

DNA-Schalter: Grundlagen und Anwendungen

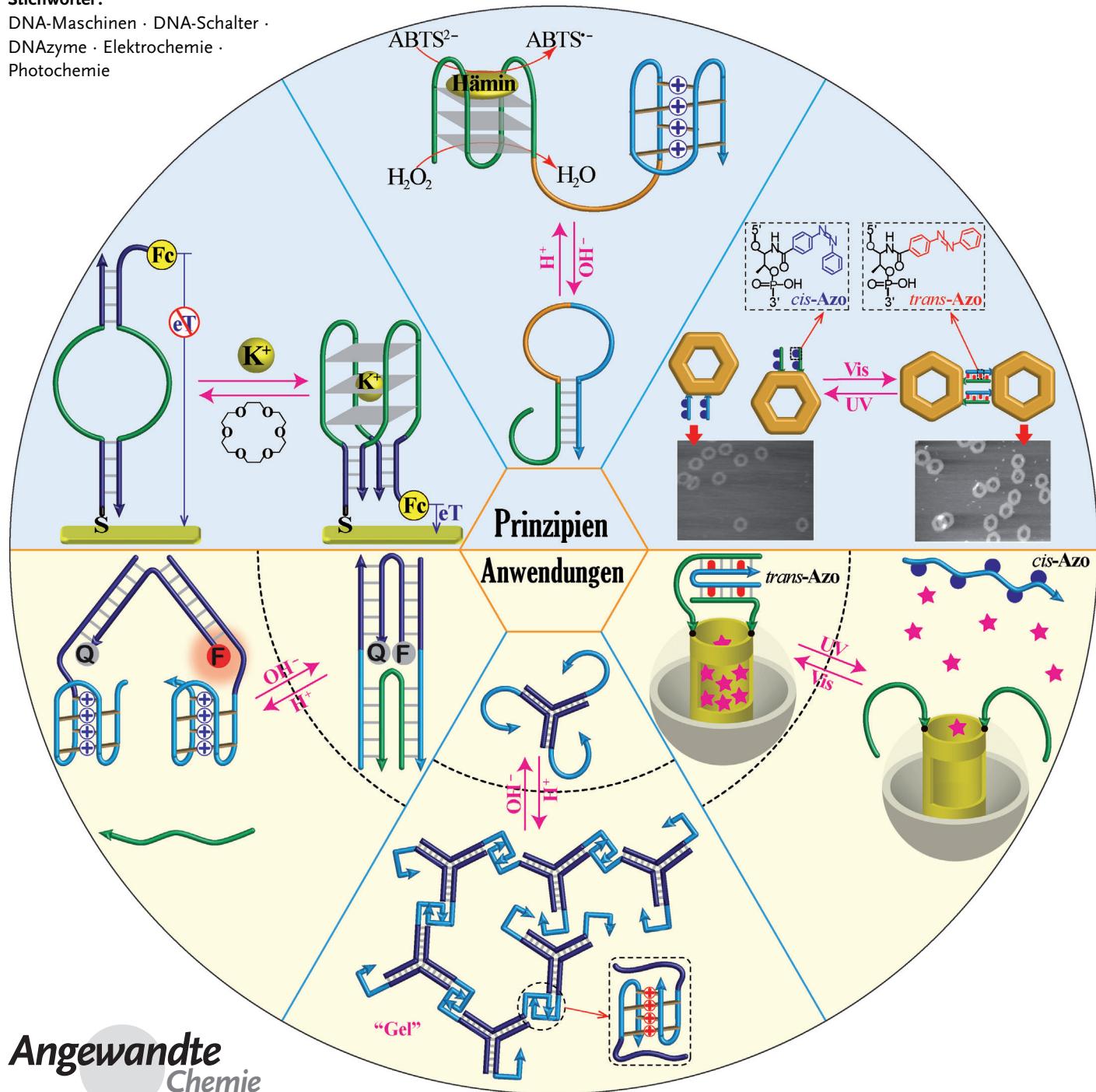
Fuan Wang, Xiaoqing Liu und Itamar Willner*

Stichwörter:

DNA-Maschinen · DNA-Schalter ·

DNAzyme · Elektrochemie ·

Photochemie



Die Basensequenz der Nukleinsäuren verschlüsselt strukturelle und funktionelle Eigenschaften in einem Biopolymer. Strukturelle Informationen beinhalten die Bildung von Duplexen, G-Quadruplexen, i-Motiven und kooperativ stabilisierten Anordnungen. Funktionelle Informationen betreffen z. B. den Prozess der Strangverdrängung, Erkennungseigenschaften von Aptameren und die katalytische Funktion von DNAzymen. Dieser Aufsatz befasst sich mit der Implementierung der in Nukleinsäuren kodierten Informationen zur Entwicklung von DNA-Schaltern. Ein DNA-Schalter ist eine supramolekulare Nukleinsäureanordnung, die in Gegenwart geeigneter Auslöser und Gegenauslöser wie pH, Metallionen/Liganden, photoischen und elektrischen Stimuli zyklische, schaltbare Übergänge zwischen zwei Zuständen eingeht. Anwendungen von schaltbaren DNA-Systemen umfassen maßgeschneiderte DNA-Hydrogele für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung und die Aktivierung schaltbarer Enzymkaskaden.

