

Antrieb eines oberflächengebundenen DNA-Schalters mit einem chemischen Oszillator**

Tim Liedl, Michael Olapinski und Friedrich C. Simmel*

Die Herstellung von sich unabhängig bewegenden molekularen Strukturen ist eine der zentralen Herausforderungen auf dem Gebiet der DNA-Nanomaschinen.^[1] Einige der in letzter Zeit vorgestellten Konzepte nutzen das sequenzabhängige katalytische Verhalten von Restriktionsendonukleasen,^[2] in anderen Fällen werden Desoxyribozymsequenzen in die DNA-Strukturen eingefügt und die katalytische Wirkung von DNA selbst genutzt.^[3] Auf dieser Basis wurden unter anderem auch autonome molekulare Computer realisiert.^[4] In einem weiteren Ansatz wird die DNA-Hybridisierung durch Sekundärstrukturbildung kontrolliert gehemmt oder durch katalysierend wirkende DNA-Stränge beschleunigt.^[5] All diesen Strategien ist gemeinsam, dass die unabhängige Bewegung der DNA-Strukturen durch eine DNA-Hybridisierung getrieben wird. Von unserer Gruppe wurde kürzlich ein anderer Ansatz vorgestellt,^[6] in dem wir zeigen konnten, dass der pH-abhängige Übergang eines Cytosin-reichen DNA-Stranges von einer zufälligen Konformation zum so genannten „i-Motiv“ durch einen chemischen pH-Oszillator getrieben werden kann. In diesem System wird die zeitliche Aufeinanderfolge der Konformationen der DNA-Struktur nicht durch einen externen Operator bestimmt, sondern durch ein nichtlineares dynamisches System. Wir zeigen hier, wie dieses System durch die Anbindung des DNA-Schalters an eine feste Oberfläche signifikant verbessert werden konnte. Durch die Fixierung der DNA-Struktur auf einem Glas-Chip kann der Oszillator nun in einem Durchflussreaktor (continuous flow stirred tank reactor, CSTR) betrieben werden. In einem solchen Aufbau kann die oberflächengebundene DNA-Struktur im Prinzip unendlich viele autonome Schaltzyklen durchlaufen.

Beim oben erwähnten Ansatz^[6] wurde eine Variante der Landolt-Reaktion verwendet, bei der der pH-Wert in einem kontinuierlich befüllten Reaktor periodisch oszilliert. Um die DNA-Stränge während der Reaktion nicht auszuspülen, musste ein Reaktor ohne Auslass verwendet werden. In

einem solchen Aufbau kann aber kein Gleichgewichtszustand erreicht werden, da sich die mittleren Konzentrationen der Reagentien im Reaktor ständig ändern. Mit der Zeit werden die Systemparameter aus dem oszillierenden Bereich gedrängt, und die Oszillationen verschwinden nach wenigen Perioden.

Ein wesentlich verbesserter Aufbau besteht aus einem Durchflussreaktor, der über zwei Einlässe und einen Auslass verfügt. Durch kontinuierliches Befüllen und gleichzeitiges Entfernen von Abfallprodukten können im Prinzip unendlich viele homogene pH-Oszillationen erzeugt werden. Um jedoch die DNA-Schalter nicht durch den Auslass zu verlieren, müssen sie im Reaktor immobilisiert werden. Für diese Experimente verwendeten wir DNA-Stränge, die an einem Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff modifiziert und am anderen Ende über eine Thiolgruppe an eine sehr dünne, transparente Goldschicht angebunden wurden. Auf diese Weise wurde eine kovalente Anbindung der DNA an die Oberfläche erreicht, und gleichzeitig konnten die Konformationsänderungen der DNA-Struktur über den Energietransfer zwischen dem Farbstoff und der Goldoberfläche^[7] verfolgt werden.

