

Selektive dsDNA-gesteuerte Bildung von Kupfer-Nanopartikeln in Lösung**

Alexandru Rotaru, Subrata Dutta, Elmar Jentzsch, Kurt Gothelf und Andriy Mokhir*

DNA-Sequenzen können selektiv miteinander hybridisieren und so lineare oder verzweigte doppelsträngige (ds) helikale Strukturen bilden. Diese Fähigkeit macht sie zu idealen Bausteinen zur Herstellung von Nanostrukturen bestimmter Form und Größe. So wurden beispielsweise komplexe 2D- und sogar 3D-Strukturen durch die Selbstanordnung von DNA-Strängen erhalten.^[1] Die Herstellung leitfähiger dsDNAs wurde bereits durch die Beschichtung mit Metallen, Metalloxiden oder Metallsulfiden realisiert. So wurde etwa eine Vielzahl von Verfahren für die Beschichtung von DNA mit Au⁰, Pd⁰, Pt⁰, Ag⁰, Cu⁰ und CdS beschrieben.^[2,3] Allerdings ist erst wenig über die kontrollierte Modifizierung von ausgewählten Bereichen der DNA bekannt. Das erste Beispiel für die selektive Metallbeschichtung einer DNA wurde von Braun und Mitarbeitern vorgestellt.^[4] Hierbei wurde zunächst ein Teil einer λ -DNA durch Bildung eines RecA-ssDNA-Komplexes geschützt und der ungeschützte Teil der DNA durch sequenzielle Reduktion von Ag⁺ und Au³⁺ metallisiert. Abschließend wurde das Protein entfernt. Durch diese Methode erhält man zwei Bereiche aus leitenden DNA-Drähten, die von einem etwa 1 μ m langen nichtleitenden DNA-Stück unterbrochen sind. Allerdings ist die RecA-induzierte homologe Rekombination nur für lange DNA-Stränge effizient und somit eher auf die Konstruktion von großen molekularen Objekten (> 1 μ m) beschränkt.

Über die chemische Synthese von dsDNAs, die Metallionen zwischen ihren Basenpaaren enthalten, ist ebenfalls berichtet worden.^[5] Über die Zahl solcher Basenpaare kann die Länge der Metallionen enthaltenden Bereiche in der DNA verändert werden.^[5] Zukünftig muss noch experimentell bestätigt werden, dass diese Metallionen enthaltenden DNA-Komplexe leitend sind und somit als potenzielle elektrische Drähte genutzt werden könnten.

Hier beschreiben wir eine Methode für die selektive Metallisierung einer dsDNA in Gegenwart von ssDNA (Abbildung 1). In den Doppelsträngen vorhandene ssDNAs

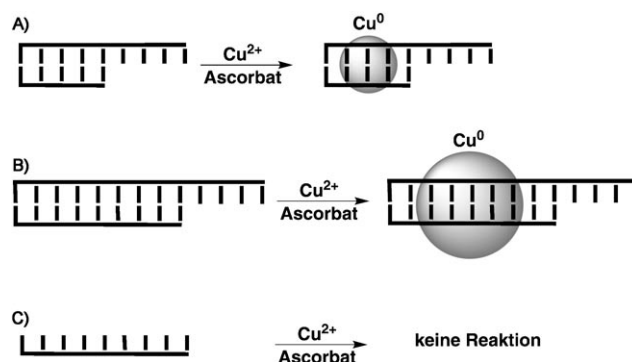


Abbildung 1. Kupfer-Nanopartikel bilden sich in einer Lösung aus Cu²⁺ und Ascorbat in Gegenwart eines DNA-Doppelstrangs (Reaktion A und B). Einzelsträngige DNAs fördern diese Reaktion nicht (C). Die Größe der Nanopartikel ist abhängig von der Zahl der im Doppelstrang enthaltenen Basenpaare. Einzelsträngige Regionen der metallisierten Doppelstränge können genutzt werden, um Cu-Nanopartikel in komplexere Strukturen zu organisieren.

können als Ankergruppen für die Herstellung funktioneller Bausteine auf der Grundlage metallisierter dsDNAs genutzt werden. Wir konnten so eine einfache Funktionseinheit bestehend aus zwei metallisierten dsDNAs, die durch einen nichtmetallisierten starren Linker verbunden waren, herstellen.

