

Künstliche molekulare Motoren auf DNA-Basis nach dem Vorbild von Kinesin**

T. Ross Kelly*

Stichwörter:

Bioorganische Chemie · DNA · Molekulare Funktionseinheiten · Nanotechnologie

Das Gebiet der molekularen Funktionseinheiten ist in den vergangenen zwei Jahrzehnten intensiv beforscht worden.^[1] In den letzten Jahren zogen synthetische molekulare Motoren wachsende Aufmerksamkeit auf sich, und es wurden „organische“^[2–9] und DNA-basierte^[10–16] Systeme konstruiert, die als Rotations- oder Linearmotoren arbeiten. Die Natur ist reich an Beispielen für molekulare Motoren (Flagellen, Muskeln, Cilien usw.).^[17] Bis zum Jahr 2004 waren alle prozessiven molekularen Motoren, bei denen sich ein Motormolekül über eine Oberfläche bewegt, biologischen Ursprungs.

Kinesin ist der Prototyp eines prozessiven biologischen Motors,^[18] ein weiteres Beispiel sind die DNA-Polymerasen. Wie in Abbildung 1 gezeigt, bewegt sich Kinesin, von ATP angetrieben, entlang eines Mikrotubulus. Ein Hauptmerkmal des Kinesin-Systems ist die Steuerung der Bewegungsrichtung. Über die damit verbundene Problematik gibt eine Betrachtung eines Zwischenzustands zwischen Abbildung 1b und 1c am besten Auskunft. Wie wird eine gerichtete Bewegung erreicht, wenn Kinesin nur durch den blauen Fuß gebunden ist und dem roten Fuß zwei identische nächste Bindungsstellen offen stehen (nämlich eine auf der lin-

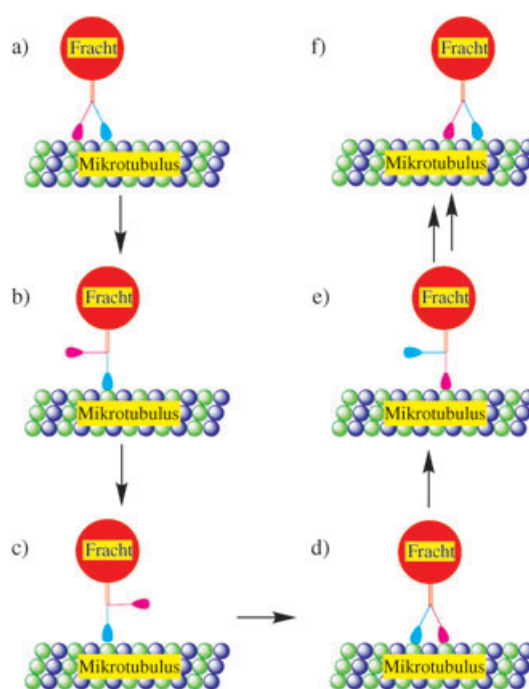


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Bewegung von Kinesin (das eine Fracht trägt) entlang eines Mikrotubulus.

ken und eine auf der rechten Seite, aus deren Besetzung die Zustände in Abbildung 1a bzw. 1d resultieren)? Im Fall von Kinesin hat die Natur offensichtlich eine Antwort gefunden, bei synthetischen Funktionseinheiten ist die Steuerung der Bewegungsrichtung jedoch die wohl größte Schwierigkeit. Vier im Jahr 2004 veröffentlichte Arbeiten^[19–22] stellen erste Schritte auf dem Weg zur Bewältigung dieser Aufgabe dar. Grundlage ist jeweils ein DNA-basiertes System.

Wohl unterschieden sich die vier Arbeiten in Einzelheiten. Das Wesentliche an ihnen ist aber, dass die Assoziations- und Dissoziationsprozesse

durch Hybridisierung komplementärer DNA-Einzelstränge unter Bildung von Doppelhelices, bisweilen bei gleichzeitiger Abspaltung einer zweiten Doppelhelix, angetrieben werden. Nach dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik erfordern gerichtete Bewegungen die Aufwendung von Energie.^[23] Alle vier Systeme nutzen chemische Energie für die Bewegung. Die ersten drei Systeme werden durch die freie Energie aus der Basenpaarung/Doppelhelix-Bildung angetrieben. Demgegenüber bezieht das vierte System seine Energie hauptsächlich aus der ATP-Hydrolyse.