Abbildung 1 a enthält eine schematische Darstellung des oberflächengebundenen DNA-Schalters in seinen beiden

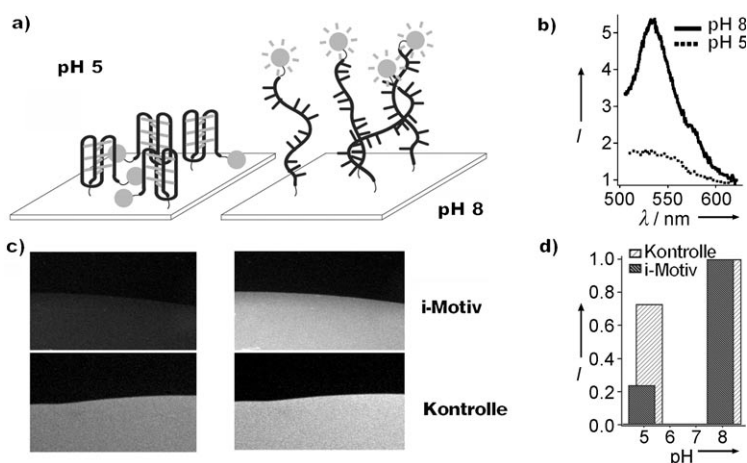


Abbildung 1. a) Schema des einsträngigen DNA-Schalters, der über einen 5'-Thiol- C_6 -Spacer an eine Gold/Glasoberfläche gebunden ist. Bei niedrigen pH-Werten bildet sich das i-Motiv, wodurch der am 3'-Ende befestigte Farbstoff nahe an die Oberfläche gebracht und gelöscht wird. Bei höheren pH-Werten öffnet sich der DNA-Strang zu einer Zufallsstruktur und die Fluoreszenz nimmt zu. b) Emissionsspektren des oberflächengebundenen DNA-Stranges bei pH 5 (i-Motiv) und pH 8 (Zufallskonformation). c) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des i-Motiv-Stranges (oben) und eines Kontrollstranges (unten) bei pH 5 (links) und pH 8 (rechts). d) Zugehörige normierte Fluoreszenzintensitäten.

Zuständen bei hohen und niedrigen pH-Werten. Die Schalter bestehen aus 21 Nucleotide (nt) langen DNA-Strängen der Sequenz 5'-CCCTAACCCTAACCCTAACCC-3' (Strang M). Unterhalb pH 6.5 gehen DNA-Moleküle dieser Sequenz in das i-Motiv über, bei dem vier DNA-Stränge durch eine Anzahl halbprotonierter $C-C^+$ -Basenpaare zusammengehalten werden. In vorliegendem Fall handelt es sich um sechs intramolekulare $C-C^+$ -Paare. Die gleiche DNA-Sequenz

[*] T. Liedl, M. Olapinski, Dr. F. C. Simmel
Department für Physik und Zentrum für Nanowissenschaften
Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschwister-Scholl-Platz 1, 80539 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-3182
E-Mail: simmel@lmu.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (Emmy Noether-Projekt DFG SI 761/2-2). T.L. und M.O. werden durch die LMU International Graduate School „Nanobiotechnology“ unterstützt.

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

wurde schon früher zur Herstellung DNA-basierter Nanostrukturen verwendet,^[8] und auch wir verwendeten sie in der vorangegangenen Arbeit.^[6] Der DNA-Strang wurde mit einem Thiol- C_6 -Spacer am 5'-Ende und dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamine Green (RG) am 3'-Ende modifiziert. Die Fluoreszenz von RG ist zwischen pH 4 und 9 pH-unempfindlich (siehe Hintergrundinformationen). Bei niedrigen pH-Werten befinden sich das 3'- und das 5'-Ende des Stranges aufgrund der Struktur des i-Motivs in unmittelbarer Nähe zueinander (ca. 1.5 nm).^[9] Wenn das 5'-Ende der DNA-Struktur an eine Oberfläche gebunden ist, bringt dies den Farbstoff am 3'-Ende daher in die Nähe des Substrats.

Als Substrat wurde ein Glas-Chip mit einer sehr dünnen Goldschicht verwendet. Zur Herstellung des Substrats wurde zunächst eine dünne Schicht Gold auf ein gesäubertes Glasplättchen gedampft und dann durch Ar-Ionen-Sputtern fast vollständig entfernt (experimentelle Details in den Hintergrundinformationen). Das Substrat ist dann fast vollkommen durchsichtig, wobei aber eine kovalente Bindung der DNA-Stränge an das verbleibende Gold auf der Oberfläche möglich ist (Hintergrundinformationen). Die modifizierten Glas-Chips wurden auf einem Epifluoreszenzmikroskop montiert und abwechselnd mit Phosphatpuffer von pH 5 und pH 8 gespült. Gleichzeitig wurde die Fluoreszenz aufgenommen. Mit dem Schalten der DNA-Stränge zwischen einer Zufallsstruktur bei hohen pH-Werten und dem i-Motiv bei niedrigen pH-Werten geht eine starke Änderung der Fluoreszenzintensität einher (Abbildung 1 c,d). Diese deutlichen Änderungen der Intensität wurden nur an Stellen auf dem Substrat beobachtet, an denen der i-Motiv-Strang angebracht war. An Stellen, die mit einem Kontrollstrang einer zufälligen Sequenz modifiziert waren, war nur eine geringe Änderung der Intensität festzustellen.