1. Einführung

Die Basensequenz der Nukleinsäuren kodiert strukturelle und funktionelle Informationen in einem Biopolymer. Die über Basenpaare stabilisierte Bildung von Duplex-DNA, die H^+ -vermittelte Bildung von i-Motiven,^[1] die K^+ - oder Pb^{2+} -gesteuerte Bildung von G-Quadruplexen,^[2] die kooperative, durch Metallionen induzierte Bildung von Duplex-DNA (z. B. durch T-Hg²⁺-T^[3] oder C-Ag⁺-C-Brücken)^[4] und die kooperative Stabilisierung von Doppelstrang-DNA durch photoisomerisierbare Einheiten (z. B. *trans*-Azobenzol)^[5] gehören zu den Strukturmotiven, die durch Basensequenzen von Nukleinsäuren bestimmt werden. Auch die Reaktivität von Nukleinsäuren wird über die Basensequenz kontrolliert. Sequenzspezifische Nukleotide weisen spezifische Erkennungsstellen für die Bindung von Substraten mit geringem Molekulargewicht, Biopolymeren und sogar Zellen auf (z. B. Aptamere).^[6] Ebenso zeigen sequenzspezifische Nukleinsäuren katalytische Funktionen (z. B. DNAzyme oder Ribozyme).^[7] Sequenzspezifische Domänen der DNA bestimmen auch die selektive Bindung von Proteinen,^[8] und bestimmte Duplexdomänen werden spezifisch durch Enzyme gespalten (z. B. Endonukleasen oder Nicking-Enzyme).^[9]

Die Stabilität von DNA-Strukturen wird durch verschiedene Parameter kontrolliert, wie die Anzahl der Basenpaare, Art der Basen, Ionenstärke, kooperative Effekte verbrückender Duplexe, durch Ionen, i-Motiv- oder G-Quadruplex-Strukturen und die Interkalation molekularer Substrate. Der Wechsel einer Nukleinsäurestruktur in eine andere Konfiguration erfordert die Entwicklung eines energetisch abwärts verlaufenden Prozesses ($\Delta G < 0$). In Abbildung 1 wird anhand des Strangverdrängungsprozesses die energiekontrollierte Rekonfiguration von DNA-Strukturen veranschaulicht und der Einfluss der kodierenden Basensequenz auf den Prozess aufgezeigt.^[10] Die Strangverdrängungsreaktion wird in Abbildung 1A gezeigt, wo eine Duplexstruktur I, bestehend aus den Strängen 1 und 2, mit einem Eingabestrang

Aus dem Inhalt

| | |
|--|------|
| 1. Einführung | 1113 |
| 2. Arten von DNA-Schaltern | 1115 |
| 3. Anwendungen schaltbarer DNA-Systeme | 1136 |
| 4. Zusammenfassung und Ausblick | 1141 |

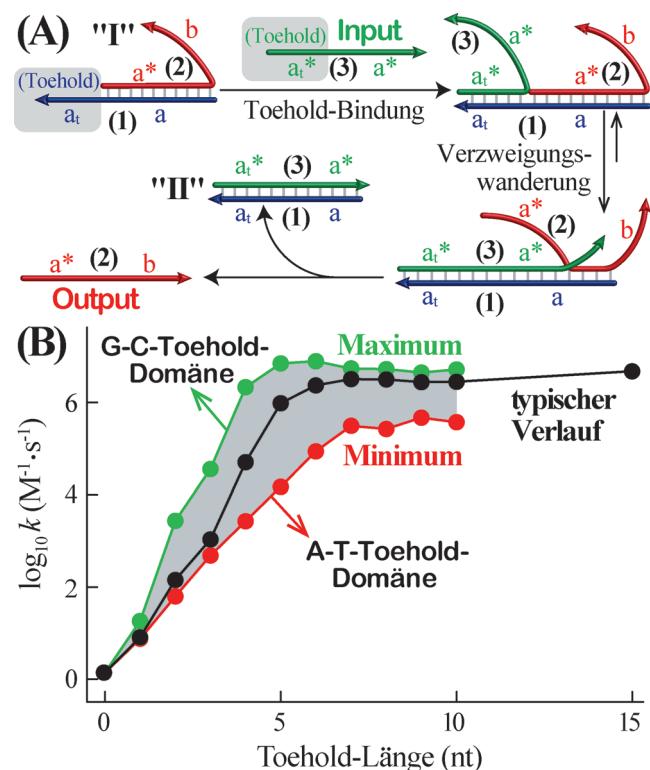


Abbildung 1. A) Strangverdrängungsmechanismen mit Input-gesteuertem Austausch einer Duplexstruktur, bestehend aus einer Brückendomäne. B) Theoretische Modellierung der Strangverdrängungskinetik als Funktion der Länge und Basenzusammensetzung der Brückendomänen. Mit Genehmigung aus Lit. [10a]. Copyright 2009 American Chemical Society.