Über derartige Fortschritte bei molekularen Motoren berichteten zuerst Sherman und Seeman.^[19] Ihr Ansatz ist in Abbildung 2

dargestellt. Er beruht auf verschiedenen reinen DNA-Komponenten: einem „Laufweg“ (dunkelblau), zwei miteinander über drei flexible Linker verbundenen „Beinen“ (braun), die einsträngige „Füße“ tragen (Fuß 1 (F1) rosa, Fuß 2 (F2) orange) sowie „Trittplätze“ („Footholds“, FH) A (türkis) und B (grün). Sowohl Bewegung als auch Stillstand werden mithilfe zweier Familien von Einzelstrang-DNA ausgelöst, die als Trennungs („Unset“)- und Bindungs („Set“)-Stränge ausgewiesen sind. Die Bindungsstränge vereinigen sich durch Hybridisierung mit Einzelstrangsegmenten, und sie können durch die Zugabe von Trennungssträngen, denen ge-

[*] Prof. T. R. Kelly
Department of Chemistry
Merkert Chemie Center
Boston College
Chestnut Hill, MA 02467 (USA)
Fax: (+1) 617-552-2705
E-mail: ross.kelly@bc.edu

[**] Wir danken den National Institutes of Health (Grant GM56262) für die Unterstützung unserer Arbeit auf dem Gebiet molekularer Motoren.

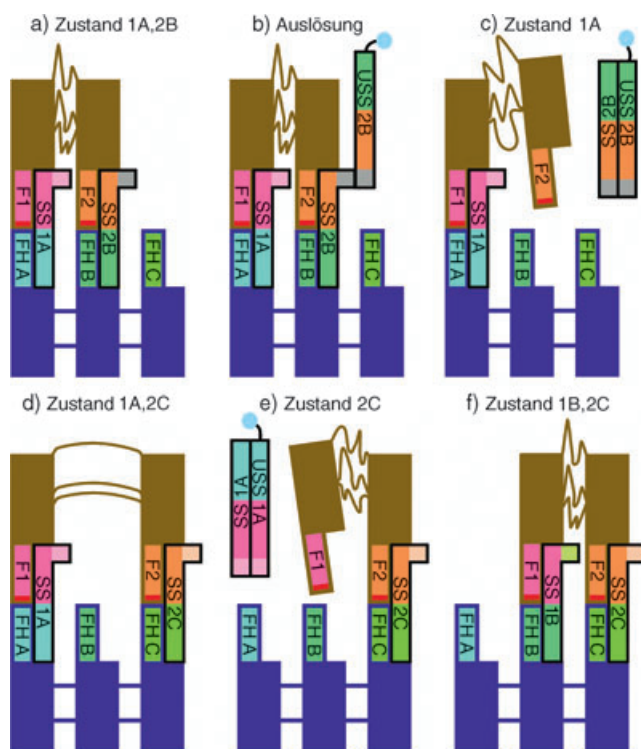


Abbildung 2. Arbeitsprinzip des Zweibeiners von Seeman und Sherman^[19] (Einzelheiten siehe Text). Komplementärsequenzen von Strängen sind gleichfarbig dargestellt; SS = Bindungsstrang („Set Strand“), USS = Trennungsstrang („Unset Strand“), F = Fuß und FH = Trittfläche („Foot-hold“). Die Abschnitte (b) und (c) zeigen, wie der Trennungsstrang 2B zuerst an den Überhangabschnitt („Toehold“) des Bindungsstrangs 2B (grau) bindet und im Anschluss daran den Bindungsstrang entfernt, wodurch Fuß 2 freigegeben wird. Falls gewünscht, kann der Komplex aus Bindungs- und Trennungsstrang in (c) durch Komplexierung der Biotin-Gruppe (hellblauer Kreis) mit Streptavidin-überzogenen magnetischen Kügelchen entfernt werden. (Wiedergabe mit Genehmigung der Autoren.)

genüber sie eine größere Affinität haben, wieder entfernt werden. Ein Fuß heftet sich an eine Trittfläche an, sobald ein Bindungsstrang, der zu beiden komplementär ist, der Lösung zugegeben wird. Komplementäre Strangabschnitte sind in Abbildung 2 gleichfarbig darge-

stellt. Wenn also, wie in Abbildung 2a, der rosa- und türkisfarbene Bindungsstrang SS1A vorhanden ist, so setzt der Zweibeiner seinen Fuß 1 auf die Trittfläche A.