Für Fluoreszenzspektroskopie und Energietransfermessungen wurde ein modifiziertes Fluoreszenzspektrometer verwendet, das auch die Charakterisierung der Probe im laufenden Oszillator-experiment ermöglichte. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 2 gezeigt. Fluoreszenzspektren der oberflächengebundenen i-Motiv-DNA bei niedrigen und hohen pH-Werten sind Abbildung 1 b dargestellt.

Zur Erzeugung regelmäßiger pH-Oszillationen wurden zwei unterschiedliche Lösungen mit einer Pumpgeschwindigkeit von $150 \mu\text{L min}^{-1}$ in eine Küvette gepumpt, die zu Beginn mit 20 mL H_2O gefüllt war. Eine Lösung enthielt 19 mM NaIO_3 , während die andere 30 mM Na_2SO_3 , 21 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ und 5 mM H_2SO_4 enthielt. Eine zweite Pumpe pumpte das entstehende überschüssige Volumen mit $300 \mu\text{L min}^{-1}$ ab. Üblicherweise begann der pH-Wert nach etwa vier Stunden zwischen pH 6.3 und pH 5.5 mit einer Periode von 20 min zu oszillieren. Die Oszillationen ließen erst nach, nachdem die Reservoirs der beiden zugeführten Lösungen erschöpft waren (typischerweise 24 h).

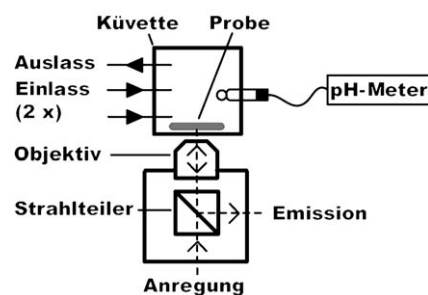


Abbildung 2. Aufbau der Messanordnung: Das aus einem Fluoreszenzspektrometer kommende Anregungslicht wird durch ein Objektiv mit großem Arbeitsabstand auf die Probe fokussiert. Das emittierte Licht wird durch dasselbe Objektiv gesammelt und über einen Strahlteiler wieder in das Spektrometer gelenkt. Das Probeplättchen ist in der Innenseite eines Durchflussreaktors befestigt. Dieser besteht aus einer großvolumigen Fluoreszenzküvette ($V=25 \text{ mL}$) sowie zwei Einlässen und einem Auslass für die Reagentien. Der pH-Wert wird mit einem konventionellen pH-Meter aufgezeichnet.

Abbildung 3 zeigt die von oberflächengebundenen DNA-Schaltern stammende Fluoreszenzintensität zusammen mit dem zugehörigen, oszillierenden pH-Wert. Die starken Os-

