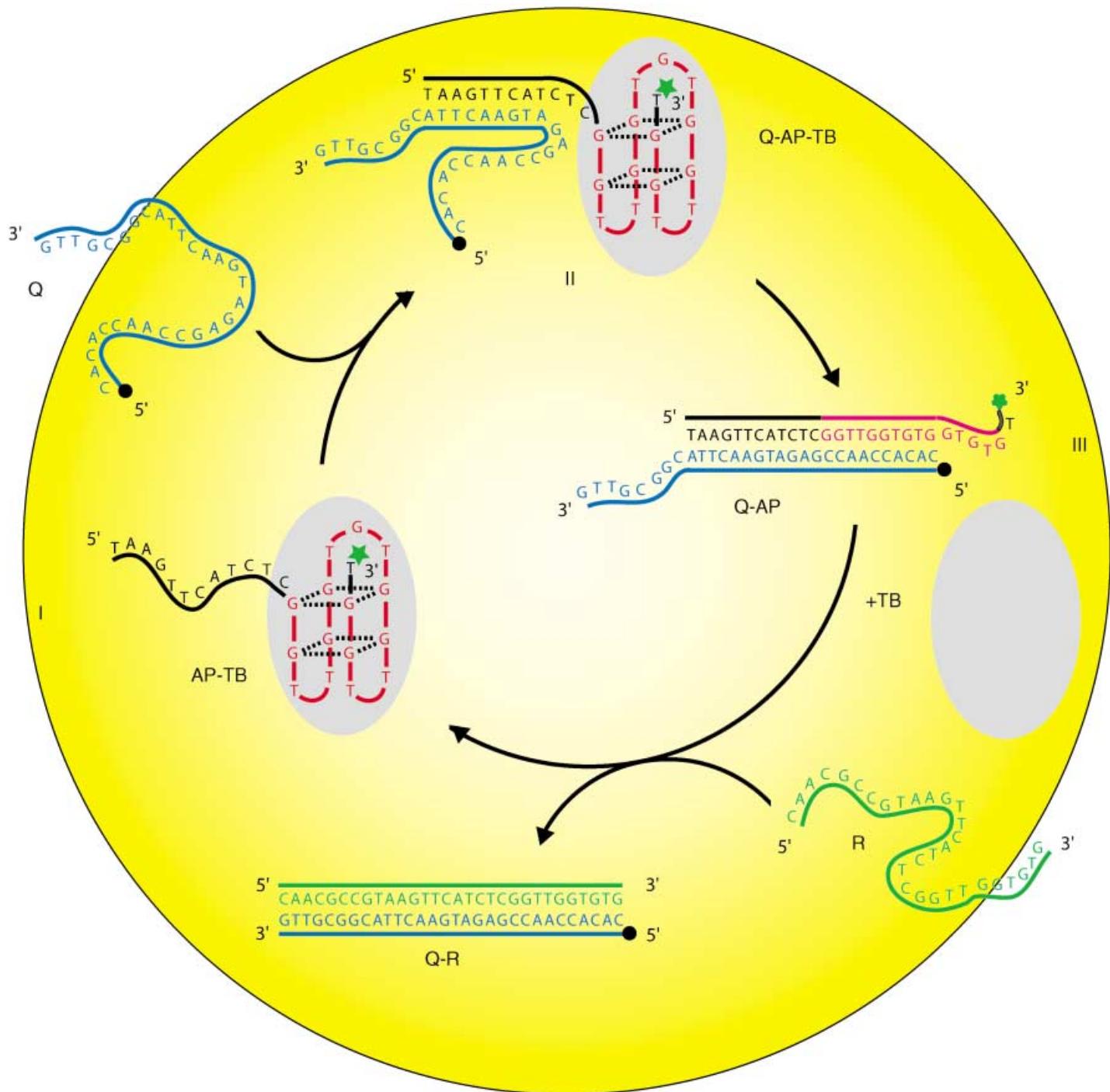


Zuschriften



In der Zuschrift von F. C. Simmel et al. auf den Folgeseiten wird eine molekulare Maschine vorgestellt, die auf einem DNA-Aptamer basiert und die angewiesen werden kann, ein Protein wiederholt zu binden und freizulassen.