Jeder Bindungsstrang verfügt über einen 8-Basen-Überhang („Toehold“),

der zu keinem Fuß und keiner Trittfläche komplementär ist (grau in Abbildung 2a). Der Überhang ermöglicht das Entfernen des Bindungsstrangs mithilfe eines Trennungsstrangs (Abbildung 2b, c). Die Sequenzen der Fuß-, Trittflächen- und Überhang-Abschnitte sind in den Abbildungen verschiedenfarbig dargestellt. Die genaue Basenabfolge zeigt Abbildung 3.

Abbildung 2a zeigt den Zustand 1A,2B des Systems. In diesem Stadium steht Fuß 1 auf der Trittfläche A und Fuß 2 auf der Trittfläche B. Der Zweibeiner befindet sich anfangs in diesem Zustand. Für das Ausführen eines Schrittes muss, wie in Abbildung 2b und c dargestellt, Fuß 2 zuerst von Trittfläche B gelöst werden. Hierzu wird der Trennungsstrang 2B der Lösung zugegeben. Er bindet an den Überhang des Bindungsstrangs 2B (Abbildung 2b) und die nachfolgende DNA-Wanderung („Branch Migration“) führt zu vollständiger Hybridisierung von Bindungsstrang 2B mit Trennungsstrang 2B. Es ergibt sich der in Abbildung 2c gezeigte Zustand, bei dem Fuß 2 nur indirekt, über die flexiblen Linker zu Fuß 1 und Bindungsstrang 1A, mit dem Laufweg verbunden bleibt. Sobald der Fuß 2 von der Trittfläche B gelöst ist, kann er erneut gesetzt werden, entweder auf die Trittfläche B, was eine Rückkehr zum Zustand 1A,2B bedeuten würde, oder auf die Trittfläche C. In diesem Fall würde das System in den Zustand 1A,2C übergehen (Abbildung 2d). Es ist zu beachten, dass sich die flexiblen Linker, um von Trittfläche A zu Trittfläche C zu gelangen, über die Trittfläche B hinweg erstrecken müssen. Vom Zustand 1A,2C

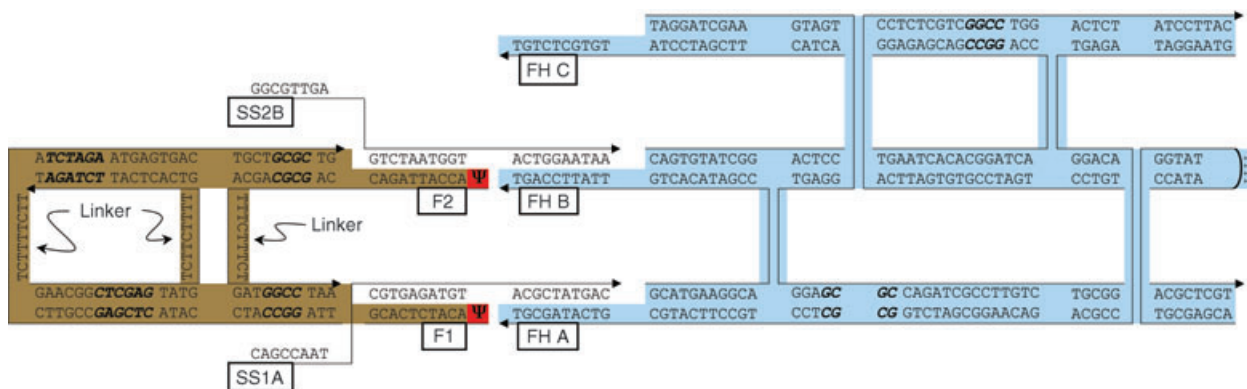


Abbildung 3. Darstellung der Abbildung 2a entsprechenden DNA-Basensequenz, um 90° gegen den Uhrzeigersinn gedreht. (Wiedergabe mit Genehmigung der Autoren.)

aus können, wie in Abbildung 2 f dargestellt, ähnliche Trennungs- und Bindungsoperationen erfolgen, um Fuß 1 von der Trittfläche A auf die Trittfläche B zu befördern und so zum Zustand 1B,2C zu gelangen. Die Gesamtstrecke, die der Zweibeiner bezüglich des Laufwegs mit diesem Schritt zurücklegt, entspricht etwa der 2-nm-Ausdehnung einer DNA-Helix-Domäne.