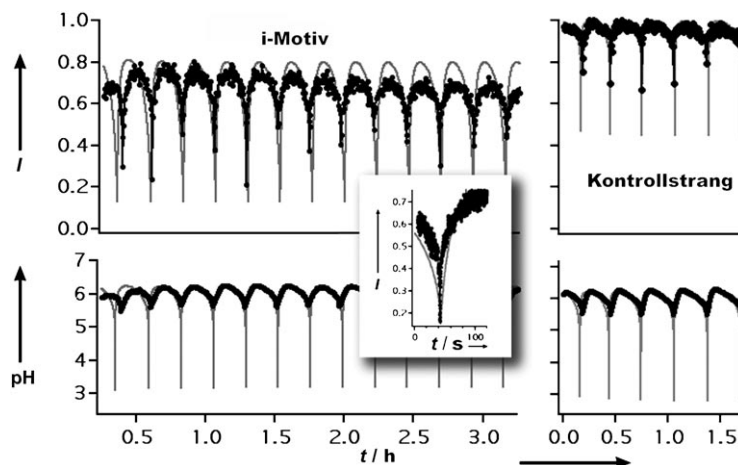


Abbildung 3. Linke Seite: Im CSTR-Aufbau kann eine große Zahl regelmäßiger pH-Oszillationen erzeugt werden (unten, schwarze Kurve). Die gleichzeitig aufgenommene, von dem immobilisierten i-Motiv stammende Fluoreszenz folgt den pH-Oszillationen (oben, schwarze Kurve). Die simulierten pH-Werte (unten, graue Kurve) stimmen gut mit den gemessenen Werten überein. Die Abweichung bei den tiefen pH-Zacken ist auf das langsame Ansprechen des pH-Meters zurückzuführen. Die simulierte Fluoreszenzkurve im oberen Graph (grau) ist mit den Daten eines Titrationsexperiments (Hintergrundinformationen) errechnet worden. Einschub: In einem Experiment mit höherer Zeitaufösung wird deutlich, dass an den Positionen der tiefen pH-Zacken die Fluoreszenz, wie aus der Simulation erwartet, auf 20% ihres Maximalwertes abfällt. Rechte Seite: Gemessene (unten, schwarze Kurve) und simulierte pH-Oszillationen (unten, graue Kurve) und zugehörige Fluoreszenzintensität (oben, schwarze Kurve: experimentelle Daten, graue Kurve: errechnete Werte) der Kontrollstränge. Die Fluoreszenzintensität ist für den i-Motiv-Strang und den Kontrollstrang auf den Maximalwert bei pH 7.4 normiert. Unter den Oszillationsbedingungen ist das i-Motiv ständig zumindest teilweise ausgebildet, was zu einem insgesamt leicht reduzierten Fluoreszenzsignal führt. Das Fluoreszenzverhalten der beiden Stränge ist in völliger Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Titrationsexperimenten (Hintergrundinformationen). Das zeigt, dass die DNA-Stränge sich im Durchflussreaktor genauso verhalten wie unter normalen Pufferbedingungen. Das Fluoreszenzverhalten des DNA-Schalters ist mit dem Übergang zum i-Motiv konsistent, während der Kontrollstrang dieses Verhalten nicht zeigt.

zillationen der Fluoreszenz in Übereinstimmung mit dem pH-Wert weisen darauf hin, dass die Konformationsänderung durch die chemische Oszillation erzwungen wird. Um zu überprüfen, ob die Oszillationen der Fluoreszenzintensität tatsächlich durch den Übergang der DNA-Struktur zum i-Motiv und wieder zurück hervorgerufen werden, führten wir eine Reihe von Kontrollexperimenten durch. Ein einfaches Titrationsexperiment belegt, dass die immobilisierten DNA-Schalter wie erwartet ihre Konformation ändern, sobald der pH-Wert unter etwa 6.5 fällt (Hintergrundinformationen). Dasselbe Verhalten lässt sich erkennen, wenn man die während der pH-Oszillationen im Durchflussreaktor gemessenen Fluoreszenzintensitäten über dem pH-Wert aufträgt (Hintergrundinformationen). Ein immobilisierter Kontrollstrang reagiert demgegenüber deutlich schwächer auf den pH-Wert und zeigt insbesondere keinen Übergang bei pH 6. Entsprechend ist auch unter dem Einfluss des Oszillators eine andere Fluoreszenzabhängigkeit zu sehen (Abbildung 3). Die Fluoreszenz des Kontrollstranges fällt nur auf ungefähr 50 % ihres Maximalwertes, während sie beim DNA-Schalter auf unter 20 % sinkt. Beide Fluoreszenzkurven sind mit denen aus den einfachen Titrationsexperimenten völlig konsistent. Dies weist darauf hin, dass die immobilisierten DNA-Moleküle unter Einfluss des Oszillators dieselben Konformationsänderungen wie unter Titrationsbedingungen durchlaufen. Unter pH 4 spiegelt die Fluoreszenzintensität vermutlich auch andere Einflüsse als die der reinen Konformationsänderungen wider (Hintergrundinformationen).