Eine DNA-basierte Maschine, die Thrombin abwechselnd binden und wieder freigeben kann^{**}

Wendy U. Dittmer, Andreas Reuter und Friedrich C. Simmel*

Molekulare Maschinen können kontrollierte nanoskopische Bewegungen erzeugen.^[1] Besonders die einzigartigen molekularen Erkennungseigenschaften von DNA wurden bereits mehrfach dazu verwendet, nanomechanische Strukturen zu erzeugen, die reversibel zwischen verschiedenen Konforma-

tionen umgeschaltet werden können.^[2] Obwohl diese Strukturen viele rotatorische oder dehnungsartige Bewegungen vollziehen,^[3,4] erfüllten sie bislang keine spezielle Funktion. DNA-Strukturen mit Funktionalität hingegen findet man bei DNA-Aptameren, kurzen Abschnitten einzelsträngiger DNA, die aus einem Zufallspool von DNA-Sequenzen wegen ihrer Bindungsstärke zu Proteinen oder kleinen Molekülen ausgewählt wurden.^[5] Hier berichten wir über die Konstruktion einer proteinbindenden molekularen Maschine, die auf einem DNA-Aptamer basiert. Sie kann angewiesen werden, abhängig von einer DNA-Steuersequenz den menschlichen Blutgerinnungsfaktor α -Thrombin (TB) zu greifen oder wieder loszulassen. Beim Betrieb dieser DNA-Nanomaschine wird das TB-bindende DNA-Aptamer mechanisch zwischen einer