[*] Dr. F. Wang, [+] Dr. X. Liu, [+] Prof. I. Willner
Institute of Chemistry, The Hebrew University of Jerusalem
Jerusalem 91904 (Israel)
E-Mail: willnea@vms.huji.ac.il
Homepage: <http://chem.ch.huji.ac.il/willner/>

[+] Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

3 interagiert. Da der Eingabestrang die zur Domäne **a_t** von Komplex **I** komplementäre Domäne **a_t*** enthält, ergibt sich aus der Hybridisierung mit dem Duplex **I** die Hybridstruktur **1/2/3**. Da der Eingabestrang ein überhängendes Einzelstrangende mit Domäne **a_t*** enthält, die komplementär zur Sequenz **a** von **1** ist, findet eine Verzweigungsmigration und Strangverdrängung statt, um den energetisch stabilisierten Duplex **II** zu bilden, begleitet von der Freisetzung des Ausgabestrangs **2**. Abbildung 1B zeigt die Kinetik der Strangverdrängungsreaktion als Funktion der Art und Anzahl der Basen in der Toehold-Region. Der Strangverdrängungsprozess wird mit steigender Zahl an komplementären Basen in der Toehold-Region verstärkt, und die Bildung von energetisch stabilisierten Basenpaaren beschleunigt den Strangverdrängungsprozess.

Die zyklische Rekonfiguration der DNA von einer Struktur in eine andere über einen mechanisch gesteuerten Übergang bildet die Grundlage für die Entwicklung verschiedener DNA-Schalter. Abbildung 2A skizziert das Prinzip eines DNA-Schalters. Eine DNA-Struktur in Zustand A wird einem Stimulus, Input I_A , ausgesetzt, der eine strukturelle Umwandlung von Zustand A in Zustand B induziert. Die anschließende Wechselwirkung von Zustand B mit einem zweiten Auslöser, Input I_B , stellt Zustand A wieder her und ergibt somit eine reversibel schaltbare DNA-Einheit. Der Aufbau von DNA-Schaltern erfordert die Entwicklung von Möglichkeiten, um die Funktion des DNA-Schalters zu verfolgen. Das Fluoreszenzverhalten eines DNA-Schalters mit einem Fluorophor/Quencher-Paar ist in Abbildung 2A dargestellt, wobei die Löschung des Fluorophors über den Abstand zwischen Fluorophor und Quencher gesteuert wird. Abbildung 2B veranschaulicht die stimuliresponsive Rekonfiguration eines DNA-Systems von einer Random-Coil-Struktur (Zustand C) in eine katalytisch aktive DNAzym-Struktur (Zustand D) durch einen Reiz, Input I_C , und die umgekehrte Dissoziation der DNAzym-Struktur durch einen zweiten Reiz, Input I_D . Der vom DNAzym katalysierte Prozess liefert daraufhin das Auslesesignal für die schaltbaren katalytischen Funktionen der molekularen Funktionseinheit. Mechanisch betriebene DNA-Schalter genügen einigen grundlegenden Eigenschaften und funktionellen Voraussetzungen: 1) Der Betrieb des DNA-Schalters benötigt Energiezufuhr (Treibstoff). Der Treibstoff kann ein chemischer Auslöser sein (ein Nukleinsäurestrang, der einen energetisch

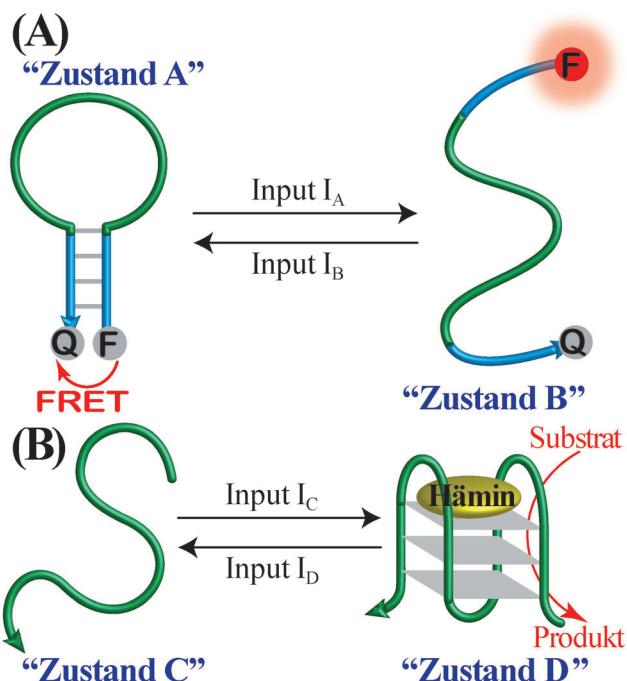
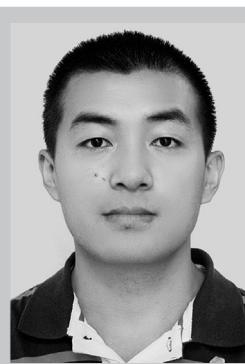


