enthält einen DNA-Molekulargewichtsmarker, die Längen sind in Basenpaaren angegeben.

zentration von 1 μM werden die Nanocyclen nur noch zu ca. 20% gebildet, und es entstehen zunehmend hochmolekulare Oligomere. Auch die Abkühlgeschwindigkeit nach der thermischen Denaturierung von **3** beeinflusst die Effizienz der Nanoringbildung. Wird beispielsweise mit einer niedrigen Abkühlgeschwindigkeit von 0.5° min⁻¹ renaturiert, bilden sich bevorzugt höhermolekulare, oligomere DNA-STV-Produkte, und die Ausbeute an **4** sinkt auf etwa 35%. Eine quantitative Oligomerisierung kann durch langsame Abkühlung bei einer Konzentration von 1 μM erreicht werden. Wird dieses oligomere Netz, das als eine immobile Bande im Gel erscheint, einer erneuten Denaturierung mit anschließender rascher Renaturierung unterworfen, werden wiederum die Produkte

4 und **5** zurückgebildet. Diese Befunde zur Abhängigkeit der Produktverteilung von Temperatur und Konzentration sind im Einklang mit früheren Berichten zur Selbstaggregation oligovalenter Bausteine.^[9, 10]

Um das Phänomen der Cyclenbildung näher zu untersuchen, wurde die Länge des dsDNA-Fragments in **3** variiert, sodass bei der Denaturierung Nanoringe **4** unterschiedlicher Größe entstehen (**4a–g**). Die in Tabelle 1 aufgeführten, elektrophoretisch bestimmten Umsätze zeigen, dass die Effizienz der Bildung von **4** mit abnehmender dsDNA-Länge sinkt. Stattdessen werden zunehmend höhermolekulare Produkte und freie dsDNA gebildet. Dieses Ergebnis dürfte auf die größere Starrheit kürzerer dsDNA-Fragmente zurückzuführen sein, die einer intramolekularen Cyclisierung entgegenwirkt.^[11]

Zur Charakterisierung von **4** wurde die cyclische Struktur zunächst durch einen Ferguson-Plot^[12] abgesichert, in dem die elektrophoretische Mobilität linearer und cyclischer DNA-STV-Spezies in Abhängigkeit von der Dichte der Gelmatrix aufgetragen wird. Während der Plot der linearen Supramoleküle eine einheitliche Steigung für **5a–c** aufweist, nimmt die Steigung bei den Nanoringen **4a–c** mit zunehmender Länge der dsDNA zu. Hieraus lässt sich abschätzen, dass die Reibungskonstante der Nanoringe **4a** und **4b** größer ist als die der analogen linearen Spezies **5a** und **5b**, während **4c** eine geringere Reibungskonstante aufweist als **5c**.^[13] Ferner lässt sich aus dem Vergleich der Ferguson-Plots von z. B. **5b** und einem linearen 500-bp-dsDNA-Fragment schließen, dass die Kupplung des STV-Moleküls zu einer Verringerung der Reibungskonstante führt. Dies dürfte auf die im Vergleich zur starren DNA-Doppelhelix erhöhten

linearer und cyclischer DNA-STV-Spezies in Abhängigkeit von der Dichte der Gelmatrix aufgetragen wird. Während der Plot der linearen Supramoleküle eine einheitliche Steigung für **5a–c** aufweist, nimmt die Steigung bei den Nanoringen **4a–c** mit zunehmender Länge der dsDNA zu. Hieraus lässt sich abschätzen, dass die Reibungskonstante der Nanoringe **4a** und **4b** größer ist als die der analogen linearen Spezies **5a** und **5b**, während **4c** eine geringere Reibungskonstante aufweist als **5c**.^[13] Ferner lässt sich aus dem Vergleich der Ferguson-Plots von z. B. **5b** und einem linearen 500-bp-dsDNA-Fragment schließen, dass die Kupplung des STV-Moleküls zu einer Verringerung der Reibungskonstante führt. Dies dürfte auf die im Vergleich zur starren DNA-Doppelhelix erhöhten

Tabelle 1. Ausbeute und Abmessungen der Nanoringe **4a–g**.