In Abbildung 3 sind auch simulierte pH-Oszillationen dargestellt, die auf einem von Rabai und Beck entwickelten Modell beruhen.^[10] Über pH 5.5 stimmen die experimentellen Daten mit denen des Modells gut überein. Das Modell sagt aber auch kurze Ausflüge zu niedrigeren pH-Werten von ungefähr 3 voraus. Diese Werte werden im Experiment in der Tat erreicht, nur können sie wegen ihrer kurzen Dauer ($t_{1/2} \approx 2$ s) von unserem pH-Meter, dessen Ansprechzeit etwa 30 s beträgt, nicht aufgelöst werden. Aus diesem Grund kontrollierten wir das Verhalten des Oszillators mit dem pH-abhängigen Farbstoff Methylorange, dessen Farbe unterhalb pH 4.4 von gelb zu rosa wechselt.^[10] Tatsächlich kann dieser Farbumschlag für Bruchteile einer Sekunde an den durch das Modell vorhergesagten Positionen beobachtet werden. Zum Vergleich enthalten die oberen Graphen von Abbildung 3 Intensitätskurven, die aus den simulierten pH-Werten und den Titrationskurven des Schalterstranges und des Kontrollstranges berechnet wurden. Die experimentellen Intensitäten stimmen gut mit den simulierten Werten überein, nur dass die experimentellen Kurven wieder nicht den tiefen Intensitätszacken folgen. Das lässt sich folgendermaßen erklären: Um ein Ausbleichen der Farbstoffe während der langen Messungen zu vermeiden, wurde nur eine begrenzte Zahl Datenpunkte aufgenommen, die zu weit auseinander liegen, um die kurzen Intensitätsminima aufzulösen. Der Einschub in Abbildung 3 zeigt eine Fluoreszenzkurve, die bei einer höheren Zeitauflösung aufgenommen wurde. Diese Werte stimmen sehr gut mit den vorhergesagten Werten überein, was wiederum darauf hinweist, dass die Ansprechzeit der immobilisierten DNA-Schalter in der Größenordnung einer Sekunde liegt.

Dass die oberflächengebundenen DNA-Stränge tatsächlich die Form des i-Motivs annehmen, kann weiter durch temperaturabhängige Messungen bestätigt werden: Für immobilisierte DNA-Schalter erkennt man einen scharfen Schmelzübergang, wohingegen der Kontrollstrang keinen derartigen Übergang zeigt (Abbildung 4). Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Circular dichroismus-Messungen überein.^[11]

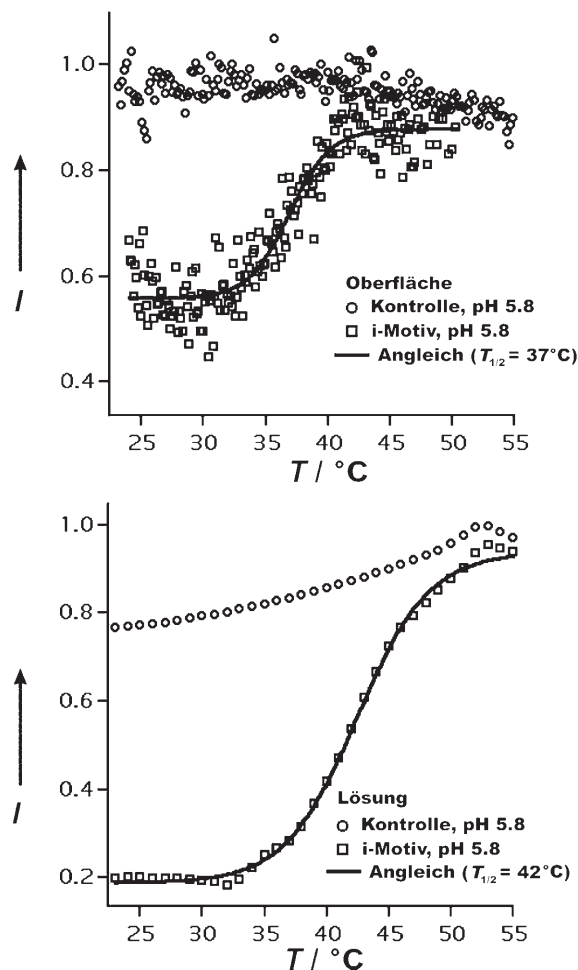


Abbildung 4. Fluoreszenzintensitäten des i-Motivs und des Kontrollstranges während eines Schmelzkurvenexperiments bei pH 5.8 und Vergleich immobilisierter und gelöster DNA-Schalter. Oben: Das oberflächengebundene i-Motiv entfaltet bei 37°C, während der oberflächengebundene Kontrollstrang keine Fluoreszenzänderung zeigt. Unten: Für das Experiment in Lösung wurde der i-Motiv-Strang mit einem Farbstoff an einem Ende und einem Fluoreszenzlöcher am anderen Ende modifiziert.^[6] Dieser Strang zeigt im Wesentlichen das gleiche Verhalten und entfaltet bei einer etwas höheren Temperatur als der immobilisierte Strang. Ein Kontrollstrang zeigt in Lösung nur eine geringe Temperaturabhängigkeit.