Abbildung 2. A) Zyklig schaltbare Rekonfiguration einer DNA-Nanostruktur mithilfe zweier externer Auslöser, I_A und I_B . Die Rekonfiguration wird durch Fluoreszenzintensitäten eines Fluorophor/Quencher-Paares verfolgt. B) Zyklig schaltbare Übergänge eines HRP-imitierenden DNAzyms zwischen einer katalytisch inaktiven Random-Coil-Nukleinsäure und einem katalytisch aktiven Hämin/G-Quadruplex unter Verwendung zweier externer Auslöser, I_C und I_D . Der Betrieb des DNA-Schalters wird durch Beobachtung des DNAzym-vermittelten katalytischen Prozesses abgebildet.

stabilisierten Duplex bildet, oder Ionen, die kooperativ stabilisierte DNA-Duplexe oder DNA-Komplexe liefern, und H^+ -Trigger, die zu i-Motiv-Strukturen führen), Lichtsignale, elektrische Signale und mehr. 2) Für den reversiblen Betrieb von DNA-Schaltern ist die Einführung von „Antitreibstoffen“, welche die Treibstoffstimuli kompensieren, wesentlich. Diese Antitreibstoffe können Nukleinsäuren sein, die den Treibstoffstrang von der Einheit ablösen, Liganden, die Metallionen entfernen, oder pH-Änderungen, die dem pH-Trigger entgegengesetzt sind. Alternativ kann die Einstrahlung anderer Wellenlängen, die dem Licht-Input entgegen-



Itamar Willner promovierte 1978 an The Hebrew University in Jerusalem. Nach einem Postdoktorat (1978–1981) an der U.C. Berkeley wechselte er an das Chemie-Institut der Hebrew University, wo er 1986 zum Professor berufen wurde. Zu seinen Forschungsinteressen gehören die Bioelektronik, Nanobiotechnologie, funktionelle Monoschichten, lichtinduzierte Elektronentransferprozesse, künstliche Photosynthese und „intelligente“ Materialien. Er ist Mitglied der Israelischen Akademie der Wissenschaften und der Nationalen Akademie der Wissenschaften Leopoldina.



Dr. Fuan Wang ist Postdoktorand bei Prof. Itamar Willner am Chemie-Institut der Hebrew University in Jerusalem. Er studierte Chemie an der Zhengzhou University, China (B.S. 2003), und promovierte 2008 am Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences. Seine Forschungsinteressen gelten der DNA-Nanotechnologie, insbesondere der Entwicklung von Methoden für DNA-Sensing, DNA-Computing und DNA-Maschinen.

wirken, oder ein elektrisches Gegenpotential, das den elektrischen Input ausgleicht, als Antitreibstoff genutzt werden.

Verschiedene Anwendungen von DNA-Schaltern sind vorstellbar, z.B. schaltbare katalytische Systeme wie schaltbare DNAzyme oder eine Verwendung als mechanische Träger, die Nanoobjekte wie Enzyme oder Nanopartikel transportieren. Die schaltbare Rekonfiguration solcher Objekte kann zur Kontrolle von Enzymkaskaden oder zur Regulation plasmonischer Funktionen genutzt werden. Auch in der Materialwissenschaft können schaltbare DNA-Systeme wichtige Anwendungen finden. So bieten schaltbare DNA-Hydrogele oder DNA-Schalter als Schließsystem für mesoporöse Materialien oder Nanoporen vielfältige Möglichkeiten zur kontrollierten Freisetzung von Wirkstoffen.

Im diesem Aufsatz beschreiben wir die Methoden zur Herstellung von DNA-Schaltern und diskutieren ihre möglichen Anwendungen. Es soll angemerkt werden, dass DNA-Schalter eine Unterklasse der DNA-Maschinen bilden, ein sich rasch entwickelndes Gebiet der DNA-Nanotechnologie.^[11] Während zum Bereich der DNA-Maschinen bereits ausführliche Übersichtsartikel erschienen sind, wurde das Feld der DNA-Schalter und dessen Einfluss auf die DNA-Nanotechnologie bislang unterschätzt. Daher sind wir der Meinung, dass der vorliegende Aufsatz neue Einblicke und Grundlagen zum Feld der „Mechano-DNA“ vermitteln kann.