Woolley und Mitarbeiter berichteten, dass λ -DNA, die auf SiO₂-Oberflächen immobilisiert war, durch 0.1–1 M Cu(NO₃)₂ und 0.1 M Ascorbat mit Kupfer metallisiert werden kann.^[3] Die hohe Konzentration der Reagentien führte zur unspezifischen Bildung von Cu⁰ selbst bei Abwesenheit eines Templats. Dieses Problem konnte durch die Vorbehandlung der dsDNA-modifizierten Oberfläche mit Alkalimetallionen verringert werden.^[3] Allerdings wurden die DNA-Template durch Hydroxylradikale (HO[•]), die in der konzentrierten Cu²⁺/Ascorbat-Mischung gebildet wurden, zerstört.^[3,6]

Bei unseren Experimenten nutzten wir wesentlich kleinere Konzentrationen (< 1000-fach) eines Cu²⁺-Salzes. Laut HPLC-Analyse sind sowohl ssDNA als auch dsDNA unter diesen Bedingungen stabil (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Die Sequenzen der in dieser Studie getesteten DNAs sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Durch Rasterkraftmikroskopie (AFM) konnten wir beobachten, dass bei geringen CuSO₄-Konzentrationen die ssDNA keine Nanopartikel bildet (Abbildung 2A), wohin-

[*] S. Dutta,^[4] Dr. E. Jentzsch, Dr. A. Mokhir
Anorganisch-Chemisches Institut
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 270, 69120 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-548-439
E-Mail: andriy.mokhir@urz.uni-heidelberg.de

Dr. A. Rotaru,^[4] Prof. Dr. K. Gothelf
Centre for DNA Nanotechnology, Department of Chemistry and
iNANO, Aarhus University, Århus C (Dänemark)

[*] Die Autoren haben gleichermaßen zu dieser Studie beigetragen.

[**] Wir danken der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg und der Danish National Research Foundation für die finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentelle Details und zusätzliche spektroskopische Experimente) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200907256> zu finden.

Tabelle 1: Sequenzen und Benennungen der eingesetzten DNAs.

| | 5'→3' | |
|--------------|----------------------------------|--------|
| DNA1 | GAA CGT ATG | 9-mer |
| DNA2 | TAC TCC ATA CGT TCT GTA C | 19-mer |
| DNA3 | GTT CAT CAC G | 10-mer |
| DNA4a | GTT TAT CAC G | 10-mer |
| DNA4b | GTT CTT CAC G | 10-mer |
| DNA5 | CGT GAT GAA CGT ATG AGC GTA T | 22-mer |
| DNA6 | ATG AAC GTA TGA GC | 14-mer |
| DNA7 | TAC TCG CTC ATA CGT TCA TTG TAC | 24-mer |
| DNA8 | CGT GAT GAA CGT ATG AGC GTA T | 22-mer |
| DNA9 | TACTCATACGCTCATACGTTTCATCAGACTAC | 32-mer |
| DNA10 | GTAGTCGTGATGAACGTATGAGCGTATGAGTA | 32-mer |

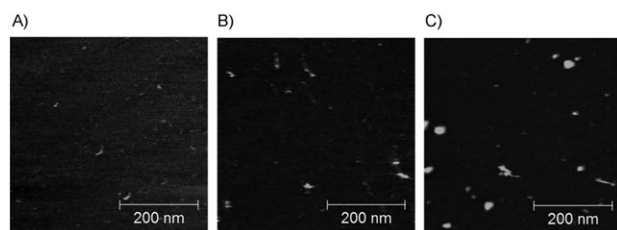


Abbildung 2. AFM-Aufnahmen von DNA-Templaten nach (versuchter) Bildung von Cu-Nanopartikel: A) ssDNA (**DNA7**), B) kurze dsDNA (**DNA6/DNA7**), C) lange dsDNA (**DNA8/DNA9**). DNA-Konzentrationen: 9 nM, CuSO₄: 10 μM, Ascorbinsäure: 2 mM, MOPS-Puffer, pH 7.5: 10 mM, Mg²⁺: 12.5 mM.

gegen sich die dsDNA als ein effizientes Templat erwies (Abbildung 2B). Interessanterweise ist die Größe der Nanopartikel proportional zur Zahl der Basenpaare in der dsDNA (Abbildung 2 und Abbildung S4).