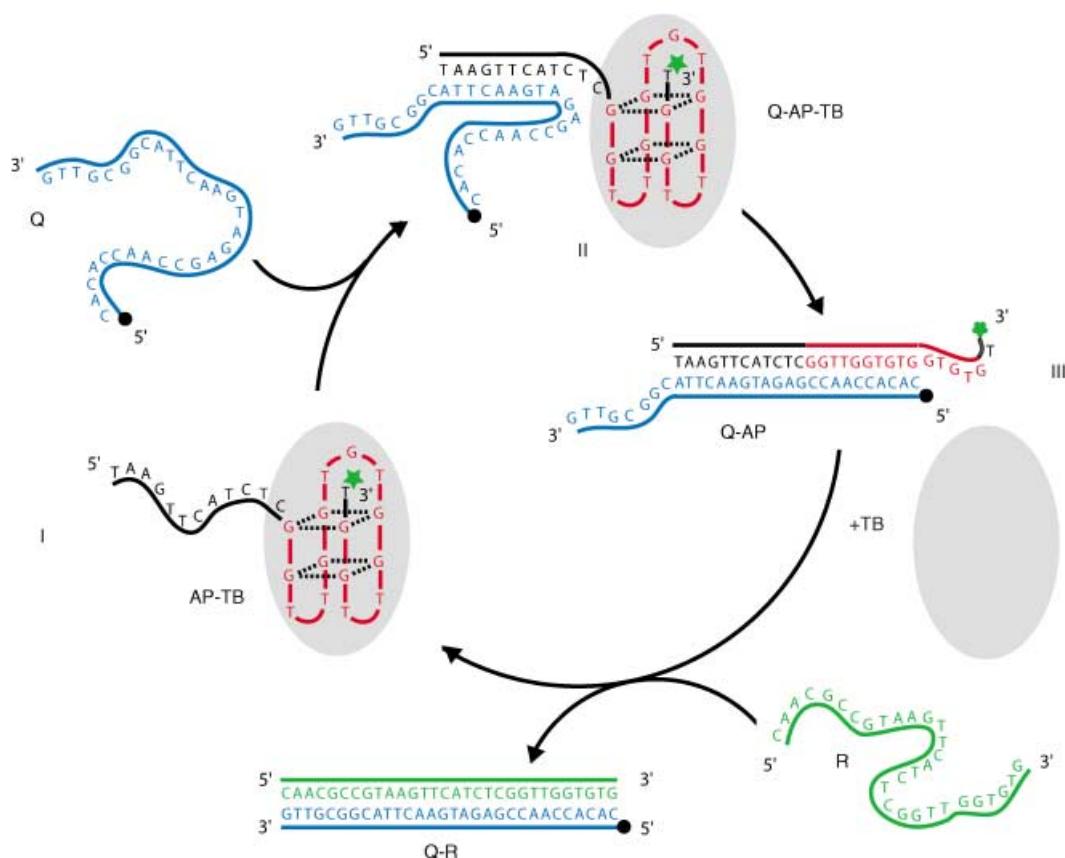


Abbildung 1. Operationszyklus der aptamerbasierten molekularen Maschine in Gegenwart von TB. Die Sequenzen der fluoreszenzmarkierten Stränge AP3, Q5 und R sind angegeben.

[*] Dr. W. U. Dittmer, A. Reuter, Dr. F. C. Simmel
Sektion Physik und Center for NanoScience

LMU München

Geschwister-Scholl-Platz 1

80539 München (Deutschland)

Fax: (+49) 89-2180-3182

E-mail: simmel@lmu.de

[**] Wir danken Prof. Dr. John S. McCaskill für hilfreiche Diskussionen und Prof. Dr. Jörg P. Kotthaus für kontinuierliche Unterstützung. Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Bayerischen Staatsministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst und der Alexander von Humboldt-Stiftung.

bindenden und einer nichtbindenden Form umgeschaltet. Die Funktion dieser „molekularen Hand“ wird in Gelelektrophorese-Experimenten sowie mit Fluoreszenzresonanz-Energieübertragung (FRET) und Fluoreszenzanisotropie-Messungen demonstriert.

Die Maschine basiert auf der 15-Basen-DNA-Sequenz 5'-GGTTGGTGTGGTGG-3', die mit einer Dissoziationskonstante von 3–450 nm^[7] stark an α -TB bindet.^[6] In Gegenwart von Kaliumionen nimmt dieses Aptamer eine Konformation ein, die durch zwei aufeinander gestapelte Guanin-Quadruplexstrukturen charakterisiert ist (Abbildung 1). Um die Maschine zu konstruieren, wurde dem Aptamer am 5'-Ende

eine zwölf Basen lange „Haltepunkt“-Sektion hinzugefügt, mit der die Maschine angesteuert werden kann. Das 5'-Ende wurde gewählt, um nicht mit TB-Bindungsstellen in Konflikt zu geraten.^[8] Durch Schmelzkurvenexperimente, in denen der Temperaturverlauf der Absorption gemessen wurde, wurde überprüft, dass die Aptamermaschine (AP) in Gegenwart von Kaliumionen tatsächlich ihre G-Quartettstruktur annimmt.^[9] Der Arbeitszyklus der Maschine ist in Abbildung 1 dargestellt. Nach Zugabe von TB bindet Strang AP an das Protein ((I) in Abbildung 1). Durch Zugabe eines „öffnenden“ Stranges Q streckt sich die DNA-Maschine zur Duplex-Struktur AP-Q (III) aus, die TB nicht mehr binden kann. Q ist komplementär zur Haltepunktsektion sowie den ersten 10 Basen der Aptamersequenz und hat zusätzlich eine 8 Basen lange Sequenz am 3'-Ende, die als Angriffspunkt für den vollständig komplementären „Entfernungsstrang“ R dient. Dies ist das fundamentale Operationsprinzip, nach dem DNA-Maschinen ihre unterschiedlichen Konformationen durchlaufen.^[4] Q wurde nicht vollständig komplementär zu AP gewählt, da R sonst die gesamte Aptamersequenz enthalten würde und selbst TB binden könnte. Die Ablösung von Q durch R versetzt die Maschine in ihre Ausgangskonformation (I) zurück, in der sie erneut TB bindet.