2. Arten von DNA-Schaltern

2.1. Metallionen-gesteuerte DNA-Schalter

G-reiche Nukleinsäuresequenzen gehen metallioneninduzierte Übergänge von Random-Coils zu G-Quadruplexen ein.^[12] Durch die Wechselwirkung der Random-Coil-Nukleinsäuren mit den entsprechenden Ionen kommt es zur Selbstorganisation der G-Quadruplex-Nanostrukturen. Die ligandeninduzierte Eliminierung der stabilisierenden Metallionen trennt die G-Quadruplexe wieder in die Random-Coil-Stränge und erlaubt dadurch eine zyklisch schaltbare Rekonfiguration der Quadruplex-Strukturen. Ein solcher ioneninduzierter DNA-Schalter ist in Abbildung 3A veranschaulicht, wobei Pb^{2+} -Ionen eingesetzt werden, um die parallele G-Quadruplex-Struktur zu stabilisieren.^[13] Die Duplexstruktur **4/5** enthält in **4** eine G-Quadruplex-Sequenz in

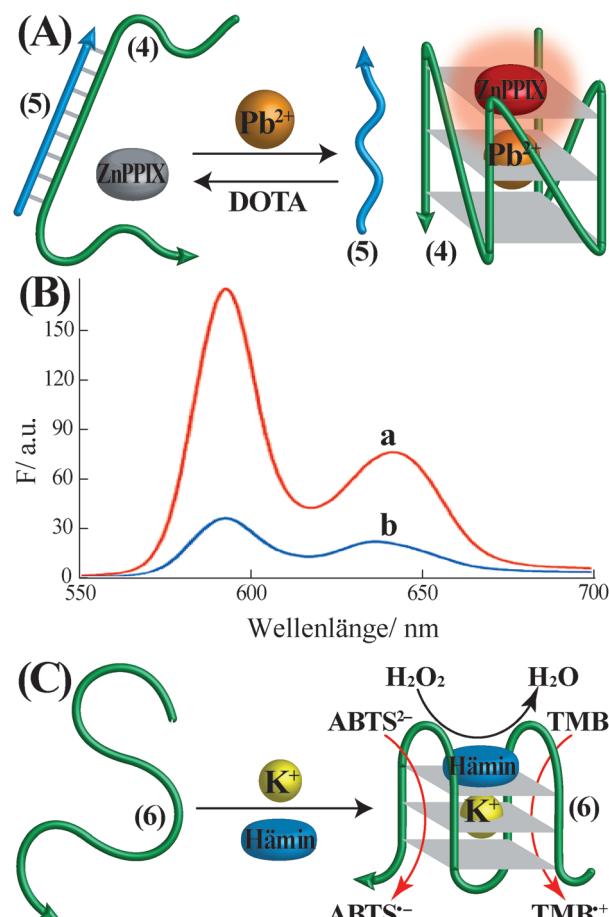


Abbildung 3. A) Schaltbare, Pb^{2+} -stimulierte Rekonfiguration einer Duplex-DNA-Struktur in die Pb^{2+} -stabilisierte G-Quadruplex-Struktur und die umgekehrte Spaltung des G-Quadruplexes durch Eliminierung der Pb^{2+} -Ionen mit dem DOTA-Liganden. Der Bildung und Dissoziation des G-Quadruplexes folgt die Bindung von Zn^{II} -Protoporphyrin IX (ZnPPIX) an den G-Quadruplex (starke Fluoreszenz) und die Lösung der Fluoreszenz von ZnPPIX nach Auflösung des G-Quadruplexes. B) Fluoreszenzspektren: a) ZnPPIX im Komplex mit dem durch Pb^{2+} -Ionen stabilisierten G-Quadruplex. b) Freies ZnPPIX, gebildet nach der DOTA-vermittelten Auflösung des G-Quadruplex und Bildung der 4/5-Duplexstruktur. Mit Genehmigung aus Lit. [13]. Copyright 2010 American Chemical Society. C) Durch K^+ -Ionen induzierter Übergang eines Random-Coil-DNA-Strangs in eine katalytisch aktive, die Meerrettichperoxidase(HRP)-imitierende Hämogen/G-Quadruplex-DNAzym-Nanostruktur.



Dr. Xiaoqing Liu ist Postdoktorandin bei Prof. Itamar Willner am Chemie-Institut der Hebrew University in Jerusalem. Sie studierte Chemie an der Shandong Normal University, China (B.S. 2003) und promovierte 2008 am Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences. Nach einem Postdoktorat mit Prof. K. V. Gothelf an der Aarhus University, Dänemark, wechselte sie 2010 nach Jerusalem. Ihre Forschungsinteressen gelten der Entwicklung optischer und elektrischer, DNA-basierter Sensoren sowie DNA-Maschinen.

