

Selbstorganisation von Metall-Virus-Nanohanteln**

Sinan Balci, Kei Noda, Alexander M. Bittner, Anan Kadri, Christina Wege, Holger Jeske und Klaus Kern*

Eine typische Schwierigkeit bei der Synthese von Nanostrukturen ist das Modifizieren von nanoskaligen Objekten an spezifischen Positionen, z.B. die selektive chemische Modifizierung der Enden eines Stäbchens. Für die Funktionalisierung der Enden von Halbleiterstäbchen haben Mokari et al. eine elegante Strategie entwickelt,^[1] wohingegen für komplexe Protein-basierte Objekte maßgeschneiderte Antikörper zum Einsatz kommen können.^[2]

Wir demonstrieren hier, dass das Vorhandensein der RNA eine einfache und elegante Synthese von Goldnanostrukturen an den Enden des Tabakmosaikvirus (tobacco mosaic virus, TMV) ermöglicht. Wir beobachteten, dass 6 nm große Goldnanopartikel (Au-Np) spezifisch an die Enden der 300 nm langen viralen Röhren binden. Wir diskutieren Mechanismen, die diese erstaunliche Selektivität erklären, besonders die Wechselwirkung der Au-Np mit dem RNA-Strang,^[3,4a] der an beiden Enden des TMV teilweise von seiner Proteinhülle befreit wird. Die Au-Np konnten wir anschließend durch stromlose Abscheidung von Gold bis auf einige zehn Nanometer vergrößern, wodurch Gold-Virus-Gold-Hanteln entstanden.

Das Anordnen von Partikeln auf der Nanoskala ist von großem Interesse, weil sich die kollektiven Eigenschaften von gezielt positionierten Np üblicherweise von denen einzelner Np unterscheiden.^[1,5,6] DNA^[5,7] und Viren^[6] sind wegen ihres hochsymmetrischen Aufbaus und ihrer engen Größenverteilung ideale Template für eine solche Positionierung, wie auch für die Synthese von Nanomaterialien, die ja oft auf bekannten Np-Markierungstechniken aufbaut.^[4] Stäbchenför-

mige (filamentöse) Viren sind vielversprechende Template für Metall-Np; auf diese Weise erzeugte Strukturen könnten sich für den Aufbau neuer Materialien und nanoskaliger Bauteile eignen.^[8–19]

Das umfassend charakterisierte TMV^[20] aggregiert Kopf-an-Schwanz und bildet damit Stäbchen, die länger als einzelne Virionen sind.^[21] Die genau bekannten chemischen und strukturellen Details ermöglichen es, kovalente Bindungen selektiv zu platzieren^[11] und lokale chemische Reaktionen mit Metallionen^[15–18] und Partikeln durchzuführen,^[19] die zum Aufbau von Nanoröhren und linear angeordneten Np genutzt werden können. Die Enden der röhrenförmigen Virionen sind – zumindest in selektiver Weise – nur für maßgeschneiderte Antikörper zugänglich,^[2] die jedoch mehrere Nachteile haben, z.B. die Produktion *in vivo* (aufwändig) oder auch das Anbinden von Metallclustern in relativ großem Abstand von der Röhrenöffnung (ohne Einfluss auf Prozesse im Kanal). Es ist bemerkenswert, dass das Wildtyp-TMV kein Cystein auf seiner äußeren Oberfläche aufweist, sodass Au-Np nicht binden können; natürlich können Cystein und andere Aminosäuren gentechnisch eingebaut werden,^[22] was auch für das Kuhbohnenmosaikvirus (cowpea mosaic virus, CPMV) demonstriert wurde.^[6]

Unsere Technik basiert auf einem Goldsol,^[4a] mit dem die Virussuspension versetzt wird (Verhältnis Au-Np/TMV ca. 4000, Inkubation über Nacht, Raumtemperatur, ohne Rühren). Transmissionselektronen- (TEM) und Rasterkraftmikroskopie (RKM) können die selektiv angebundenen Goldpartikel sichtbar machen. Ungefähr die Hälfte der so markierten Virionen trugen ein einzelnes Au-Np (Abbildung 1a), der Rest wies zwei oder mehr auf (Abbildung 1b). Insgesamt waren ungefähr 90 % der TMV-Partikel markiert (siehe TEM-Experimente). Wir fanden keine an die äußere Oberfläche der Virionen gebundenen Partikel.