Der Arbeitszyklus der Maschine wurde in einem elektrophoretischen Bandenverschiebungsexperiment beobachtet (Abbildung 2). Aus der Bindung von AP (Spalte a) an TB

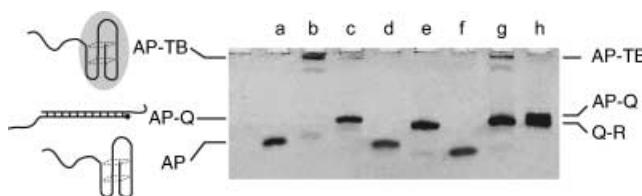


Abbildung 2. Gelnachweis der Funktion der DNA-Maschine. Die Spalten enthalten: a) AP, b) AP+TB, c) (AP+TB)+Q, d) Q, e) Q+R, f) R, g) ((AP+TB)+Q)+R, h) (((AP+TB)+Q)+R)+Q. Die Paare in Klammern wurden 1 h inkubiert, bevor die nächste Komponente zugegeben wurde. In den Hybridisierungsreaktionen hat jedes Oligonukleotid eine Konzentration von 1 μ M. Humanes α -TB (Fluka) wurde im Verhältnis 10 Protein:1 Aptamer zugegeben. Wegen der höheren Fluoreszenzintensität des Gelfärbemittels bei der Bindung an DNA-Doppelstränge wurde die Gesamtmenge an DNA, die auf die Bahnen c, e, g und h gegeben wurde, angepasst, um eine gleichmäßige Intensität der Bänder ohne starke Verbreiterung oder Verschmieren zu erhalten. Auf Bahn g wurde nur 60% der Menge an Strang A wie auf Bahn b gegeben, was die geringere Intensität des Aptamer-TB-Komplexes in dieser Bahn erklärt.

resultiert eine deutlich höhermolekulare korrespondierende Bande (Spalte b). Bei Zugabe von Q wird TB von AP freigegeben und eine Bande erscheint für den Doppelstrang AP-Q (Spalte c). Nach Zugabe von R wird AP freigesetzt und kann TB erneut binden (Spalte g). Das kann aus dem Wiederauftauchen der Bande AP-TB und einer zweiten Bande aus dem „Abfallprodukt“ Q-R geschlossen werden. Die Spalten b und g enthalten eine zusätzliche, schwache Bande direkt unter der AP-TB-Bande, deren Intensität von einer TB-Probe zur anderen variiert und mit dem Alter der TB-Proben zunimmt. Wir führen die Bande auf eine Verun-

reinigung der TB-Lösung oder ein TB-Zerfallsprodukt zurück, an das das Aptamer ebenfalls binden kann. In Spalte h setzt weitere Zugabe von Q erneut TB frei und zwei nahe beieinander liegende Banden erscheinen für den Doppelstrang AP-Q und das Abfallprodukt aus dem vorangegangenen Schritt. Die Gelexperimente zeigen, dass die Aptamermaschine mehrfach zwischen ihren zwei Konformationen hin- und hergeschaltet werden kann und zyklisch TB bindet und freigibt.

Um das Funktionieren der Aptamermaschine in Echtzeit zu verfolgen, wurden FRET-Experimente durchgeführt. FRET ist der strahlungslose Transfer der Anregungsenergie von einem „Donor“-Fluorophor auf ein „Acceptor“-Chromophor, dessen Absorptionsspektrum mit dem Emissionspektrum des Donors überlappt. Die Effizienz dieses Prozesses hängt stark vom Abstand zwischen den beiden Farbstoffen ab, daher kann die räumliche Nähe entsprechend markierter Moleküle bestimmt werden.^[10] Unter Nutzung von FRET wurden bereits einige Sensoren auf der Grundlage von Aptameren konstruiert.^[7,11] Wir setzten FRET ein, um die Konformationsänderungen der DNA-Maschine zu verfolgen, die beim Binden und der Freigabe von TB stattfinden. In Abbildung 3 sind Ergebnisse von FRET-Experimenten