einer blockierten (caged) Konfiguration. Die Behandlung der Duplexstruktur mit Pb^{2+} -Ionen führte zur Dissoziation von Strang **5** und zur Bildung des energetisch stabilisierten, Pb^{2+} -funktionalisierten parallelen G-Quadruplexes. Die Assoziation von Zn^{II} -Protoporphyrin IX (ZnPPIX) mit der G-Quadruplex-Struktur hatte eine starke Fluoreszenz des interkalierten Farbstoffs zur Folge (Abbildung 3B, Kurve a). Die anschließende Behandlung des Pb^{2+} -funktionalisierten G-Quadruplexes mit 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) als Ligand eliminierte die Pb^{2+} -Ionen aus dem G-Quadruplex, was die Auflösung der G-Quadruplex-Nanostruktur, die Rekombination der Stränge **4** und **5** in die Duplexstruktur **4/5** und die Freisetzung des ZnPPIX-Farbstoffs, der geringe Fluoreszenzintensität zeigt, nach sich

zog (Abbildung 3B, Kurve b). Durch die zyklische Behandlung der DNA-Duplexstruktur (**4/5**) mit Pb^{2+} -Ionen und der nachfolgenden Eliminierung der Pb^{2+} -Ionen aus der G-Quadruplex-Nanostruktur mittels DOTA wurde die Fluoreszenz des Systems reversibel zwischen hohen und niedrigen Werten umgeschaltet. Das Pb^{2+} -gesteuerte Umschalten der Duplexstruktur (**4/5**) zu den fluoreszierenden Pb^{2+} -modifizierten G-Quadruplex/ZnPPIX-Komplexen wurde für den quantitativen Nachweis von Pb^{2+} -Ionen (Nachweisgrenze 20 nm) verwendet. In gleicher Weise führte die Behandlung der G-reichen einzelsträngigen Nukleinsäure **6** mit K^+ -Ionen zur Anordnung in antiparallelen K^+ -stabilisierten G-Quadruplex-Strukturen^[14] (Abbildung 3C). Die Assoziation von Hämin mit dem G-Quadruplex ergab die Bildung eines katalytisch aktiven Hämin/G-Quadruplexes, eines Meerrettichperoxidase(HRP)-imitierenden DNAzyms, das die katalytische,

H_2O_2 -induzierte Oxidation von 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS²⁺) zum gefärbten Produkt ABTS⁺ anschaltete, oder mit H_2O_2 die Oxidation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zum gefärbten Produkt 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindiimin (TMB⁺) katalysierte. Diese Systeme wurden zur quantitativen Analyse von K^+ -Ionen eingesetzt.

Die K^+ -induzierte Bildung von G-Quadruplexen und die Dissoziation des G-Quartetts wurden durch schnelle Rasterkraftmikroskopie (AFM) auf Einzelmolekülebene abgebildet.^[15] Die Duplex-DNA-Strukturen L_1 und L_2 , die beide einen mittig positionierten Einzelstrangüberhang enthielten (Domänen i und ii, bestehend aus $\frac{3}{4}$ bzw. $\frac{1}{4}$ der G-Quadruplex-Sequenzen), wurden in ein DNA-Origami integriert (Abbildung 4A). In Gegenwart von K^+ -Ionen waren im resultierenden G-Quadruplex die Duplexe L_1 und L_2 zu einer