Die bei der dsDNA-gesteuerten Metallisierung entstehenden Cu-Nanopartikel fluoreszieren ($\lambda_{em} = 587\text{--}600$ nm, $\lambda_{ex} = 340$ nm, Abbildung 3A). In der gleichen spektralen Region emittieren auch metallisches Kupfer^[7] sowie 12 und 30 nm große Cu-Nanopartikel, die durch Poly(*N*-vinylpyrrolidon) in Ethanol stabilisiert sind (600 bzw. 610 nm, $\lambda_{ex} = 337$ nm).^[8] Die dsDNA-gesteuerte Reduktion von Cu²⁺ durch

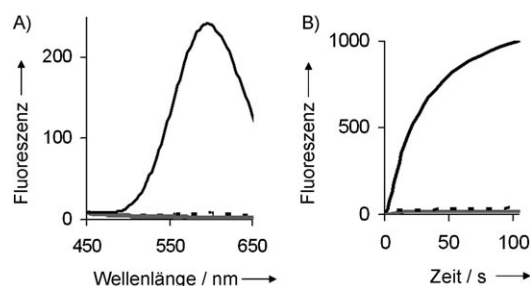


Abbildung 3. A) Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{ex} = 340$ nm) 30 min nach Zugabe von CuSO₄ (100 μM) zu Mischungen aus MOPS (pH 7.5; 10 mM), NaCl (150 mM), Natriumascorbat (1 mM) und entweder **DNA8** (graue Linie), **DNA9** (gestrichelte Linie) oder **DNA8/DNA9**-Doppelstrang (schwarze Linie). DNA-Konzentrationen: 200 nM. B) Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{em} = 600$ nm) nach Zugabe von CuSO₄ zu gepufferten DNA-Lösungen. Linienbeschriftung und Konzentrationen der Reagentien wie in (A).

Ascorbat ist in wenigen Minuten abgeschlossen (Abbildung 3B und Abbildung 4). In Abwesenheit der dsDNA oder in Anwesenheit einer ssDNA werden praktisch keine Nano-

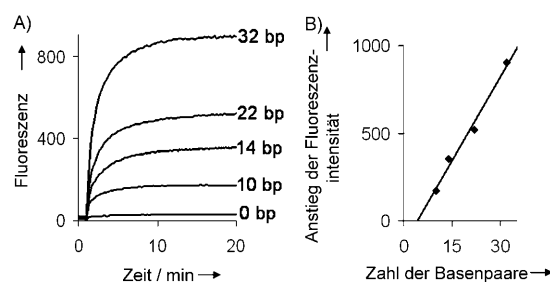


Abbildung 4. A) Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{em} = 600$ nm ($\lambda_{ex} = 340$ nm) nach Zugabe von CuSO₄ (100 μM) zu gepufferten Lösungen (MOPS, pH 7.5, 10 mM; NaCl 150 mM; Natriumascorbat 1 mM) von DNAs (100 nM): 32 bp: **DNA9/DNA10**; 22 bp: **DNA8/DNA9**; 14 bp: **DNA6/DNA7**; 10 bp: **DNA3/DNA5**; 0 bp: **DNA9**. Wir beobachteten, dass **DNA1/DNA2** (9-mere dsDNA) kein Templat für die Nanopartikelbildung ist (Daten nicht gezeigt). B) Anstieg der Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{em} = 600$ nm ($\lambda_{ex} = 340$ nm) nach Zugabe von CuSO₄ (100 μM) zu gepufferten Lösungen von DNAs mit unterschiedlicher Länge.

partikel gebildet (Abbildung 3). So beträgt das Verhältnis $F_{dsDNA}/F_{ssDNA} = 96$, wobei F_{dsDNA} und F_{ssDNA} die Fluoreszenzintensitäten von **DNA8/DNA9** bzw. **DNA8** in der Cu²⁺/Ascorbat-Mischung sind (Abbildung 3A). Ab einer Konzentration von [Cu²⁺] ≥ 100 μM ist das Fluoreszenzsignal, das aus der Metallisierung resultiert, gesättigt (Abbildung S2). Diese Metallionenkonzentration wurde von uns in allen weiteren Versuchen eingesetzt.

Wir bemerkten, dass der Anstieg der Fluoreszenzintensität, der aus der Templat-gesteuerten Bildung von Cu-Nanopartikeln resultiert, mit der Zahl der Basenpaare in den dsDNAs korrelierte (Abbildung 4).

El-Sayed und Mitarbeiter berichteten, dass die Fluoreszenzquantenausbeute von Cu-Nanopartikeln mit deren Größe ansteigt.^[8] Übereinstimmend damit deuten auch unsere Daten darauf hin, dass längere dsDNA-Templates die Bildung von größeren Cu-Nanopartikeln induzieren. Diese Aussage stimmt ebenso mit den AFM-Messungen überein, die für zwei dsDNAs mit unterschiedlicher Länge (ein 14-mer und ein 32-mer) ausgeführt wurden (Abbildung 2 und Abbildung S4).

Selbst bei geringen Konzentrationen von dsDNA ist die Bildung von Cu-Nanopartikeln recht effizient. Die für die Nanopartikel charakteristische Fluoreszenzintensität steigt bereits bei der Zugabe von Ascorbat und Cu²⁺-Ionen zu einer 3.5 nM Lösung einer 22-meren dsDNA (Abbildung S3).