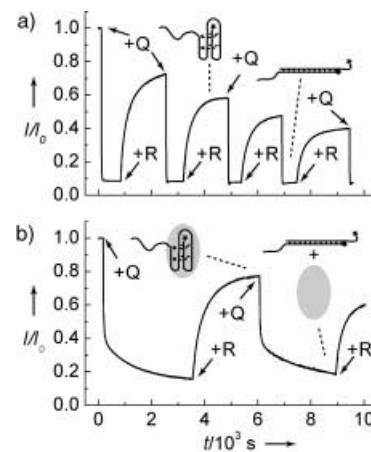


Abbildung 3. Normierte Fluoreszenzintensität I/I_0 während des Betriebs der DNA-Maschine, a) ohne TB, b) mit TB. Die Fluoreszenzniveaus entsprechen den unterschiedlichen Konformationen, die durch die Symbole angezeigt werden.

dargestellt, in denen die Stränge AP3, Q5 (3'- und 5'-Enden entsprechend fluoreszenzmarkiert, siehe Abbildung 1) und R in Abwesenheit (Abbildung 3a) und in Gegenwart (Abbildung 3b) von TB eingesetzt wurden. Nach Binden von Q5 an AP3 wird die Fluoreszenz des Farbstoffs an AP3 durch den FRET-Acceptor an Q5 unterdrückt. Die Fluoreszenz ist bereits teilweise geschwächt, wenn Q5 an die Haltepunktsequenz bindet (vgl. (II) in Abbildung 1), nach dem vollständigen Binden von Q5 an AP3 erreicht sie ihr Minimum. Abbildung 3 zeigt, dass die Maschine in Abwesenheit von TB wesentlich schneller von der G-Quartett- in die Doppelstrangstruktur geschaltet werden kann. Der Ablöseschritt ist hingegen unabhängig von TB und folgt einer Kinetik zweiter

Ordnung mit ungefähr derselben Zeitkonstante für beide Situationen ($\tau = 220\text{--}240\text{ s}$ ohne TB, $\tau = 290\text{--}350\text{ s}$ mit TB).

Die Kinetik der Maschine wird in hohem Maße vom Haltepunktabschnitt beeinflusst, der an die Aptamersequenz angehängt ist. Um diesen Effekt weiter aufzuklären, wurde ein kürzerer Öffnungsstrang (Q5-S) konstruiert, der zu der ursprünglichen, 15 Basen langen Aptamersequenz komplementär ist, aber das Komplement des Haltepunktes nicht enthält. Ohne TB geht die Maschine nach Zugabe von Q5 oder Q5-S schnell in die Duplexform über. Das Endniveau der Fluoreszenz ist dabei bei der AP3-Q5-S Struktur geringfügig niedriger, da sich die Farbstoffe näher kommen als beim AP3-Q5 Komplex. In beiden Fällen sind die Halbwertszeiten für die Übergänge in der Größenordnung von $\tau = 5\text{ s}$. Die Situation ist in Gegenwart von TB völlig verändert. Die durch Q5 induzierte Fluoreszenzänderung kann hier gut durch Überlagerung eines Prozesses zweiter Ordnung ($\tau = 24\text{ s}$) und eines Prozesses erster Ordnung ($\tau = 960\text{ s}$) beschrieben werden. Die schnelle Komponente resultiert wahrscheinlich aus der Reaktion von Q5 mit TB-freien AP-Strängen sowie aus dem Bindungsgleichgewicht zwischen Q5 und der Haltepunktsequenz (II) in Abbildung 1). Der langsame Schritt entspricht der Freigabe von Protein aus dem Q-AP-TB Komplex. Im Fall des Q5-S Stranges, der nicht an die Haltepunktsektion bindet, wird ein viel langsamerer Schritt erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von $\tau = 1740\text{ s}$ beobachtet. Die kinetischen Messungen zeigen, dass der Haltepunkt die Freisetzungsgeschwindigkeit in etwa verdoppelt (Abbildung 4).