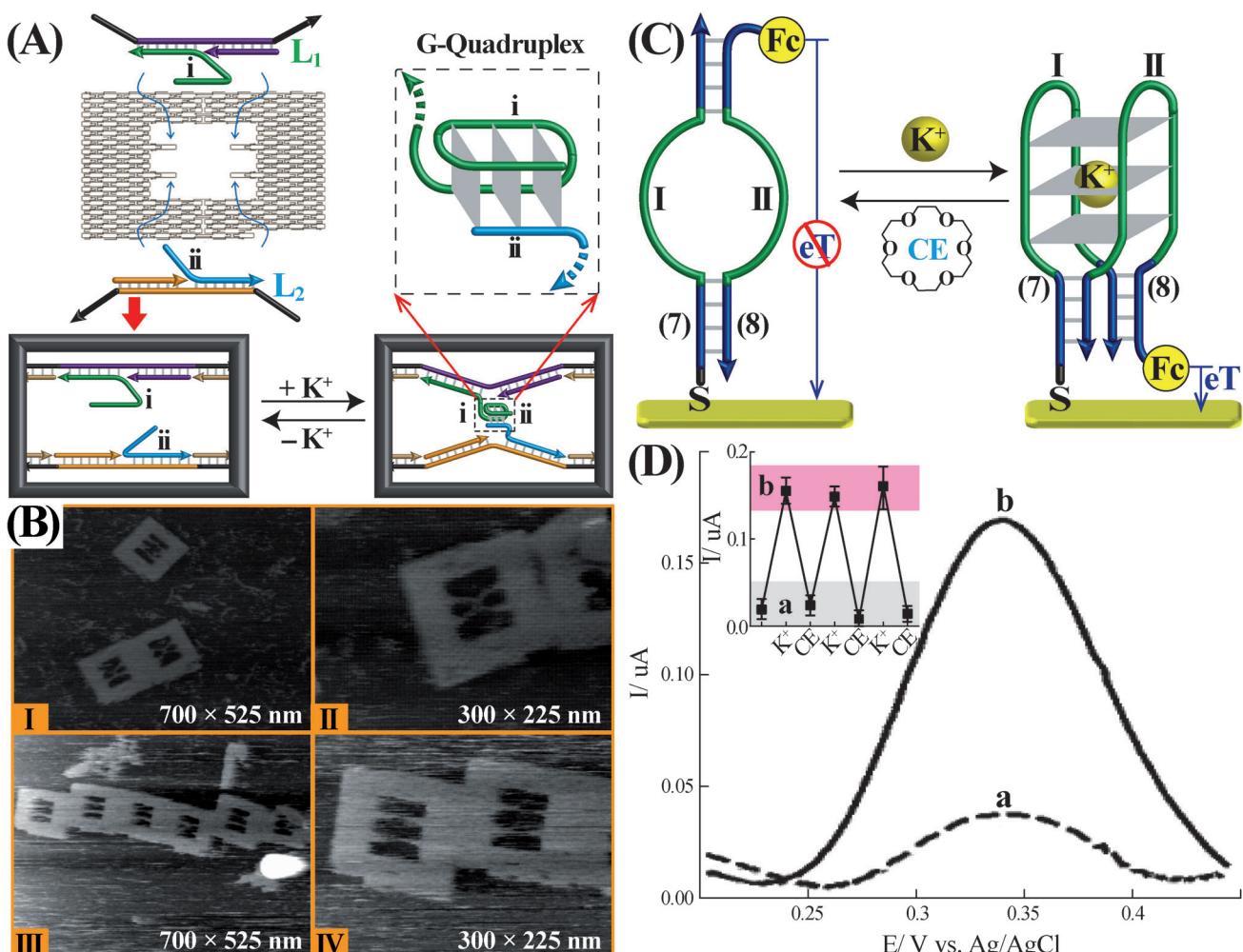


Abbildung 4. A) Schematische Bildung eines DNA-Origami-Rahmens, der überhängende Nukleinsäuren enthält, die K^+ -induzierte, schaltbare G-Quadruplex/Random-Coil-Strukturwechsel eingehen können. B) AFM-Bilder: Felder I und II zeigen den K^+ -stabilisierten G-Quadruplex im Origami-Rahmen. Felder III und IV zeigen den Random-Coil-Strang im Origami-Rahmen nach Eliminierung der K^+ -Ionen und Trennung des G-Quadruplexes. Mit Genehmigung aus Lit. [15]. Copyright 2010 American Chemical Society. C) Elektrochemische Transduktion einer Schleifen-haltigen DNA-Duplexstruktur zur G-Quadruplex-Struktur, assoziiert mit einer Au-Elektrode. Der Übergang der Schleifenstruktur zum G-Quadruplex wird durch Zugabe von K^+ -Ionen induziert, und die Trennung des G-Quadruplexes erfolgt nach Eliminierung der K^+ -Ionen aus der Nanostruktur durch Zugabe eines 18-Kronenethers (CE). D) Voltammetrische Signale für a) die Ferrocen-markierte Schleifenstruktur und b) Die Ferrocen-markierte, durch K^+ -Ionen stabilisierte G-Quadruplex-Struktur. Einschub: Zyklische voltammetrische Antworten auf die schaltbaren Übergänge zwischen der Schleifen-haltigen Duplexstruktur (a) und der G-Quadruplex-Struktur (b) in Anwesenheit eines 18-Kronenethers bzw. K^+ -Ionen. Mit Genehmigung aus Lit. [16]. Copyright 2010 Wiley-VCH.

X-förmigen Struktur verbrückt. Diese Struktur wurde dann durch Entfernung der K^+ -Ionen aus dem System aufgetrennt. Abbildung 4B zeigt die resultierende X-förmige, G-Quadruplex-verbrückte Struktur (Felder I und II) und die nach Entfernen der K^+ -Ionen gebildete, parallele Duplex-Struktur (Felder III und IV).

