

DNA-Metallisierung

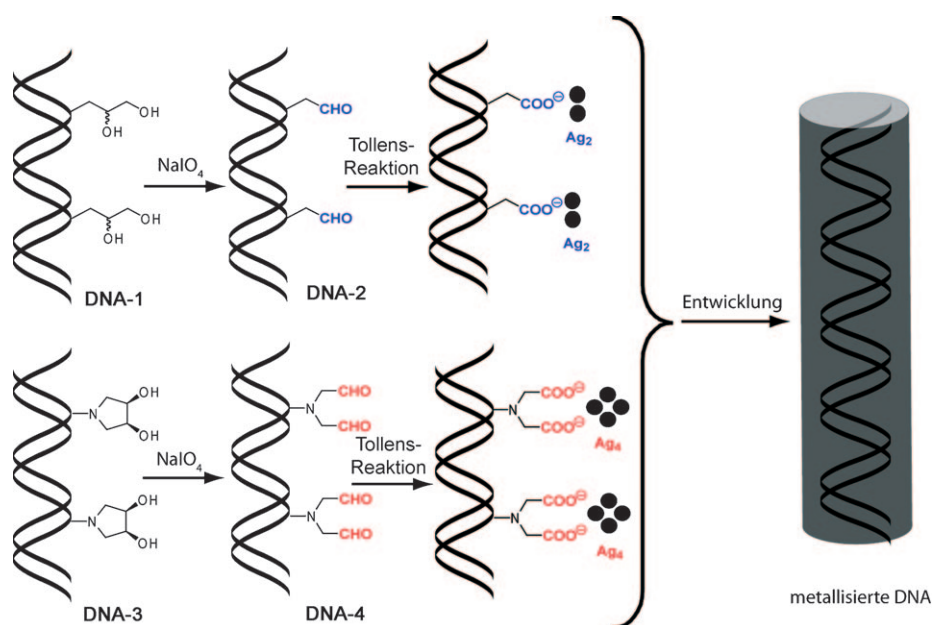
Gesteuerte Keimbildung bei der DNA-Metallisierung**

Christian T. Wirges, Jan Timper, Monika Fischler, Alla S. Sologubenko, Joachim Mayer, Ulrich Simon und Thomas Carell*

DNA ist ein Molekül mit außergewöhnlicher Fähigkeit zur Selbstorganisation, einer Eigenschaft, die vielfach zur Herstellung von nanoskaligen Objekten^[1] und Hybridstrukturen genutzt worden ist.^[2,3] Um das Anwendungsgebiet der DNA zu erweitern, arbeitet man nun daran, ihre niedrige intrinsische Leitfähigkeit^[4] zu erhöhen.

In dieser Hinsicht hat sich die selektive Abscheidung einer dünnen Schicht gut leitfähigen Metalls wie Ag,^[5] Pd,^[6] Pt,^[7] Cu^[8] oder Co^[9] als vielversprechend erwiesen. Die meisten Verfahren zur Metallisierung von DNA beruhen darauf, dass elektrostatisch an DNA gebundene Metallionen durch Zugabe eines Reduktionsmittels in Metallcluster überführt werden, die an der DNA haften. Im zweiten Schritt, dem Entwicklungsschritt, fungieren diese Metallcluster als Keime für die weitere Abscheidung von Metall. Dieses Verfahren stammt aus der Schwarzweißfotografie. Neue Methoden zur Metallisierung nutzen die Modifizierung von DNA mit reduzierenden funktionellen Gruppen,^[10] die photochemische Reduktion von Silber auf DNA^[11] sowie die Bildung von DNA-Pt^{II}-Addukten als Vorstu-

fen für die Metallkeimbildung,^[12] um eine höhere Selektivität der Metallabscheidung zu erreichen. Der entscheidende Schritt bei der Metallisierung der DNA ist die Bildung der ersten Metallkeime, da nur mit regelmäßig angeordneten Metallclustern homogener Größe eine gleichmäßige und ef-



Schema 1. Reaktion der Diol-modifizierten DNA-Stränge **DNA-1** und **DNA-3** zu Monoaldehyd- und Dialdehyd-modifizierten DNA-Strängen **DNA-2** bzw. **DNA-4**, gefolgt von Metallisierungsschritten.

fiziente nachfolgende Metallisierung von DNA möglich ist. Der Keimbildungsprozess ist allerdings noch kaum verstanden und daher schwer steuerbar.