Länge der dsDNA [bp]	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g
Anteil an 4 vor Denaturierung [%] ^[a]	30	10	10	4	2	< 1	< 1
Anteil an 4 nach Denaturierung [%] ^[a]	77	60	62	49	50	52	28
Anteil an 5 nach Denaturierung [%] ^[a]	20	30	25	12	13	11	17
Durchmesser von 4 [nm] ^[b]	61	29	22	17	15	15	—
Abweichung [%] ^[b]	21	14	9	6	4	2	—
berechneter Durchmesser [nm] ^[c]	54.6	29.9	20.4	17.8	15.5	13.2	11.5

[a] Bestimmt durch densitometrische Analyse der Bandenintensitäten; der durchschnittliche Fehler beträgt ca. ± 5%. [b] Bestimmt aus den Kraftmikroskopieaufnahmen; dazu wurden jeweils mehr als 50 Strukturen ausgemessen. Aufgelistet sind der arithmetische Mittelwert sowie die prozentuale Standardabweichung von diesem mittleren Ringdurchmesser. [c] Berechnet aus der Länge des dsDNA-Fragments unter der Annahme einer B-DNA-Konformation. Der Durchmesser von STV wurde mit 4.6 nm^[20] und die Länge der zwei Spacerketten zwischen DNA und STV mit 2 nm veranschlagt.

Beweglichkeit der beiden DNA-Moleküle um die zentrale STV-Einheit in **5** zurückzuführen sein.

Elektrophoretisch gereinigte Präparationen von **4** wurden mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht (Abbildung 2). Bis hin zum 103-bp-dsDNA-Ring **4f** konnte sowohl die

von freiem d-Biotin, dass eine Verdrängung der dsDNA-Liganden aus dem STV erfolgt. Dies legt nahe, dass die Bindung zwischen STV und der biotinylierten dsDNA bei höheren Temperaturen zunehmend labil wird, sodass auch Liganden-Austauschreaktionen zur Bildung von **4** beitragen könnten.^[15]

Wir haben hier über eine einfache und effiziente Synthese neuartiger, supramolekularer DNA-Nanoringe **4** berichtet, die durch thermische Denaturierung und rasches Abkühlen aus oligomeren DNA-STV-Netzen **3** zugänglich sind. Über den Aufbau von DNA-Ringen und deren mögliche Verwendung als Bausteine für nanostrukturierte Elemente wurde bereits berichtet.^[10, 16, 17] Diese Arbeit erweitert die bisherigen Ansätze, da das endogene STV-Molekül in den Nanoringen als Ankerpunkt für weitere Funktionalisierungen genutzt werden kann.^[4b, 18] Diesbezügliche Arbeiten zur Modifizierung und lateralen Anordnung der Nanoringe sind im Gange.

Experimentelles

Zu 24 µL einer 1.0 µM Lösung von STV in 10 mM Tris(hydroxymethyl)methylamin(Tris)-Puffer (pH 7.3) mit 2 mM Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) werden 6.8 µL einer 1.75 µM Lösung der bisbiotinylierten dsDNA **1c** im gleichen Puffer gegeben, sodass eine Endkonzentration von

0.39 pmol µL⁻¹ an dsDNA vorliegt. Die Lösung wird 15 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und dann mit Tris-Puffer auf eine Endkonzentration von 0.2 µM an DNA verdünnt. Das oligomere DNA-STV-Konjugat wird 2 min bei 95 °C denaturiert und im Anschluss im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Die Analyse und Aufreinigung der Produkte erfolgt durch native Gelelektrophorese in einem Agarose-Gel, wobei der Agarosegehalt je nach Länge des dsDNA-Fragments bei 1 (DNA > 400 bp), 1.5 (400–150 bp) oder 2.2% (150–80 bp) liegt. Nach Anfärbung des Gels mit Ethidiumbromid wird das Hauptprodukt ausgeschnitten und unter Verwendung einer Micropure-0.22-µm-Kartusche (Millipore) durch 10 min Zentrifugieren bei 5000 Umdrehungen pro Minute aus dem Gel eluiert. Die Immobilisierung von **4** auf Glimmer und die Untersuchung durch Kraftmikroskopie erfolgten wie zuvor beschrieben.^[6]