Bisher ist die Reichweite des Sherman-Seeman-Zweibeiners auf ein bis zwei Schritte beschränkt. Die Fortbewegung erfolgt wie bei einer Raupe: Ein Bein wird immer nachgezogen. Bis vor kurzem war nicht klar, ob sich Kinesin im Raupen- oder im Hand-über-Hand(Fuß-über-Fuß)-Modus fortbewegt. Für Kinesin ist der Raupen-Modus nun aber widerlegt worden^[18] (nicht jedoch für Raupen).

Shin und Pierce^[20] haben die Arbeit von Sherman und Seeman noch einen Schritt weiter geführt. Sie präsentierten einen prozessiven zweibeinigen DNA-Nanomotor („Walker“). Dieser bewegt sich vorwärts, indem der zurückhängende Fuß bei jedem Schritt in die vordere Position gebracht wird (Abbildung 4).

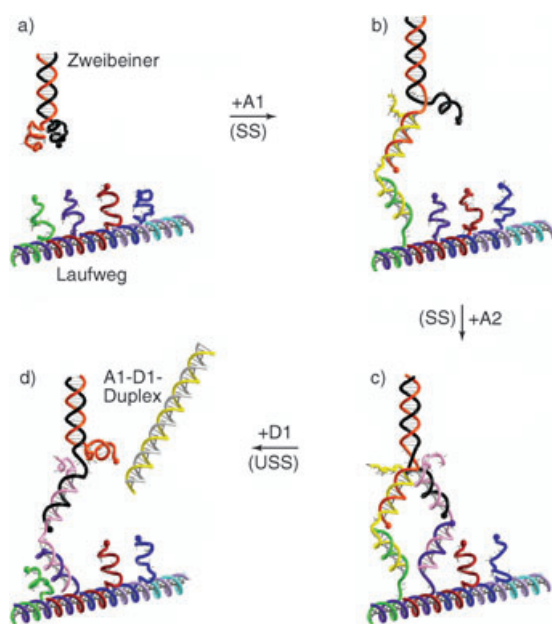


Abbildung 4. Fortbewegung des Zweibeiners von Shin und Pierce^[20] (Einzelheiten siehe Text). Die schematischen Darstellungen zeigen a) den nicht gebundenen Zweibeiner, b) den an Trittfläche 1 (grün) gebundenen Zweibeiner, c) den an die Trittflächen 1 und 2 (violett) gebundenen Zweibeiner und d) den von Trittfläche 1 freigegebenen Zweibeiner mit dem entstandenen DNA-Duplex. A und D kennzeichnen die Bindungs- bzw. Trennungsstränge. (Wiedergabe mit Genehmigung der Autoren.)

Wie erwähnt, ist die Bewegungsrichtung ein Hauptproblem, insbesondere dann, wenn nur zwei Füße und zwei Arten von Trittflächen benutzt werden. Im System von Shin und Pierce gibt es zwei Füße und vier Trittflächen, und die Bewegungsrichtung wird auf effiziente Weise gesteuert. Das System hat vier Komponenten: einen Zweibeiner, einen Laufweg, Bindungsstränge („Set“-Stränge, A) als Antrieb sowie Trennungsstränge („Unset“-Stränge, D). Der Zweibeiner besteht aus zwei partiell komplementären Oligonucleotiden, deren einzelsträngige Beine (Füße) über eine Doppelhelix miteinander verbunden sind. An dem aus sechs Oligonucleotiden gebildeten Laufweg befinden sich vier überhängende einzelsträngige Zweige („branches“) als Trittflächen, die durch Gerüsthelices mit 15 Basenpaaren getrennt sind. Benachbarte Zweige verlaufen entgegengesetzt, sodass alle Zweige bei Abständen von 1.5 Helixwindungen (etwa 5 nm) auf der gleichen Seite des Laufwegs angeordnet sind (Abbildung 4a).