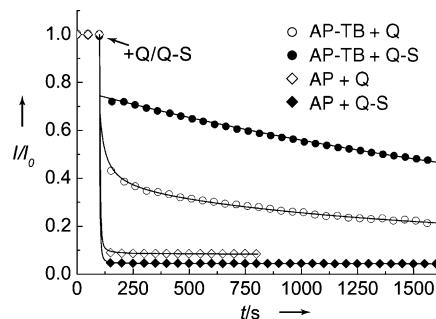


Abbildung 4. Fluoreszenzabfall nach Zugabe von Q in Gegenwart von TB (Kreise) oder ohne TB (Rechtecke). Jeder 50. Datenpunkt ist dargestellt. Die durchgezogenen Linien sind an die Messpunkte angeglichene Kurven.

Um das Binden und Freigeben von TB durch die Maschine direkt zu beobachten, wurden Messungen der Fluoreszenzanisotropie r durchgeführt (siehe Experimentelles), die empfindlich von der Umgebung eines Fluorophors abhängt.^[12] In Abbildung 5 ist r für einige Betriebszyklen der Maschine dargestellt. Bei diesen Experimenten wurde nur der Aptamerstrang AP3 fluoreszenzmarkiert. Ein gebundenes Proteins schränkt den rotatorischen Freiheitsgrad des Farbstoffs ein und erhöht dadurch die Anisotropie. Die Änderung von r entspricht folglich der Proteinbindung oder -freigabe. Der Öffnungsschritt bestätigt die Kinetik erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von etwa 600 s, der Bindungsschritt ist eine Reaktion zweiter Ordnung mit $\tau =$

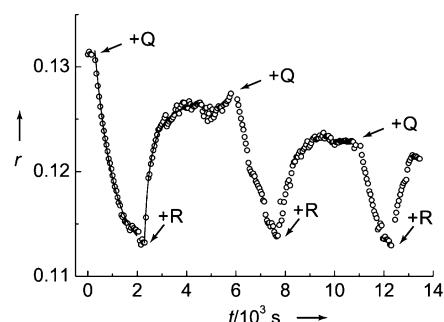


Abbildung 5. Fluoreszenzanisotropie r während des Betriebs der Aptamermaschine in Gegenwart von TB. Die Signaländerung ist von der Bindung der Maschine an das Protein abhängig und zeigt daher direkt das Binden und Freigeben von TB. Die durchgezogenen Linien sind an die Messpunkte angeglichene Kurven.

230 s. Eine genaue Untersuchung der Kinetik wird derzeit durchgeführt.

Wir haben eine molekulare Maschine konstruiert, die auf einem DNA-Aptamer basiert und ein Protein wiederholt binden und freigeben kann. Im wesentlichen erfüllt die Maschine also die Funktion, die Konzentration des frei in Lösung befindlichen Proteins TB zwischen einem verarmten und einem angereicherten Zustand präzise zu steuern. Die Kombination des Operationssprinzips von DNA-basierten nanomechanischen Strukturen mit den Bindungseigenschaften von DNA-Aptamern erweitert bedeutend den Spielraum für die Konstruktion weiterer funktionaler DNA-Nanostrukturen. Aptamere lassen sich für die Bindung an eine Vielzahl beliebiger Verbindungen konstruieren. Ausgehend von der beschriebenen Maschine sollten daher weitere DNA-basierte Nanomaschinen konstruiert werden können, die andere Moleküle als TB tragen, binden und wieder freigeben.

Experimentelles

Die DNA Sequenzen für AP3, Q5 und R sind in Abbildung 1 gezeigt: Das 3'-Label von AP3 ist Oregon Green 488 (Molecular Probes, Oregon, USA). Das 5'-Label von Q5 ist TAMRA (5(6)-Carboxy-tetramethylrhodamin). Strang AP ist dieselbe wie AP3 nur ohne den Thyminspacer und das Label am 3'-Ende. Unmarkiertes Q hat dieselbe Sequenz wie Q5. Kurzes Q5-S ist 5'-TAMRA CCAACCA-CACCAACC-3'; R ist 5'-CAACGCCGTAAGTCATCTC-GGTTGGTGTG-3'. Alle Oligonukleotide wurden von biomers.net, Ulm, synthetisiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von Sigma-Aldrich bezogen und unverändert eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben, wurde in den Experimenten ein modifizierter physiologischer Puffer verwendet (20 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl, pH 8.5).

Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in einem nativen Gel (15 %) in einem Puffer (89 mM Tris/HCl, 89 mM Borsäure) mit 10 mM KCl durchgeführt (1.5 h, 10 V cm⁻¹, 20°C). Die Gele wurden mit dem nucleinsäurefärbindenden Farbstoff SYBR-Gold (Molecular Probes) gefärbt. TB fluoresziert nicht und wird vom Farbstoff nicht gefärbt.

Bei den FRET-Experimenten wurde die Fluoreszenz mit einem Argonionenlaser ($\lambda = 488\text{ nm}$) angeregt und mit einer Si-Photodiode durch einen 10 nm Bandpassfilter mit Zentrumswellenlänge 514.5 nm mittels Lock-In-Technik detektiert. Die Temperatur wurde mit einem Thermostat konstant bei 25°C gehalten. Die Konzentration von Strang A war in allen Fällen 1 μM , andere Stränge wurden stöchiometrisch zugesetzt.

metrisch hinzugefügt. TB wurde in fünffachem Überschuss zu A zugegeben.

In den Anisotropieexperimenten wurde Fluoreszenz durch einen Glan-Thompson(GT)-Polarisator angeregt. Die parallele und die senkrechte Komponente I_{\parallel} , I_{\perp} der Fluoreszenzintensität wurden durch zwei GT-Analysatoren im T-Format bestimmt. Die Anisotropie ist definiert als $r = (I_{\parallel} - I_{\perp})/(I_{\parallel} + 2I_{\perp})$.

Eingegangen am 15. Dezember 2003 [Z53537]
Online veröffentlicht am 28. April 2004

Stichwörter: Aptamere · DNA · DNA-Strukturen ·
Molekulare Maschinen · Nanostrukturen

- [1] V. Balzani, A. Credi, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3484; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3349.
 [2] C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3933; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3779.
 [3] C. D. Mao, W. Q. Sun, Z. Y. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, *397*, 144.
 [4] a) B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature* **2000**, *406*, 605; b) F. C. Simmel, B. Yurke, *Phys. Rev. E* **2001**, *63*(04); c) F. C. Simmel, B. Yurke, *Appl. Phys.* **Lett.** **2002**, *80*, 883; d) H. Yan, X. P. Zhang, Z. Y. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **2002**, *415*, 62; e) J. W. J. Li, W. H. Tan, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 315; f) P. Alberti, J. L. Mergny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1569; g) A. J. Turberfield, J. C. Mitchell, B. Yurke, A. P. Mills, M. I. Blakey, F. C. Simmel, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*; h) L. P. Feng, S. H. Park, J. H. Reif, H. Yan, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4342.
 [5] D. S. Wilson, J. W. Szostak, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611.
 [6] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564.
 [7] J. W. J. Li, X. H. Fang, W. H. Tan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292*, 31.
 [8] K. Padmanabhan, K. P. Padmanabhan, J. D. Ferrara, J. E. Sadler, A. Tulinsky, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 17651.
 [9] J. L. Mergny, A. T. Phan, L. Lacroix, *FEBS Lett.* **1998**, *435*, 74.
 [10] a) T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, *2*, 55; b) L. Stryer, R. P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *58*, 719.
 [11] a) R. Nutiu, Y. F. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4771; b) M. Rajendran, A. D. Ellington, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5700.
 [12] a) J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2. Aufl., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**; b) R. A. Potyrailo, R. C. Conrad, A. D. Ellington, G. M. Hieftje, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3419.

BE ON

THE BALL!



The new free **WILEY-VCH Alerting Service** makes time-consuming random finds a thing of the past!

Register now for the free
WILEY-VCH Alerting Service

Now you can be supplied per e-mail regularly with information tailored precisely to your needs and interests. Just fill out the registration form at www.wiley-vch.de/home/pas for e-mails with news on the latest WILEY-VCH publications in your field. Added benefit: general info on important developments and services at WILEY-VCH.

Be on the ball so you'll be in the know!

www.wiley-vch.de