Eingegangen am 22. Dezember 1999 [Z 14450]

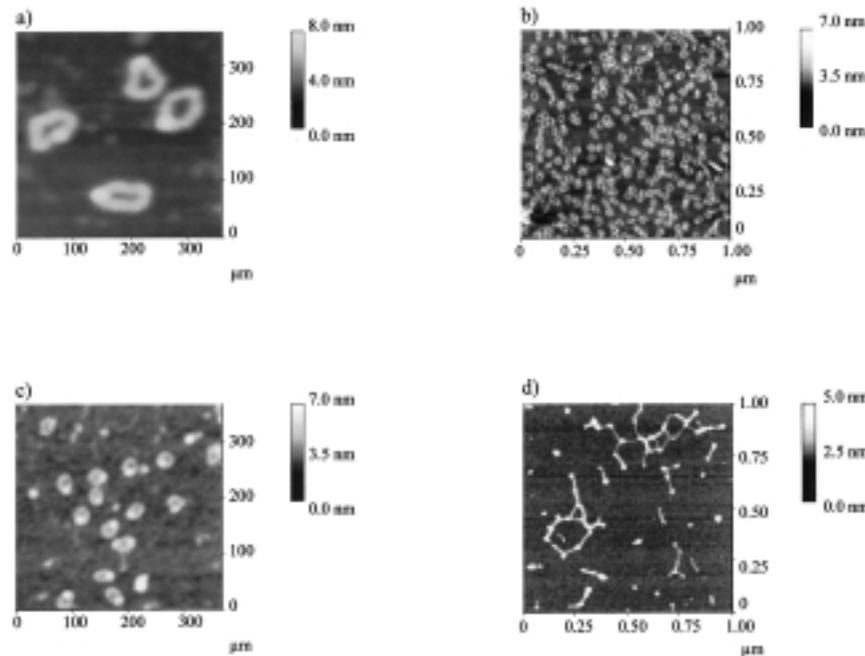


Abbildung 2. Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der DNA-Ringe **4a** (a), **4b** (b) und **4c** (c) und der oligomeren DNA-STV-Konjugate **3b** (d).

supramolekulare Ringstruktur als auch das äquimolare Kupplungsverhältnis von STV und dsDNA optisch eindeutig verifiziert werden. Eine statistische Auswertung der Kraftmikroskopieaufnahmen ergab, dass nach einmaliger Reinigung mehr als 90 % der abgebildeten Moleküle die charakteristische Ringstruktur aufweisen. Die kraftmikroskopisch bestimmten mittleren Ringdurchmesser korrelieren mit den erwarteten Werten, wobei die experimentell ermittelten Abweichungen vom Moleküldurchmesser mit abnehmender Ringgröße sinken (Tabelle 1). Dies dürfte die bei kürzeren dsDNA-Fragmenten höhere Ringspannung widerspiegeln, die bewirkt, dass beispielsweise **4c** eher einem idealen Ring entspricht als **4a** (Abbildung 2).

Über die Ursachen der von der anfänglichen Kupplungsstöchiometrie abhängigen Produktverteilung (Abbildung 1) und auch über den Bildungsmechanismus der Nanoringe lassen sich gegenwärtig nur Vermutungen anstellen. Da die Denaturierungsstemperatur von ligandgesättigtem STV bei 112 °C liegt,^[14] erscheint es plausibel, dass im Zuge der Denaturierung ein Quasi-Übergangszustand vorliegt, in dem STV mit zwei biotinylierten Einzelstrang-DNAs konjugiert ist, die bei Komplementarität intramolekular hybridisieren. Da statistisch jedoch 50 % der zweifach konjugierten STV-Moleküle im Übergangszustand zwei zueinander nichtkomplementäre Einzelstränge enthalten sollten, deutet die bis zu 77 % betragende Effizienz der Bildung von **4** darauf hin, dass auch andere Mechanismen an der Ringbildung beteiligt sein könnten. So ergaben Denaturierungsversuche in Gegenwart

- [1] a) G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seto, *Science* **1991**, 254, 1312; b) K. E. Drexler, *Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation*, Wiley, New York **1992**; 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] a) N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, 99, 237; b) Übersicht: N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3220; c) X. Yang, L. A. Wenzler, J. Qi, X. Li, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9779; d) E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, N. C. Seeman, *Nature* **1998**, 394, 539; e) F. Liu, R. Sha, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 917; f) C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, 397, 144.