Eine wichtige Fragestellung ist, an welche chemischen Gruppen die Au-Np binden. Zwar bieten sich zunächst die Hülproteine an; man kann aber auf der relevanten Skala (Goldfacetten von einigen nm Ausdehnung) keine Präferenz für gewisse Abschnitte des Proteins erwarten, z.B. für die Oberflächen der Vier-Helix-Bündel, die nur an den Enden eines Virions zugänglich sind. Daher kommt nur die RNA in Frage. RNA bindet bekanntlich an Au-Np,^[3] und entsprechende Np-RNA-Konjugate werden als Tracer verwendet.^[4b] Die helikal angeordnete RNA ist in TMV üblicherweise tief in die Proteinhülle eingebettet,^[20] nicht aber an den Enden eines Virions. Tatsächlich kann man die Proteinhülle an den Enden (oder auch komplett) entfernen, womit die RNA freigesetzt wird.^[23] Zunächst überprüften wir das Anbindevermögen der freien RNA an Au-Np, indem wir RNA über Nacht mit dem Goldsol inkubierten. Abbildung 1d zeigt, dass

[*] S. Balci, Dr. K. Noda,^[+] Dr. A. M. Bittner, Prof. K. Kern

Max-Planck-Institut für Festkörperforschung
Heisenbergstraße 1, 70569 Stuttgart (Deutschland)
Fax: (+49) 711-689-1662

E-Mail: a.bittner@fkf.mpg.de
Homepage: <http://www.fkf.mpg.de/kern>

A. Kadri, Dr. C. Wege, Prof. H. Jeske
Biologisches Institut
Universität Stuttgart
Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart (Deutschland)

[+] Aktuelle Adresse:
Department of Electronic Science and Engineering
Kyoto University
Katsura, Nishikyo, Kyoto 615-8510 (Japan)

[**] K.N. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Forschungsstipendium. Wir danken Dr. A. J. Bhattacharya (MPI für Festkörperforschung) für die Zeta-Potentialmessungen, C. Kocher (Universität Stuttgart) für TEM-Aufnahmen sowie M. Kelsch und Dr. F. Philipp (MPI für Metallforschung) für ihre Hilfe.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

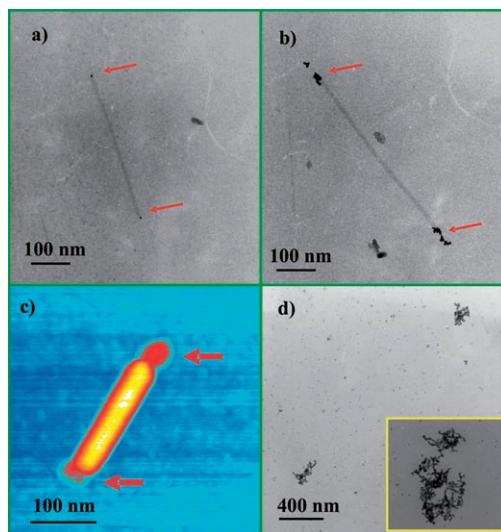


Abbildung 1. TEM- (a,b,d) und topographische RKM-Bilder (c) von Au-Np (rote Pfeile) an TMV und TMV-RNA. a) Einzelnes TMV-Partikel mit je einem Au-Np an beiden Enden. b) Zwei Kopf-an-Schwanz aggregierte Virionen mit an die Enden gebundenen Au-Np. c) Einzelnes TMV-Partikel (ca. 13 nm Höhe) auf Siliciumwafer mit Au-Np (5–8 nm Höhe) an den Enden. d) Au-Np, gebunden an TMV-RNA-Knäuel; Einschub: Detailbild (350×350 nm).

Au-Np in der Tat an RNA binden: Die Knäuelstruktur erinnert an die Struktur freier RNA, hier allerdings dicht mit Au-Np markiert, analog zu den Au-Np-Ketten an den TMV-Enden (Abbildung 1b).