Um DNA mit Silber zu beschichten, müssen kleine, einem Entwicklungsprozess zugängliche Silbercluster Ag_n ($n = 2, 4, 6, \dots$) auf der DNA gebildet werden. Diese können in einer Redoxreaktion von Silberionen in Lösung mit Aldehydgruppen an der DNA (Tollens-Reaktion) erhalten werden. Während eine Aldehydgruppe wegen der Stöchiometrie des Redoxprozesses in der Lage ist, zwei Silberionen zu reduzieren und einen Ag_2 -Cluster erzeugt, sollten Dialdehydgruppen zur Bildung von Ag_4 -Clustern fähig sein (Schema 1). Diese Ag_4 -Cluster gelten wegen ihrer elektronischen Struktur als die kleinsten stabilen, entwickelbaren (magic size) Silbercluster.^[13] Sollte dies zutreffen, dürfte die gesteuerte Bildung von Ag_4 -Clustern an DNA eine homogenere und effizientere Metallisierung von DNA ermöglichen. Um DNA mit Dialdehydresten zu erhalten, funktionalisierten wir DNA mit *cis*-1,3-Dihydropyridin-Einheiten, die durch Umsetzung

[*] Dipl.-Chem. C. T. Wirges, Prof. Dr. T. Carell
Department Chemie und Biochemie
Ludwig-Maximilians-Universität
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77756
E-Mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de

Dipl.-Chem. J. Timper, Dr. M. Fischler, Prof. Dr. U. Simon
Institut für Anorganische Chemie, RWTH Aachen
Landoltweg 1, 52074 Aachen (Deutschland)

Dr. A. S. Sologubenko, Prof. Dr. J. Mayer
Gemeinschaftslabor für Elektronenmikroskopie, RWTH Aachen
Ahornstraße 55, 52074 Aachen (Deutschland)

[**] Wir bedanken uns für finanzielle Unterstützung bei der Volkswagen-Stiftung, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB-486 und SFB-749) und beim Exzellenzcluster Nanosystems Initiative Munich. C.T.W. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Promotionsstipendium.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200803123> zu finden.

mit NaIO_4 ^[14] direkt am DNA-Strang zu vicinalen Dialdehyden gespalten werden (Schema 1). Für einen Vergleich zwischen Mono- und Dialdehyden stellten wir zusätzlich DNA mit offenkettigen 1,2-Dioleinheiten her, die durch NaIO_4 in Monoaldehyde überführt werden. Zur Synthese langer DNA-Stränge mit den gewünschten Modifikationen nutzten wir den enzymatischen Einbau der entsprechend modifizierten Nucleosidtriphosphate mit der Polymerasekettenreaktion (PCR).^[15] Zwei Arten von DNA-Strängen, **DNA-1** und **DNA-3**, wurden mit dieser Methode erzeugt, die mit Periodat in Mono- bzw. Dialdehyd-modifizierte **DNA-2** bzw. **DNA-4** überführt werden (Schema 1).