- [3] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 603; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 585.

- [4] a) C. M. Niemeyer, T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 5530; b) C. M. Niemeyer, W. Bürger, J. Peplies, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2391; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2265.

- [5] a) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, 382, 607; b) 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; c) R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science* **1997**, 277, 1078; d) R. C. Mucic, J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12674; e) J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1959; f) C. J. Loweth, W. B. Caldwell, X. Peng, A. P. Alivisatos, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1925; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1808; g) G. P. Mitchell, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8122; h) J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 1849.
- [6] C. M. Niemeyer, M. Adler, B. Pignataro, S. Lenhert, S. Gao, L. F. Chi, H. Fuchs, D. Blohm, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 4553.
- [7] T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Science* **1992**, 258, 120.
- [8] Die Zugabe von Einzelstrang-Bindungsprotein (Promega) zum Produktgemisch des Denaturierungsansatzes und die anschließende elektrophoretische Analyse erbrachten den Nachweis, dass freie Einzelstrang-DNA und Konjugate aus STV und einem oder mehreren nichtkomplementären Einzelsträngen als Bestandteile des diffusen Hintergrunds wandern. Die Bildung einzelsträngiger Spezies ist auf die rasche Abkühlgeschwindigkeit zurückzuführen, die eine quantitative intermolekulare Rehybridisierung verhindert.
- [9] N. Yamaguchi, H. W. Gibson, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 195; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 143; N. Yamaguchi, D. S. Nagarkar, H. W. Gibson, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2518; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2361.
- [10] M. Scheffler, A. Dorenbeck, S. Jordan, M. Wüste, G. v. Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3514; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3312.
- [11] Circuläre dsDNA ist insbesondere bei Prokaryonten weit verbreitet (J. D. Watson, N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, A. M. Weiner *Molecular Biology of the Gene*, 4. Aufl., Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, **1987**). Die Größe dieser Plasmide beträgt typischerweise mehr als 1000 bp. Kurze circuläre dsDNA kann durch Ligations-Ringschluss-Reaktion erhalten werden, wobei die untere Ringgröße etwa 100 bp beträgt (L. Ulanovsky, M. Bodner, E. N. Trifonov, M. Choder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 862). Über die Synthese eines sehr kleinen Rings aus nur 42 bp wurde berichtet (M. Wolters, B. Wittig, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 5163). Aus Einzelstrang-DNA lassen sich hingegen beliebig kleine Ringe herstellen (Übersicht: E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 502).
- [12] D. Rodbard, A. Chrambach, *Anal. Biochem.* **1971**, 40, 95.
- [13] Kleine, kovalent geschlossene DNA-Ringe weisen eine größere elektrophoretische Mobilität auf als lineare DNA-Fragmente gleichen Molekulargewichts, während die Mobilität großer DNA-Cyclen geringer ist als die der linearen Analoga (S. Mickel, V. Arena, W. Bauer, *Nucleic Acids Res.* **1977**, 4, 1465). Dieses Phänomen bildet die Grundlage dafür, dass beispielsweise durch Proteinbindung induzierte DNA-Ringe durch Gel-Shift-Analyse identifiziert werden können (J. R. Cann, *J. Mol. Biol.* **1990**, 216, 1067).
- [14] M. González, L. A. Bagatolli, I. Echabe, J. L. R. Arondo, C. E. Argarana, C. R. Cantor, G. D. Fidelio, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 11288.
- [15] Temperaturabhängigen Untersuchungen zufolge beginnt die Verdrängung der biotinylierten DNA aus **3b** durch einen 800fachen Überschuss an D-Biotin beim 2 min Erhitzen ab ca. 70 °C und ist bei 80 °C zu etwa 50 % vorangeschritten. Die Denaturierungstemperatur der dsDNA **1b** liegt bei 71 ± 1 °C, und die Nanoringe **4b** werden ab 79 ± 2 °C bevorzugt gebildet.
- [16] J. Shi, D. E. Bergstrom, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 111; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 70.
- [17] H. Kuhn, V. V. Demidov, M. D. Frank-Kaminetskii, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1544; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1446.
- [18] Elektrophoretische Gel-Shift-Untersuchungen ergaben, dass sowohl niedermolekulare Biotin-Derivate, z.B. ein Biotin-Fluorescein-Konjugat, als auch Biotinyl-derivatisierte Proteine, beispielsweise Antikörper, an **4** binden.
- [19] B. K. Sinha, C. F. Chignell, *Methods Enzymol.* **1979**, 62, 295.
- [20] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science* **1989**, 243, 85.