Wie Abbildung 4 zeigt, wird das Abschreiten des Laufwegs durch den Zweibeiner von

außen durch A- und D-Stränge gesteuert. Ein Bindungsstrang A1 (gelb) verbindet spezifisch das orangefarbene Bein mit der grünen Trittfläche. Dies geschieht durch Bildung einer Doppelhelix, bestehend aus dem Bein sowie dem entsprechenden Zweig. Einzelsträngige Gelenke nahe den äußersten Enden dieser Helices gewährleisten die Flexibilität für die Bildung von verschiedenen, von der jeweiligen Antriebsspezies bestimmten Konformationen. Sobald beide Beine an den Laufweg gebunden sind, wird das zurückhängende Bein befreit (Abbildung 4, (c)→(d)). Dies geschieht mithilfe des Stranges D1, der sich

an einem 10-Basen-Überhang („Toe-hold“) an den vollständig komplementären Strang A1 anlagert und den Bein-Strang unter Bildung eines Duplex verdrängt. Das Bein ist nun frei für den nächsten Schritt. In Abbildung 4 ist nicht gezeigt, dass der Zweibeiner durch die Zugabe von A- und D-Strängen in einer entsprechenden Reihenfolge dazu gebracht werden kann, auf dem Laufweg von einem Ende zum anderen und wieder zurück zu laufen.

Ein Ansatz von Tian und Mao^[21] (Abbildung 5) ist dem Konzept von Shin

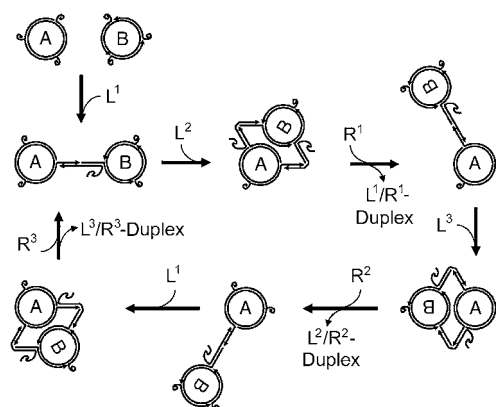


Abbildung 5. Bewegung entlang einer Kreisbahn nach Tian und Mao^[21] (wie zwei Zahnräder). L und R kennzeichnen Bindungs- bzw. Trennungsstränge. (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung von C. Mao.)

und Pierce ähnlich. Die Bewegung verläuft hier entlang eines Kreisbogens.

Yan, Turberfield, Reif und Mitarbeiter berichteten kürzlich über eine dritte Strategie.^[22] Hier bewegt sich ein 6-Nucleotid-Fragment (*, rot in Abbildung 6) entlang eines DNA-Laufwegs fort. Jedoch gleicht diese Bewegung mehr dem Transport eines Eimers in einer Eimerkette (oder dem eines gefeierten Stars, der von einer Menschenmenge auf Händen getragen wird). Auch dieser Prozess ist gerichtet, es werden jedoch keine Bindungs- und Trennungsstränge verwendet. Die Bindungs(„Set“-Funktion wird von der T4-Ligase ausgeführt; dabei wird gleichzeitig eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonucleasen (Pflm I, BstA-P I) geschaffen, die anschließend anstelle von Trennungs(„Unset“-Strängen agieren.