Die Nanopartikelbildung ist sehr empfindlich gegenüber einzelnen Nukleotid-Fehlpaarungen. Zum Beispiel wirken 10-mere dsDNAs (**DNA4a/DNA5** und **DNA4b/DNA5**), die einzelne fehlgepaarte Basenpaare aufweisen (C4→T4- bzw. A5→T5-Mutationen in **DNA4a** bzw. **DNA4b**), nicht länger als Templates für die Nanopartikelbildung (Abbildung 5). Dies ist nicht weiter erstaunlich, da diese DNAs unter unseren Reaktionsbedingungen einzelsträngig vorliegen, wie

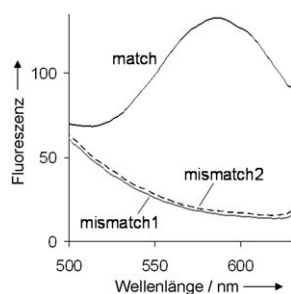


Abbildung 5. Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$) 20 min nach Zugabe von CuSO_4 ($100 \mu\text{M}$) zu einer gepufferten Lösung von DNAs (100 nm) gekennzeichnet als match (**DNA3/DNA5**), mismatch 1 (**DNA4a/DNA5**) und mismatch 2 (**DNA4b/DNA5**). Puffer: MOPS (pH 7.5, 10 mM), NaCl (150 mM), Natriumascorbat (1 mM).

durch UV-Schmelzpunktmessungen bewiesen wurde: kein Schmelzen bei $\geq 22^\circ\text{C}$. Demgegenüber ist der gepaarte Doppelstrang gleicher Größe (**DNA3/DNA5**, $T_m = (40.5 \pm 0.7)^\circ\text{C}$) ein effizientes Templat (Abbildung 5).

In allen vorausgegangenen Untersuchungen von Templat-gesteuerten Metallabscheidungen wurden die DNA-Templat-e erst mit Metallsalzen und anschließend mit reduzierenden Reagentien behandelt.^[2,5] Man wählte diesen Ablauf, da man annahm, dass die anfängliche DNA- Cu^{2+} -Koordination eine Voraussetzung für die selektive Abscheidung von Metall an der Nukleinsäure ist. Wir konnten beobachten, dass dieses Vorgehen unter unseren Bedingungen zu sehr geringen Ausbeuten von Cu-Nanopartikeln führte. Eine effiziente Nanopartikelbildung wurde hingegen beobachtet, wenn CuSO_4 dem Puffer zugesetzt wurde, der bereits ein reduzierendes Mittel (Ascorbat) enthielt (Abbildung 3–5). Dies weist darauf hin, dass die anfängliche Bindung von Cu^{2+} an die DNA die Reaktion eher hemmt, als sie zu fördern. Der Effekt ist nicht überraschend, da die O-Atome der Phosphodiester-Gruppe eher potenzielle Bindungsstellen für Cu^{2+} an der DNA sind als die N- und O-Atome der Nukleobasen. Diese Liganden können als harte (O-Atome) oder mittlere Lewis-Basen (N-Atome) klassifiziert werden. Es ist bekannt, dass diese Liganden Cu^{2+} stabilisieren, was zur Inhibierung der $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^0$ -Transformation führen sollte. Aufgrund dieser Beobachtung dürfen wir annehmen, dass der erste Schritt der Reaktion die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ ist, an die sich die Umsetzung von Cu^+ zu Cu^{2+} und Cu^0 anschließt. Das gebildete Cu^0 wird dann auf der dsDNA gebündelt und bildet so stabile Nanopartikel. Wir fanden auch, dass DNA-Dreifachstränge die Nanopartikelbildung nicht fördern (Abbildung S6). Dies deutet darauf hin, dass die Nanopartikel in der großen Furche der dsDNA, die im Dreifachstrang blockiert ist und in der ssDNA fehlt, akkumulieren. Die Ladung des Doppelstrangs scheint ebenso wichtig zu sein, da ein weniger geladener PNA/DNA-Doppelstrang überhaupt nicht als Templat agiert (Abbildung S5).

Da PNA/DNA-Doppelstränge und DNA-Dreifachstränge nicht als Template für die Nanopartikelbildung fungieren, kann man sie als starre Verbindungen nutzen, um Nanostrukturen mit abwechselnd metallisierten und nichtmetallisierten Bereichen zu erzeugen. Wir haben diese Möglichkeit durch den Aufbau einer (Cu-Nanopartikel/Doppelstrang1)-

Dreifachstrang-(Doppelstrang2/Cu-Nanopartikel)-Einheit bestätigt (Schema 1 und Abbildung S9).