Goldsole werden, vor allem in der biologischen Grundlagenforschung, schon seit Jahren angewendet.^[4] Unser Sol enthält Citrat-terminierte Goldpartikel, die negativ geladen sind, und ein Zeta-Potential von ca. –42 mV aufweisen.^[24,25] TMV ist im Bereich des verwendeten pH-Werts (ca. 5) ebenfalls negativ geladen (isoelektrischer Punkt ca. 3.5).^[26] Somit können elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Au-Np und der TMV-RNA ausgeschlossen werden. Auch Wechselwirkungen der Ladungen der RNA mit im Gold induzierten Dipolen^[27] können keine Rolle spielen, denn die Np würden sonst auch an die äußere Oberfläche des TMV binden; obwohl das Hüllprotein auch einige positiv geladene Aminosäuren nahe an der äußeren Oberfläche aufweist, binden die Partikel offensichtlich nicht. Cardenas et al. haben vorgeschlagen, dass der hydrophobe Effekt von DNA-Basen die Bindung zwischen Au-Np und DNA stabilisiert.^[28] Es ist ferner bekannt, dass Pyridin an Goldoberflächen gebundenes Citrat verdrängt.^[29] Wir postulieren hier einen ähnlichen Mechanismus (Abbildung 2): Die aromatischen Basen der RNA verdrängen Citrat von der Goldoberfläche, sodass Au-Np selektiv an die RNA binden können.

Die Verfügbarkeit von RNA-Basen an beiden Enden der Virionen konnten wir indirekt über die partielle enzymatische Entfernung von RNA mit RNase A nachweisen. Dazu wurde in einem Parallelexperiment ein Aliquot TMV-Suspension mit RNase A behandelt und mit Goldsol versetzt, während ein zweites Aliquot nur mit Goldsol gemischt wurde. Ungefähr 20% der RNase-A-behandelten TMV-Partikel waren mit Au-Np markiert, während ohne RNase-A-Spaltung un-

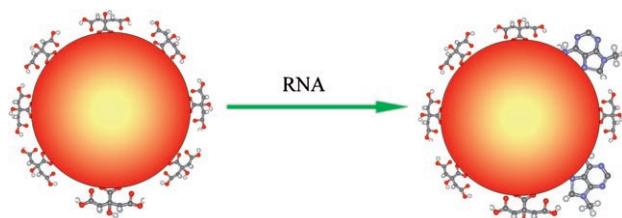


Abbildung 2. Selektives Binden von Au-Np an RNA (nicht maßstabsgetreu). Die heterocyclischen aromatischen Basen der RNA verdrängen Carboxylat von der Goldoberfläche (O rot, C grau, N blau, H weiß). Die RNA kann gänzlich frei sein, oder aber teilweise aus TMV herausragen.

gefähr 90 % selektiv an den Enden markiert waren. Offenbar können die Au-Np einige Hüllproteine entfernen und damit die RNA teilweise freilegen; tatsächlich sind Gold-markierte Virionen durchschnittlich ca. 25 nm kürzer als native.

Um weitere Funktionalisierungsmöglichkeiten aufzuzeigen, schieden wir Gold stromlos auf den Au-Np ab, um sie zu vergrößern.^[30] Dafür wurden Siliciumwafer mit adsorbierten TMV-Au-Np-Konjugaten in Goldbäder überführt, wobei sich hantelförmige Strukturen mit Höhen von (69 ± 13) nm bildeten (Abbildung 3).

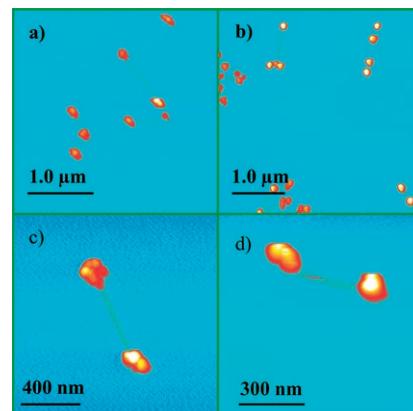


Abbildung 3. Topographische RKM-Aufnahmen von Goldpunkten an den Enden von TMV (adsorbiert auf Siliciumwafern). a), b) TMV mit endgebundenen Goldpunkten. c), d) Details der Hantelstrukturen. Die Stäbchen können aus 1–3 Kopf-an-Schwanz aggregierten Virionen bestehen.