Dynamische Untersuchungen der durch Phospholipase A₂ katalysierten Hydrolyse einer DPPC-Monoschicht an der Wasser-Luft-Grenzfläche**

Junbai Li,* Zhijian Chen, Xiaoli Wang,
Gerald Brezesinski und Helmuth Möhwald*

Viele chemische Reaktionen, besonders solche im kristallinen Zustand, hängen von der lokalen Umgebung der Reaktanten ab. Um ihre Mechanismen zu verstehen, müssen diese Reaktionen in Abhängigkeit von der lokalen Ordnung untersucht werden; dabei sollten auch Ordnungsänderungen im Verlauf der Reaktion verfolgt werden. Amphiphile Monoschichten sind für diese Zwecke bestens geeignet, da ihre Ordnung gezielt verändert und bestimmt werden kann. Die chemische Reaktion kann dabei mit neuen spektroskopischen und mikroskopischen Techniken verfolgt werden. Darüber hinaus können die Reaktanten mit der jeweils benachbarten Phase auf kontrolliertem Wege ausgetauscht werden.

Ein für die Biologie und technische Bereiche wichtiges System ist die Phospholipase A₂ (PLA₂), die die Hydrolyse einer Phospholipid-Monoschicht an einer Grenzfläche katalysiert. Es ist bekannt, dass diese Reaktion vom Zustand der Monoschicht abhängt. Inzwischen kann die molekulare Ordnung von Monoschichten bereits in einzelnen Domänen mit mikroskopischer Auflösung untersucht werden, wobei hauptsächlich Methoden der Röntgenbeugung an Oberflächen, FT-IR-Spektroskopie und Brewster-Winkel-Mikroskopie (BAM) angewandt werden. Dieses Verfahren wird hier zur detaillierten Beschreibung der Enzymreaktion genutzt. Die Korrelation von Veränderungen der molekularen Ordnung mit der katalytischen Aktivität sollte das Verständnis dieser Reaktionsmechanismen fördern.

PLA₂ ist ein Calcium-abhängiges Enzym, das reichlich in lebenden Organismen vorhanden ist. Die enzymatische Reaktion mit der Membranoberfläche besteht aus einem molekularen Erkennungsprozess und einer Spaltungsreaktion.^[1] PLA₂ hydrolysiert stereoselektiv die *sn*-2-Esterbindung von L-Phospholipiden, wodurch Fettsäuren und Lysophospholipide freigesetzt werden (Abbildung 1a). Die Aktivität von

[*] Prof. Dr. J. Li, Z. Chen, X. Wang
International Joint Lab, Center for Molecular Science
Institute of Chemistry
Chinese Academy of Science
De Wai, Bei Sha Tan, Beijing 100101 (China)
Fax: (+86) 10-6487-9375
E-mail: jqli@ipc.ac.cn

Prof. Dr. H. Möhwald, Dr. G. Brezesinski
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung
14476 Golm/Potsdam (Deutschland)
Fax: (+49) 331-567-9202
E-mail: moehwald@mpikg-golm.mpg.de

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt durch einen Forschungsvertrag zwischen der Max-Planck-Gesellschaft und der Chinesischen Akademie der Wissenschaften sowie durch die Chinesische Staatsstiftung für Naturwissenschaften. J.L. dankt dem Präsidentenfonds der Chinesischen Akademie der Wissenschaften und der Chinesischen Nationalen Abteilung für Personalwesen. DPPC = Dipalmitoylphosphatidylcholin.