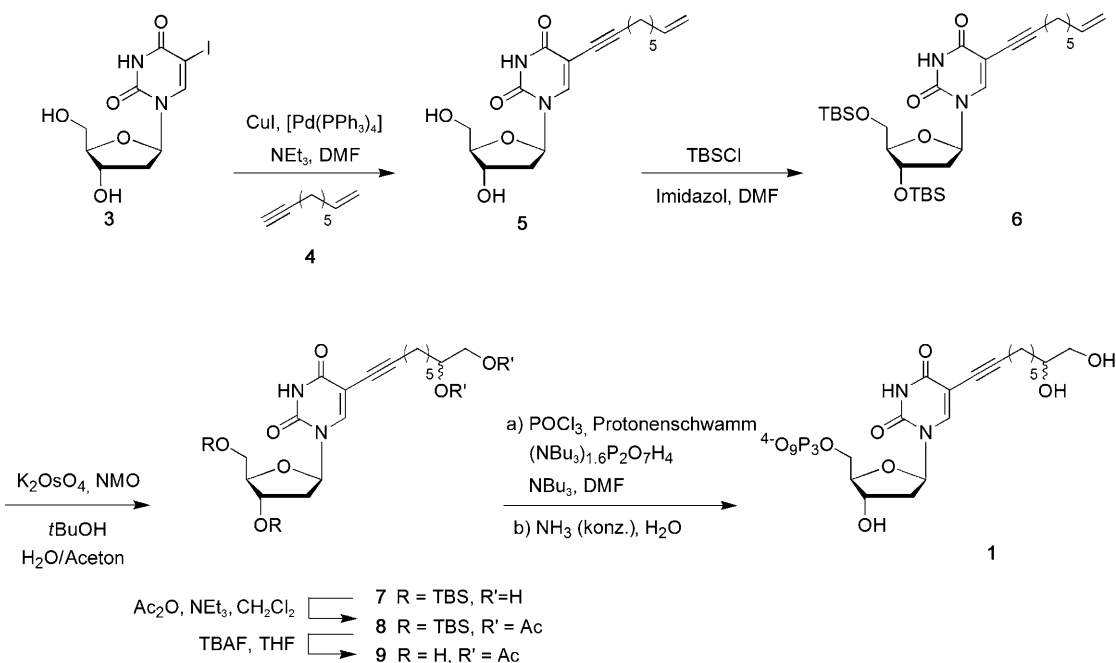
Das mit einem terminalen Diol modifizierte Nucleosidtriphosphat **1** wurde in einer linearen, sechsstufigen Synthesesequenz hergestellt (Schema 2), beginnend mit dem bekannten Uridinderivat **3**. Die Synthese von Triphosphat **2** wird in Schema 3 gezeigt. Schlüsselschritte sind die Amidbildung mit 3-Pyrrolin sowie die folgende selektive OsO_4 -katalysierte *cis*-Dihydroxylierung der Doppelbindung des Pyrrolins. Die Triphosphatsynthese wurde als Eintopfreaktion durchgeführt. In der PCR wurden die nichtnatürlichen Nucleotidsubstrate **1** und **2** mit hoher Effizienz von den Polymerasen Vent exo- und KOD XL in DNA eingebaut. Die gewünschten diolmodifizierten PCR-Produkte **DNA-1** und **DNA-3** wurden typischerweise in hohen Ausbeuten und in guter Reinheit erhalten (Abbildung 1).

Die Diol-modifizierten Stränge **DNA-1** und **DNA-3** wurden anschließend durch Umsetzung mit 1 mM NaIO_4 in Acetat-Puffer (Schema 1) in die Aldehyd-modifizierten Stränge **DNA-2** bzw. **DNA-4** überführt. Um die Effizienz und Ausbeute der NaIO_4 -Spaltung an langen DNA-Strängen (300mere) zu überprüfen, unterzogen wir die DNA vor und nach der Umsetzung mit Periodat einem enzymatischen To-