Wie in Abbildung 6 dargestellt, enthält der selbstorganisierte Laufweg drei

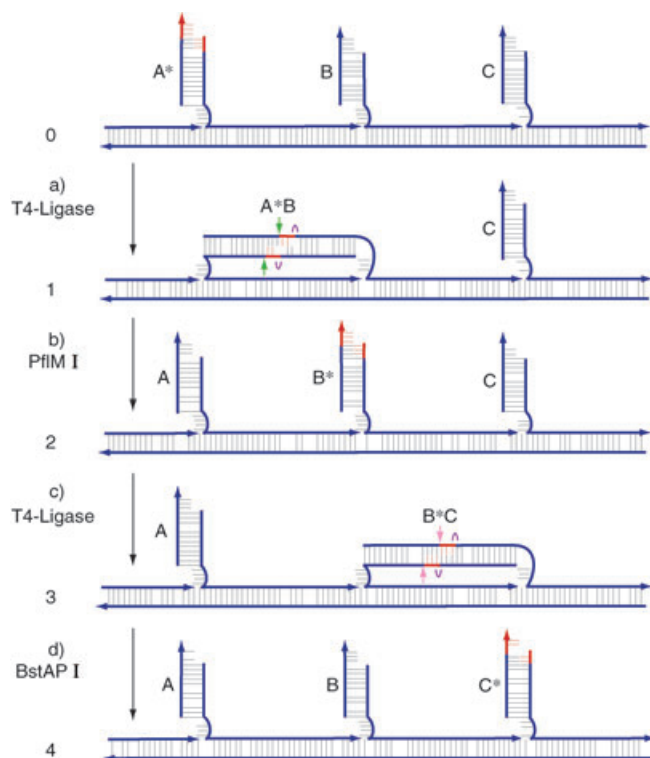


Abbildung 6. Arbeitsweise der molekularen Maschine von Yan, Turberfield, Reif und Mitarbeitern^[22] (Einzelheiten siehe Text). Grüne und rosa Pfeile weisen auf Restriktionsstellen hin, violette Symbole (□/∪) zeigen an, wo die Ligation stattfindet. (Wiedergabe mit Genehmigung der Autoren.)

Trittflächen („anchorages“), an die das rote 6-Nucleotid-Fragment („Walker“) ligiert werden kann. Jede Trittfläche besteht aus einem Doppelstrang-Abschnitt mit einem 3-Nucleotid-Einzelstrangüberhang („sticky end“). Bei jedem Schritt wird das 6-Nucleotid-Fragment an die nächste Trittfläche ligiert (z. B. 0→1) und danach von der vorhergehenden Trittfläche durch die Restriktionsendonuclease getrennt (1→2). Jede Ligation erzeugt eine neue Restriktionsstelle, und jeder Schnitt zerstört die vorige Restriktionsstelle. Die Bewegung ist gerichtet: Das Produkt der Ligation zwischen zwei benachbarten Trittflächen kann nur gespalten werden, indem sich das rote 6-Nucleotid-Fragment zur nächsten Trittfläche stromabwärts bewegt (beim Durchtrennen von A*B und B*C bleibt das Fragment stets mit B bzw. C verbunden). Das System brennt gewissermaßen alle Brücken hinter sich ab, wenn sich die 6-Nucleotid-Fracht entlang des Laufwegs fortbewegt. Zwei Leerlaufschritte sind möglich: B* kann wieder an A binden und durch den Schnitt mit PflM I regeneriert werden.

Auf ähnliche Weise kann C* erneut an B binden und mit BstAP I regeneriert werden. Keiner dieser Leerlaufschritte kehrt jedoch die gerichtete Bewegung des 6-Nucleotid-Fragments um oder blockiert sie. Hat B* erst einmal an C gebunden, dann kann das rote Fragment nie mehr zu A zurückkehren. Eine Ausdehnung der Bewegung über mehr als drei Trittflächen hinaus sollte möglich sein.

Im Unterschied zu den Abfolgen in den Abbildungen 2–5 wird der in Abbildung 6 gezeigte Ereignisablauf als „autonom“ bezeichnet. Nach dem Mischen von 6-Nucleotid-Fragment (A*), Laufweg (mit Trittflächen) und den drei Enzymen (T4-Ligase sowie den Restriktionsendonucleasen PflM I und BstAP I) laufen die in Abbildung 6a–d dargestellten Ereignisse ohne weiteren Eingriff von außen ab.

Die vier besprochenen Beiträge liefern erfindungsreiche Antworten für ein schwieriges Design-Problem. Bis zu einer praktischen Lösung für den Transport von Frachten über eine Oberfläche ist es allerdings noch ein langer Weg.

Aber gemäß einem Konfuzius zugeschriebenen Ausspruch beginnt selbst ein Weg von tausend Meilen mit dem ersten Schritt – und diesen haben die beschriebenen „Walker“ getan.