Au-Np von 6 nm Durchmesser können demnach selektiv an die Enden des TMV binden und können so vergrößert werden, dass sich Gold-Virus-Gold-Nanohanteln bilden. Wahrscheinlich können die Au-Np ein Teilstück der viralen RNA freilegen, wobei die heterocyclischen aromatischen Basen das Citrat von der Goldoberfläche verdrängen. Somit ist ohne jegliche chemische oder gentechnische Modifizierung des TMV eine sehr gute Positionsselektivität erzielbar. Die Wechselwirkung von unmodifizierter (z.B. nicht thiolierter) RNA mit Au-Np ist eine neuartige Methode, nanoskalige Anordnungen von Molekülen zu erreichen, die Nucleinsäurebasen enthalten, z.B. von Peptiden und Enzymen, die an Nucleinsäuren binden, oder von anderen Viren; auch die

Sequenzentschlüsselung reiner RNA ist denkbar.^[3] Die selektive Vergrößerung von Au-Np an den Enden des TMV verweist auf zukünftige Anwendungsmöglichkeiten: Vorstellbar ist z.B. ihre Verwendung als Knotenpunkte für die elektrische Verdrahtung auf der Nanoskala; das Anbinden magnetischer Np könnte eine makroskopisch gesteuerte Platzierung von TMV ermöglichen; optische Nahfeldeffekte sollten sich durch lokale Verstärkung von elektromagnetischen Feldern an den Partikeln ergeben.

Experimental Section

Pflanzen von *Nicotiana tabacum* var. Samsun nn wurden mechanisch mit Plasmid-DNA inkuliert, die eine Kopie der vollständigen cDNA von TMV enthielt (Details zur Isolierung und Reinigung von TMV aus infiziertem Pflanzenmaterial siehe Lit. [17]). Für ein repräsentatives Experiment wurden 200 µL des Goldsols (0.8 mg mL⁻¹; Aurion, Wageningen, NL) mit 800 µL (gegen Wasser) dialysierter TMV-Suspension (0.025 mg mL⁻¹) vermischt. Die Au-Np wurden mit einer etablierten stromlosen Methode selektiv vergrößert.^[30] Ein oxidiertes Siliciumwafer mit TMV-Au-Np wurde zu einer Mischung aus 150 µL 0.06 M Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB; Fluka, 99.8%), 200 µL 0.25 mM HAuCl₄·3H₂O (Aldrich) und 10 µL 0.1M Ascorbinsäure (Merck) gegeben, wobei der pH-Wert auf 4 eingestellt wurde. TMV-RNA wurde erhalten, indem 10 µL TMV-Suspension (10 mg mL⁻¹) mit 90 µL Proteinase K (100 µg mL⁻¹) in 0.1M Tris-Puffer (Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Fluka, 99.8%) versetzt wurden (pH 8.3, 2 h, Raumtemperatur, kein Rühren); dann wurden 200 µL des Goldsols (0.8 mg mL⁻¹) zugegeben. Für TEM verwendeten wir ein Philips CM 200 bei 200 kV. Die RKM waren Thermomicroscopes Autoprobe M5 und CP, jeweils kontaktfrei oder im „intermittent contact“-Modus mit Nanosensor- (NCHR) und Budgetsensor-Spitzen betrieben.

Eingegangen am 7. November 2006
Online veröffentlicht am 20. März 2007

Stichwörter: Biologische Template · Gold · Nanoröhren · RNA · Stromlose Abscheidung

- [1] a) T. Mokari, E. Rothenberg, I. Popov, R. Costi, U. Banin, *Science* **2004**, *304*, 1787–1790; b) T. Mokari, C. G. Sztrum, A. Salant, E. Rabani, U. Banin, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 855–863.
- [2] M. H. V. Regenmortel, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1999**, *354*, 559–568.
- [3] H. Li, L. Rothberg, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6229–6233.
- [4] a) M. A. Hayat, *Colloidal Gold*, Vol. 1 (Hrsg.: M. A. Hayat), Academic Press, San Diego, **1989**; b) S. I. Dworetzky in *Colloidal Gold*, Vol. 3 (Hrsg.: M. A. Hayat), Academic Press, San Diego, **1991**, S. 265–279.
- [5] A. P. Alivisatos, K. P. Johnson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, Jr., P. G. Schultz, *Nature* **1996**, *382*, 609–611.