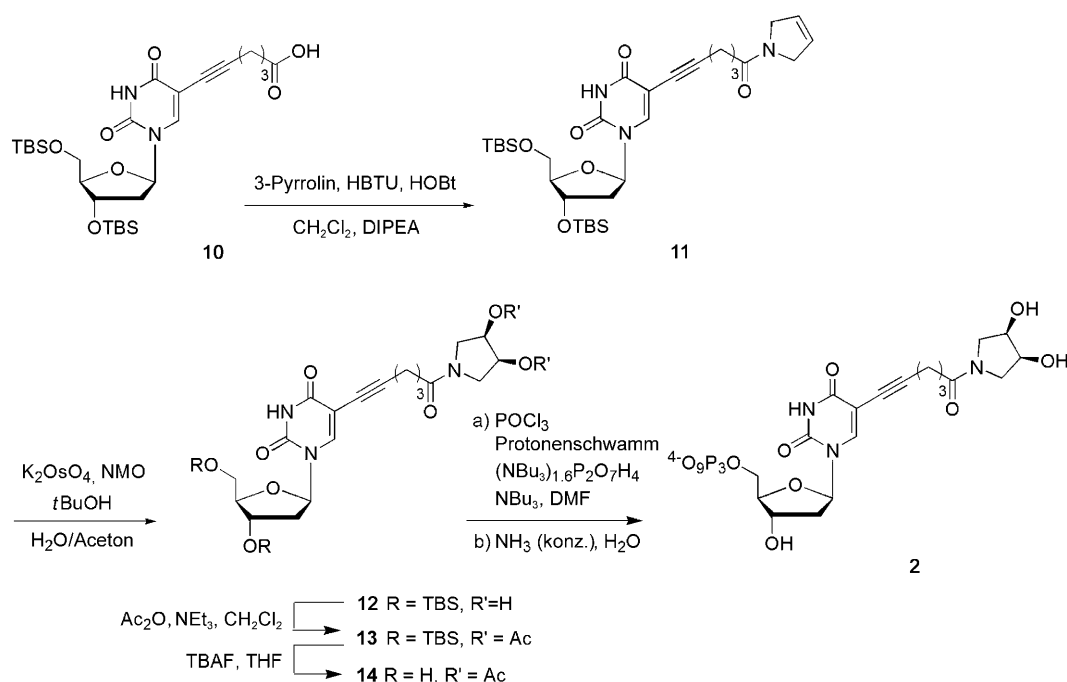
talverdaul und analysierten die erhaltene Nucleosidmischung mit HPLC-MS.^[16] Mit dieser Methode konnte die quantitative Reaktion der Diolgruppen zu Aldehyden an der DNA verifiziert werden. Wichtig ist, dass keine Nebenprodukte detektiert wurden, die auf oxidative Schädigung der Nucleoside dA und dG hindeuten würden. Dies belegt die außergewöhnliche Milde der Periodat-Spaltungsreaktion.

Um die 300mere **300DNA-2** und **300DNA-4** auf ihre Reaktion mit Silberlösung zu untersuchen, behandelten wir die beiden Aldehyd-modifizierten Stränge mit Tollens-Lösung. Im Fall von Dialdehyd-DNA **DNA-4** konnte mit bloßem Auge eine Gelbfärbung der Lösung beobachtet werden, während dies bei der Monoaldehyd-**DNA-2** kaum möglich war, sogar wenn sie in doppelter Konzentration eingesetzt wurde. Wir untersuchten anschließend die postulierte Bildung von Silbernanopartikeln durch Aldehyd-modifizierte DNA mit UV/Vis-Spektroskopie. Die gemessene Plasmonabsorption bei 400–450 nm, die typisch für Silber-Nanopartikel ist,^[17] stellte sich im Fall von Dialdehyd-modifizierter **DNA-4** tatsächlich als deutlich intensiver heraus (Abbildung 2a,b). Mit unmodifizierter DNA wurde in keinem Fall eine Plasmonabsorption gemessen,^[16] was die Selektivität und Spezifität der Metallisierungsreaktion unterstreicht. Konzentrationsabhängige Messungen der Entwicklung des Plasmonsignals zeigten, dass die Anfangskonzentration von Monoaldehyd-modifizierter **DNA-2** viermal so hoch sein muss wie die von **DNA-4**, um dieselbe Intensität der Plasmonabsorption zu erreichen (Abbildung 2c; die Messung der DNA-Konzentrationen erfolgte über die Absorption).

Silberfärbungsexperimente auf Nylonmembranen sollten zeigen, ob die durch die Dialdehyde verbesserte Nanopartikelbildung die Empfindlichkeit der DNA-Detektion durch



Scheme 2. Synthese des Diol-modifizierten Desoxyuridintriphosphats **1**. NMO = 4-Methylmorpholin-*N*-oxid, TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid, TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl.