Unsere Methode ist das erste Beispiel für eine selektive Bildung von Metall-Nanopartikeln an einer dsDNA in Lösung. Insbesondere die Tatsache, dass die Größe der Cu-



Schema 1. Struktur einer Nanofunktionseinheit bestehend aus zwei metallisierten DNA-Doppelsträngen, die durch einen starren Dreifachstrang verbunden sind (Cu-Nanopartikel/Doppelstrang1)–Dreifachstrang–(Doppelstrang2/Cu-Nanopartikel).

Nanopartikel über die Länge des dsDNA-Templats gesteuert werden kann, lässt auf vielseitige Anwendungen dieses Verfahrens hoffen. Aufgrund der äußerst selektiven Metallisierung von dsDNAs gegenüber ssDNAs kann die Methode für den Nachweis von dsDNAs durch einfache Fluoreszenzmessung genutzt werden. Des Weiteren ist es möglich, einzelne Fehlpaarungen sehr effizient nachzuweisen. Die Methode hat das Potenzial, für die Metallisierung komplexerer DNA-Nanostrukturen eingesetzt zu werden. Untersuchungen zur selektiven Metallisierung von oberflächenimmobilisierten DNA-Origami, die einzelsträngige Domänen enthalten, sind Gegenstand unserer aktuellen Forschung. Zukünftige Studien werden zeigen, ob die Selektivität des Metallisierungsprozesses genutzt werden kann, um Halbleiterschaltkreise auf der Grundlage metallisierter DNA herzustellen.

Eingegangen am 23. Dezember 2009,
veränderte Fassung am 8. März 2010
Online veröffentlicht am 13. Juli 2010

Stichwörter: DNA · Fluoreszenz · Kupfer · Metallisierung · Nanopartikel

- [1] a) N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427–431; b) C. X. Lin, Y. Liu, S. Rinker, H. Yan, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 1641–1647; c) P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302; d) N. C. Seeman, *Mol. Biotechnol.* **2007**, *37*, 246–257; e) K. V. Gothelf, T. H. LaBean, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4023–4037.
- [2] Eine aktuelle Übersicht zur DNA-Metallisierung: a) H. A. Becerril, A. T. Woolley, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 329–337; ausgewählte Arbeiten zur Abscheidung von Metallen auf DNA: Gold: b) L. A. Stearns, R. Chhabra, J. Sharma, Y. Liu, W. T. Petuskey, H. Yan, J. C. Chaput, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8646–8648; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8494–8496; Palladium: c) J. Richter, R. Seidel, R. Kirsch, M. Mertig, W. Pompe, J. Plachke, H. K. Schackert, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 507–510; Platin: d) R. Seidel, L. Colombi Ciacchi, M. Weigel, W. Pompe, M. Mertig, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 10801–10811; Silber: e) L. Berti, A. Alessandrini, P. Facci, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11216–11217; f) E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, *391*, 775–778; g) A. A. Zinchenko, K. Yoshikawa, D. Baigl, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2820–2823; eine aktuelle Übersicht zur Herstellung von Halbleiternanomaterialien auf DNA-Templaten: h) A. Houlton, A. R. Pike, M. A. Galindo, B. R. Horrocks, *Chem. Commun.* **2009**, 1797–1806.

- [3] a) C. F. Monson, A. T. Woolley, *Nano Lett.* **2003**, 3, 359–363; b) H. A. Becerril, R. M. Stoltenberg, C. F. Monson, A. T. Woolley, *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 611–616; c) H. A. Becerril, R. M. Stoltenberg, D. R. Wheeler, R. C. Davis, J. N. Harb, A. T. Woolley, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2828–2829.
- [4] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, *Science* **2002**, 297, 72–75.
- [5] Übersichten über Metallionen-modifizierte DNA-Doppelstränge: a) K. Tanaka, M. Shinoya, *Coord. Chem. Rev.* **2007**, 251, 2732–2742; b) G. H. Clever, C. Kaul, T. Carell, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 6340–6350; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6226–6236; c) J. Müller, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 3749–3763.
- [6] a) M. H. Zareie, G. Erdem, C. Oner, R. Oner, A. Ogus, E. Piskin, *Biol. Macromol.* **1996**, 19, 69–73; b) D. C. A. John, K. T. Douglas, *Transition Met. Chem.* **1996**, 21, 460–463.
- [7] A. Mooradian, *Phys. Rev. Lett.* **1969**, 22, 185–187.
- [8] Q. Darugar, W. Qian, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 143–149.
-