- [6] A. S. Blum, C. M. Soto, C. D. Wilson, J. D. Cole, M. Kim, B. Gnade, A. Chatterji, W. F. Ochoa, T. Lin, J. E. Johnson, B. R. Ratna, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 867–870.
- [7] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, *Science* **2002**, *297*, 72–75.
- [8] G. R. Souza, D. R. Christianson, F. I. Staquicini, M. G. Ozawa, E. Y. Snyder, R. L. Sidman, J. H. Miller, W. Arap, R. Pasqualini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 1215–1220.
- [9] R. J. Tseng, C. Tsai, L. Ma, J. Ouyang, C. S. Ozkan, Y. Yang, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 72–77.
- [10] A. M. Bittner, *Naturwissenschaften* **2005**, *92*, 51–64.
- [11] T. L. Schlick, Z. Ding, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3718–3723.
- [12] J. C. Falkner, M. E. Turner, J. K. Bosworth, T. J. Trentler, J. E. Johnson, T. Lin, V. L. Colvin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5274–5275.
- [13] C. Mao, D. J. Solis, B. D. Reiss, S. T. Kottmann, R. Y. Sweeney, A. Hayhurst, G. Georgiou, B. Iverson, A. M. Belcher, *Science* **2004**, *303*, 213–217.
- [14] S.-Y. Lee, J. Choi, E. Royston, D. B. Janes, J. N. Culver, M. T. Harris, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 974–981.
- [15] W. Shenton, T. Douglas, M. Young, G. Stubbs, S. Mann, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 253–256.
- [16] M. Knez, A. M. Bittner, F. Boes, C. Wege, H. Jeske, E. Maiß, K. Kern, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1079–1082.
- [17] M. Knez, M. Sumser, A. M. Bittner, C. Wege, H. Jeske, T. P. Martin, K. Kern, *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14*, 116–124.
- [18] S. Balci, A. M. Bittner, K. Hahn, C. Scheu, M. Knez, A. Kadri, C. Wege, H. Jeske, K. Kern, *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 6251–6257.
- [19] T. Yonezawa, S. Onoue, N. Kimizuka, *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 1498–1499.
- [20] K. Namba, R. Pattanayek, G. Stubbs, *J. Mol. Biol.* **1989**, *208*, 307–325.
- [21] A. Nedoluzhko, T. Douglas, *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *84*, 233–240.
- [22] H. Yi, S. Nisar, S.-Y. Lee, M. A. Powers, W. E. Bentley, G. F. Payne, R. Ghodssi, G. W. Rubloff, M. T. Harris, J. N. Culver, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1931–1936.
- [23] Y. F. Drygin, O. A. Bordunova, M. O. Gallyamov, I. V. Yaminsky, *FEBS Lett.* **1998**, *425*, 217–221.
- [24] J. Pérez-Juste, L. M. Liz-Marzán, S. Carnie, D. Y. C. Chan, P. Mulvaney, *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14*, 571–579.
- [25] S. Biggs, P. Mulvaney, C. F. Zukoski, F. Grieser, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9150–9157.
- [26] M. Deggelmann, C. Graf, M. Haganbüchle, U. Hoss, C. Johner, H. Kramer, C. Martin, R. Weber, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 364–368.
- [27] P. Sandström, M. Boncheva, B. Akerman, *Langmuir* **2003**, *19*, 7537–7543.
- [28] M. Cardenas, K. Schillen, D. Pebalk, T. Nylander, B. Lindman, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 832–837.
- [29] I. Larson, D. Y. C. Chan, C. J. Drummond, F. Grieser, *Langmuir* **1997**, *13*, 2429–2431.
- [30] N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4065–4067.