Schema 3. Synthese des mit einem cyclischen Diol modifizierten Desoxyuridintriphosphats **2**. DIPEA = Diisopropylethylamin, HBTU = *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat, HOBT = 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol.

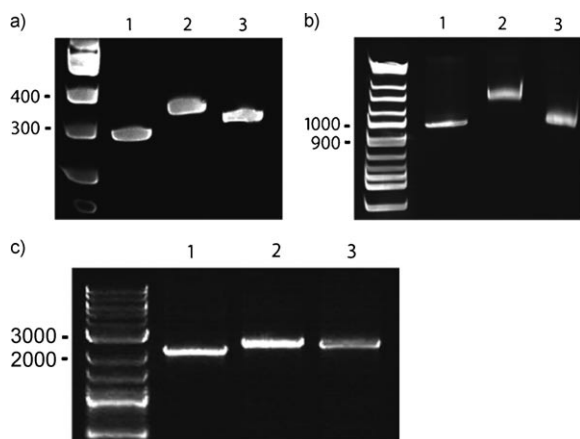


Abbildung 1. a) Herstellung von 300mer-DNA mit PCR. b) Herstellung von 900mer-DNA mit PCR. c) Herstellung von 2000mer-DNA mit PCR. Spur 1: natürliche Triphosphate: **DNA-N**; Spur 2: dTTP ersetzt durch Triphosphat **2**: **DNA-3**; Spur 3: dTTP ersetzt durch Triphosphat **1**: **DNA-1**.

Silberfärbung erhöht. Dazu wurden die mit Periodat gespaltenen, Aldehyd-modifizierten DNA-Stränge **300DNA-2** und **300DNA-4** auf die Membran aufgebracht und zunächst mit Tollens-Lösung behandelt, um die Bildung von Silberkeimen zu induzieren. Anschließend wurde die Membran gewaschen und mit Goldentwickler(Verstärker)-Lösung^[18] behandelt, um die entstandenen Silberkeime zu entwickeln (Abbildung 3).^[16] Native DNA ergab keinerlei Silberfärbung. Ein Vergleich von **300DNA-2** und **300DNA-4** zeigte eine starke Herabsetzung der Detektionsgrenze bei Verwendung von Dialdehyd-modifizierter DNA. **300DNA-4** konnte bis zu

einer Menge von $0.4 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ mit bloßem Auge detektiert werden (40 pg im gezeigten Beispiel).^[16]

Die mikrostrukturelle Analyse der komplexen DNA-Silbercluster-Strukturen erfolgte transmissionselektronenmikroskopisch (HR-STEM, high resolution scanning transmission elektron microscopy). Bei diesen Experimenten wurden die längeren PCR-Produkte **900DNA-N** (unmodifizierte DNA), **900DNA-2** und **900DNA-4** eingesetzt. Anschließend wurde ein kleiner Tropfen der Lösung, die nach Tollens-Behandlung der Stränge erhalten wurde (20 min), auf konventionelle, mit amorphem Kohlenstoff beschichtete Kupfer-TEM-Gitter aufgebracht. Die Proben wurden an Luft getrocknet und direkt danach im Mikroskop untersucht (Abbildung 4). Als Kontrollexperiment wurde reine Tollens-Lösung ohne DNA untersucht. In diesem Fall wurden wenige, zufällig verteilte Silbernanopartikel mit einem Durchmesser von $(1.1 \pm 0.4) \text{ nm}$ ^[19] detektiert (Abbildung 4a).

Im Fall von unmodifizierter DNA mit Tollens-Lösung (Abbildung 4b) zeigt die HR-STEM-Aufnahme wenige Nanopartikel, die nahezu ausschließlich in ausgedehnten Bereichen mit organischem Material zu finden sind. Diese sind etwas größer ($(1.8 \pm 0.7) \text{ nm}$) als diejenigen, die mit Tollens-Lösung alleine erhalten werden.^[19] Dies kann dadurch erklärt werden, dass die unmodifizierte DNA als Templat für die Nanopartikelbildung fungieren kann, wie von Wei und Mitarbeitern beschrieben.^[20] Die Untersuchung der Monoaldehyd-modifizierten **900DNA-2** (Abbildung 4c) ergab, dass mit Tollens-Lösung große Mengen an kleinen Silberclustern gebildet werden ($(1.2 \pm 0.5) \text{ nm}$).^[19] Eine genaue Überprüfung verschiedener Bereiche der TEM-Probe zeigte, dass diese kleinen Partikel das Hauptprodukt der Reaktion sind. Kettenartige Anordnungen von Silberpartikeln traten auf, waren