Online veröffentlicht am 2. Juni 2005

- [1] Umfassende Übersichten: a) C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3933–3937; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3779–3783; b) V. Balzani, M. Ventura, A. Credi, *Molecular Devices and Machines*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [2] a) T. R. Kelly, H. De Silva, R. A. Silva, *Nature* **1999**, *400*, 150–152; b) T. R. Kelly, R. A. Silva, H. De Silva, S. Jamin, Y. Zhao, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6935–6949; c) T. R. Kelly, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 514–522; d) T. R. Kelly, M. Caverio, Y. Zhao, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3895–3898; e) T. R. Kelly, M. Caverio, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2653–2656.
- [3] a) N. Koumura, R. W. J. Zijlstra, R. A. van Delden, N. Harada, B. L. Feringa, *Nature* **1999**, *400*, 152–154; b) B. L. Feringa, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 504–513; c) R. A. van Delden, N. Koumura, N. Harada, B. L. Feringa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 4945–4949; d) N. Koumura, E. M. Geertsema, M. B. van Gelder, A. Meetsma, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5037–5051; e) M. K. J. ter Wiel, R. A. van Delden, A. Meetsma, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15076–15086.
- [4] a) R. A. Bissell, E. Córdova, A. E. Kaifer, J. F. Stoddart, *Nature* **1994**, *369*, 133–137; b) M.-V. Martínez-Díaz, N. Spencer, J. F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1904–1907; c) V. Balzani, A. Credi, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3484–3530; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3349–3391; d) T. J. Huang, H.-R. Tseng, L. Sha, W. Lu, B. Brough, A. H. Flood, B.-D. Yu, P. C. Celestre, J. P. Chang, J. F. Stoddart, C.-M. Ho, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2065–2071.
- [5] a) M. C. Jimenez, C. Dietrich-Buchecker, J.-P. Sauvage, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3284–3287; b) J.-P. Collin, C. Dietrich-Buchecker, P. Gavina, M. C. Jimenez-Molero, J.-P. Sauvage, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 477–487; c) C. Dietrich-Buchecker, M. C. Jimenez-Molero, V. Sartor, J.-P. Sauvage, *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 1383–1393.
- [6] a) A. M. Brouwer, C. Frochot, F. G. Gatti, D. A. Leigh, L. Mottier, F. Paolucci, S. Roffia, G. W. H. Worpel, *Sci-*

- ence **2001**, 291, 2124–2128; b) D. A. Leigh, J. K. Y. Wong, F. Dehez, F. Zerbetto, *Nature* **2003**, 424, 174–179; c) J. V. Hernández, E. R. Kay, D. A. Leigh, *Science* **2004**, 306, 1532–1537.
- [7] X. Zheng, M. E. Mulcahy, D. Horinek, F. Galeotti, T. F. Magnera, J. Michl, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4540–4542.
- [8] M. F. Hawthorne, J. I. Zink, J. M. Skelton, M. J. Bayer, C. Liu, E. Livshits, R. Baer, D. Neuhauser, *Science* **2004**, 303, 1849–1851.
- [9] Ein neues Highlight hierzu: C. P. Mandl, B. König, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 1650–1652; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1622–1624.
- [10] a) C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, 397, 144–146; b) H. Yan, X. Zhang, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **2002**, 415, 62–65.
- [11] a) B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, Jr., F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature* **2000**, 406, 605–608; b) A. J. Turberfield, J. C. Mitchell, B. Yurke, A. P. Mills, Jr., M. I. Blakely, F. C. Simmel, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 90, 118102.
- [12] J. J. Li, W. Tan, *Nano Lett.* **2002**, 2, 315–318.
- [13] P. Alberti, J. Mergny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 1569–1573.
- [14] L. Feng, S. H. Park, J. H. Reif, H. Yan, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 4478–4482; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4342–4346.
- [15] Y. Chen, M. Wang, C. Mao, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3638–3641; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3554–3557.
- [16] a) W. U. Dittmer, F. C. Simmel, *Nano Lett.* **2004**, 4, 689–691; b) W. U. Dittmer, A. Reuter, F. C. Simmel, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3634–3637; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3550–3553.
- [17] Übersicht: *Molecular Motors* (Hrsg.: M. Schliwa), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [18] Wichtige Literaturstellen: a) C. L. Asbury, A. N. Fehr, S. M. Block, *Science* **2003**, 302, 2130–2134; b) A. Yildiz, M. Tomishige, R. D. Vale, P. R. Selvin, *Science* **2004**, 303, 676–678.
- [19] W. B. Sherman, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2004**, 4, 1203–1207; Korrigendum: W. B. Sherman, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2004**, 4, 1801.
- [20] J.-S. Shin, N. A. Pierce, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10834–10835.
- [21] Y. Tian, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11410–11411.
- [22] 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.
- [23] A. P. Davis, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 953–954; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 909–910.