Eine auf einem Glas-Chip immobilisierte DNA-basierte molekulare Struktur konnte durch chemische Oszillationen zwischen zwei Konformationen hin- und hergeschaltet werden. Diese in einem Durchflussreaktor erzeugten Oszillationen sind sehr regelmäßig und können im Prinzip unendlich lange aufrechterhalten werden. Zur experimentellen

Realisierung dieses molekularen Schalters wurde die DNA-Struktur auf einer sehr dünnen Goldschicht immobilisiert und konnte so in einem Durchflussreaktor mit einem Epifluoreszenzaufbau charakterisiert werden. Dieses System ist das erste Beispiel eines autonom getriebenen, oberflächengebundenen DNA-Schalters. In einer aktuellen Studie von Shu et al.^[8b] wurde gezeigt, dass eine auf dem i-Motiv beruhende immobilisierte DNA-Struktur unter Verbrauch von H⁺-Ionen zyklisch Kraft erzeugen und somit auch als periodisch arbeitender Motor angesehen werden kann. Solche und ähnliche Systeme könnten daher Anwendung als Aktuatoren oder Sensoren in hybriden Nanostrukturen finden. Unter dem Einfluss von chemischen Reaktionswellen könnten oberflächengebundene DNA-Schalter sogar Raum-Zeit-Muster und Oszillationen zeigen.

Eingegangen am 26. Januar 2006,
veränderte Fassung am 6. April 2006
Online veröffentlicht am 29. Juni 2006

Stichwörter: Chemische Oszillationen · DNA · Molekulare Schalter · Nanotechnologie

- [1] a) N. C. Seeman, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 119–125; b) F. C. Simmel, W. U. Dittmer, *Small* **2005**, *1*, 284–299.
- [2] a) P. Yin, H. Yan, X. G. Daniell, A. J. Turberfield, J. H. Reif, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5014–5019; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4906–4911; b) J. Bath, S. J. Green, A. J. Turberfield, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4432–4435; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4358–4361.
- [3] a) Y. Chen, M. S. Wang, C. D. Mao, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3638–3641; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3554–3557; b) Y. Tian, Y. He, Y. Chen, P. Yin, C. D. Mao, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4429–4432; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4355–4358.
- [4] a) Y. Benenson, T. Paz-Elizur, R. Adar, E. Keinan, Z. Livneh, E. Shapiro, *Nature* **2001**, *414*, 430–434; b) M. N. Stojanovic, D. Stefanovic, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1069–1074.
- [5] A. J. Turberfield, J. C. Mitchell, B. Yurke, A. P. Mills, M. I. Blakey, F. C. Simmel, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 118102.
- [6] T. Liedl, F. C. Simmel, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1894–1898.
- [7] a) B. Dubertret, M. Calame, A. J. Libchaber, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 365–370; b) H. Du, M. D. Disney, B. L. Miller, T. D. Krauss, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4012–4013; c) C. S. Yun, A. Javier, T. Jennings, M. Fisher, S. Hira, S. Peterson, B. Hopkins, N. O. Reich, G. F. Strouse, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3115–3119.
- [8] a) D. S. Liu, S. Balasubramanian, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5912–5914; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5734–5736; b) W. M. Shu, D. S. Liu, M. Watari, C. K. Riemer, T. Strunz, M. E. Welland, S. Balasubramanian, R. A. McKendry, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17054–17060; c) D. Liu, A. Bruckbauer, C. Abell, S. Balasubramanian, D. Kang, D. Klenerman, D. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2067–2071.
- [9] K. Gehring, J. L. Leroy, M. Gueron, *Nature* **1993**, *363*, 561–565.
- [10] a) G. Rabai, M. T. Beck, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 2804–2807; b) G. Rabai, M. T. Beck, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 4831–4835.
- [11] G. Manzi, N. Yathindra, L. E. Xodo, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4634–4640.