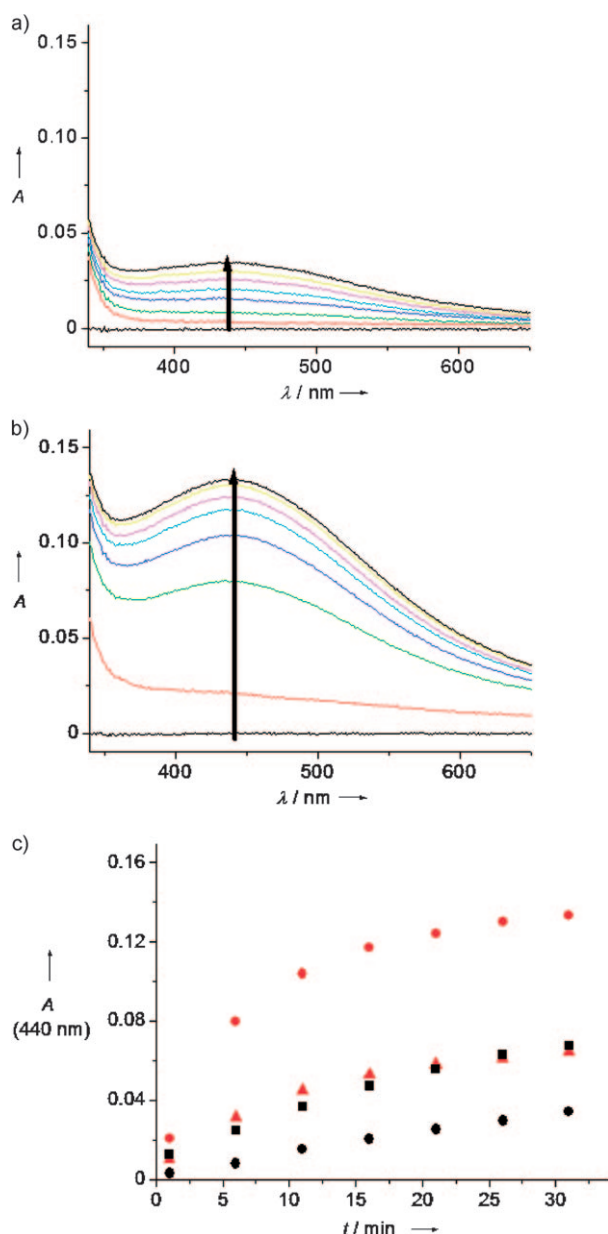


Abbildung 2. UV/Vis-spektroskopische Beobachtung der Tollens-Reaktion von Aldehyd-modifizierter DNA a) **300DNA-2** und b) **300DNA-4**. Die optische Dichte (OD) der DNA beträgt 0.25. Untere schwarze Linie: vor Zugabe von Tollens-Lösung, farbige Linien: Intervallmessungen im zeitlichen Abstand von 5 min nach Zugabe der Tollens-Lösung. c) Vergleich der Entwicklung des Plasmonsignals mit verschiedenen Konzentrationen von **300DNA-2** (schwarz) und **300DNA-4** (rot). Dreiecke: OD 0.125, Kreise: OD 0.25, Quadrate: OD 0.5.

jedoch selten und eher unregelmäßig angeordnet, was auf eine ineffiziente Clusterbildung hindeutet.

Mit **900DNA-4**, dem Dialdehyd-haltigen PCR-Produkt, ergab sich ein völlig anderes Bild: Hier wurde eine große Zahl kettenartig angeordneter Silberpartikel gefunden. Abbildung 4d zeigt einen repräsentativen Ausschnitt. Die Partikel sind deutlich größer als im Fall von Monoaldehyd-DNA ((2.6 ± 0.9) nm). Zwar kann das DNA-Molekül selbst nicht aufgelöst werden, aus der Länge der Clusterketten und ihrer

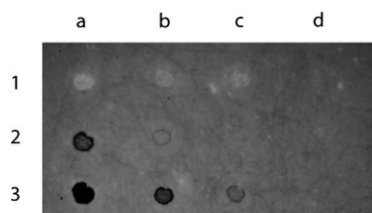


Abbildung 3. Silberfärbung von DNA auf einer Nylonmembran mit 1) **300DNA-N**, 2) **300DNA-2**, 3) **300DNA-4**. Konzentrationsreihe: a) 40, b) 4, c) 0.4, d) 0.04 ng μL⁻¹.

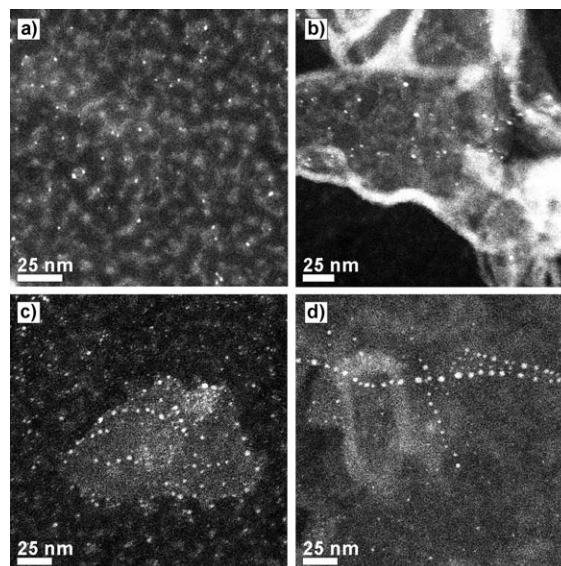


Abbildung 4. HR-STEM-Aufnahmen. a) Tollens-Lösung ohne DNA, b) Tollens-Lösung inkubiert mit natürlicher DNA, c) Tollens-Lösung inkubiert mit **900DNA-2**, d) Tollens-Lösung inkubiert mit **900DNA-4**. Inkubationsdauer jeweils 20 min.

regelmäßigen Anordnung lässt sich jedoch schlussfolgern, dass die Partikel sich tatsächlich auf einem DNA-Strang befinden. Interessanterweise ist der Abstand zwischen den Clustern viel größer, als aus der dichten Anordnung von Aldehyden auf der DNA folgen müsste. Als Erklärung bietet sich an, dass die zunächst gebildeten Ag₄-Cluster entlang der DNA diffundieren und sich zu größeren Clustern zusammenlagern, wie auch von Wei et al.^[20] vorgeschlagen wurde. Die Triebkraft dafür dürfte in der Verringerung der freien Oberflächenenergie der Metallcluster liegen. Wenn die Cluster frei in beide Richtungen auf dem DNA-Strang entlang diffundieren können und die wachsenden Silbercluster das gesamte frei vorliegende Silber aufbrauchen, ist am Ende des Prozesses eine annähernd äquidistante Anordnung der Silberkeime zu erwarten. An dieser Stelle sind jedoch weitere Forschungen nötig.

Die vorliegenden Befunde zeigen, dass der einleitende Keimbildungsschritt von großer Bedeutung für den weiteren Ablauf der Metallisierung ist. Dieser Schritt kann auf chemischem Weg gesteuert werden, indem Dialdehydgruppen synthetisiert werden, die offenbar besonders stabile und gut entwickelbare Ag₄-Cluster ergeben. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass die dazu verwendeten Triphosphat-

Bausteine gut zugänglich sind und mit PCR hocheffizient in DNA eingebaut werden können.

Eingegangen am 30. Juni 2008

Online veröffentlicht am 28. November 2008

Stichwörter: Clusterverbindungen · DNA · Keimbildung · Nanotechnologie · Silber

- [1] E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, N. C. Seeman, *Nature* **1998**, 394, 539–544; Y. He, T. Ye, M. Su, C. Zhang, A. E. Ribbe, W. Jiang, C. Mao, *Nature* **2008**, 452, 198–201; Y. Weizmann, A. B. Braunschweig, O. I. Wilner, Z. Cheglakov, I. Willner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 5289–5294.
- [2] C. I. Richards, S. Choi, J.-C. Hsiang, Y. Antoku, T. Vosch, A. Bongiorno, Y.-L. Tzeng, R. M. Dickson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5038–5039; Y. Weizmann, F. Patolsky, I. Popov, I. Willner, *Nano Lett.* **2004**, 4, 787–792; F. A. Aldaye, H. F. Sleiman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 4130–4131; M. Fischler, A. Sologubenko, J. Mayer, G. Clever, G. Burley, J. Gierlich, T. Carell, U. Simon, *Chem. Commun.* **2008**, 169–171.
- [3] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 1888–1910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1856–1876; N. Ma, E. H. Sargent, S. O. Kelley, *J. Mater. Chem.* **2008**, 18, 954–964.
- [4] X. Guo, A. A. Gorodetsky, J. Hone, J. K. Barton, C. Nuckolls, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, 3, 163–167.
- [5] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, 391, 775–778.
- [6] J. Richter, R. Seidel, R. Kirsch, M. Mertig, W. Pompe, J. Plachke, H. K. Schackert, *Adv. Mater.* **2000**, 12, 507–510.
- [7] R. Seidel, L. C. Ciacchi, M. Weigel, W. Pompe, M. Mertig, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 10801–10811.
- [8] C. F. Monson, A. T. Woolley, *Nano Lett.* **2003**, 3, 359–363.
- [9] Q. Gu, C. Cheng, D. T. Haynie, *Nanotechnology* **2005**, 16, 1358–1363.
- [10] K. Keren, R. S. Berman, E. Braun, *Nano Lett.* **2004**, 4, 323–326; K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, *Science* **2002**, 297, 72–75; G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1398–1399; M. Fischler, U. Simon, H. Nir, Y. Eichen, G. A. Burley, J. Gierlich, P. M. E. Gramlich, T. Carell, *Small* **2007**, 3, 1049–1055.
- [11] L. Berti, A. Alessandrini, P. Facci, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11216–11217.
- [12] M. Mertig, L. C. Ciacchi, R. Seidel, W. Pompe, *Nano Lett.* **2002**, 2, 841–844.
- [13] P. Fayet, F. Granzer, G. Hegenbart, E. Moisar, B. Pischel, L. Wöste, *Phys. Rev. Lett.* **1985**, 55, 3002–3004; T. Tani, *Photographic Sensitivity: Theory and Mechanisms*, Oxford University Press, Oxford, **1995**.
- [14] C. V. Miduturu, S. K. Silverman, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 5774–5777.
- [15] K. Sakthivel, C. F. Barbas III, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2998–3002; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2872–2875; S. E. Lee, A. Sidorov, H. Goullain, N. Mignet, S. J. Thorpe, J. A. Brazier, M. J. Dickman, D. P. Hornby, J. A. Grasby, D. M. Williams, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 1565–1573; M. Kuwahara, J.-I. Nagashima, M. Hasegawa, T. Tamura, R. Kitagata, K. Hanawa, S.-I. Hososhima, T. Kasamatsu, H. Ozaki, H. Sawai, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 5383–5394.
- [16] Weiterführende Details sind in den Hintergrundinformationen zu finden.
- [17] A. Kumbhar, M. Kinnan, G. Chumanov, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12444–12445; U. Kreibitz, M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters*, Springer, Berlin, **1995**.
- [18] „Method for gold deposition during preparation of biosensors“: E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, 99-IL570 2000025136, 19991027, **2000**.
- [19] Eine statistische Analyse der Partikelgrößenverteilungen ist in den Hintergrundinformationen zu finden.
- [20] G. Wei, H. Zhou, Z. Liu, Y. Song, L. Wang, L. Sun, Z. Li, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 8738–8743.