Der reversibel umschaltbare Übergang zwischen G-reichen Random-Coil-Nukleinsäuren und G-Quadruplex-Nanostrukturen wurde genutzt, um Elektronentransferreaktionen an Grenzflächen zu regulieren (Abbildung 4C).^[16] Die teilweise komplementäre Nukleinsäure-Duplex-Struktur (7/8) wurde auf Au-Elektroden aufgetragen, und der Redoxmarker Ferrocen (Fc) wurde an das 5'-Ende des Strangs 8 gebunden. Die Schleifendomänen I und II des Duplex bestehen aus den G-reichen Sequenzen. In Anwesenheit von K^+ -Ionen lagerten sich die G-haltigen DNA-Stränge in die G-Quadruplex-Struktur um, während die anschließende [18]Kronenether(CE)-stimulierte Eliminierung von K^+ aus dem Quadruplex die lineare Haarnadelstruktur wiederherstellte. Da die räumliche Trennung zwischen dem Redoxmarker (Fc) und den Elektroden durch die separierenden Nukleinsäuregerüste kontrolliert wird, bestimmt der DNA-Hauptstrang die Elektronentransfergeschwindigkeiten über die Grenzflächen und das voltammetrische Signal des Redoxmarkers. Die räumliche Trennung zwischen dem Redoxmarker Ferrocen und der Elektrode, die durch das lineare Haarnadelgerüst festgelegt ist, führt zu einem niedrigen voltammetrischen Signal (Abbildung 4D, Kurve a), wohingegen der G-Quadruplex durch die erzwungene Nähe zwischen dem Redoxmarker und der Elektrode das voltammetrische Signal verstärkt (Abbildung 4D, Kurve b). Durch die zyklische Rekonfiguration der oberflächenmodifizierten Elektrode zwischen der linearen Haarnadelstruktur und dem G-Quadruplex-Zustand wurden die voltammetrischen Signale des Redoxmarkers zwischen niedrigen bzw. hohen Werten umgeschaltet (Abbildung 4D, Einschub). In einer ähnlichen Studie wurde eine Elektrode mit einer Ferrocenmarkierten Random-Coil-Nukleinsäure, bestehend aus der G-reichen Sequenz, funktionalisiert.^[17] Die räumliche Trennung des Redoxmarkers von der Elektrode hatte einen ineffizienten Elektronentransfer über die Grenzfläche und ein schwaches voltammetrisches Signal zur Folge. Durch Behandlung der modifizierten Oberfläche mit K^+ -Ionen bildete sich der antiparallele G-Quadruplex, wodurch der Redoxmarker in die Nähe der Elektrode gebracht wurde. Dieser strukturelle Übergang verursachte einen effektiven Elektronentransfer an den Grenzflächen und ein starkes voltammetrisches Signal. Der durch K^+ -Ionen gesteuerte Wechsel der Random-Coil-Struktur zum G-Quadruplex wurde für den quantitativen Nachweis von K^+ -Ionen verwendet (Nachweisgrenze 100 μ M).

Es wurde gezeigt, dass Liganden und Übergangsmetallkomplexe Übergänge zwischen G-Quadruplexen und Random-Coil-Strukturen reversibel schalten können.^[18] Der Ligand Bismethylchinoliniumpyridindicarboxamid (9) zeigte eine hohe Bindungsaffinität zu der durch K^+ -Ionen stabilisierten G-Quadruplex-Struktur (10) (Abbildung 5A). Die Bindung von Cu^{2+} -Ionen an den Liganden 9 führte zur Dissoziation des G-Quadruplexes und zur Stabilisierung einer

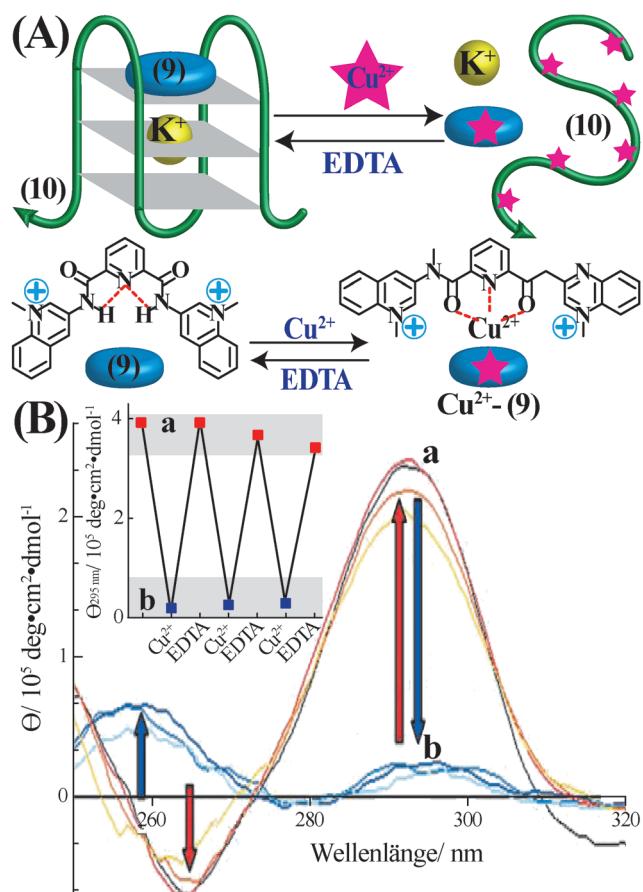


Abbildung 5. A) Ligand-vermittelte, umschaltbare G-Quadruplex/Random-Coil-Übergänge. Der Ligand 9 und K^+ -Ionen stabilisieren die G-Quadruplex-Struktur. Eliminierung des Liganden 9 aus dem G-Quadruplex führt zur Bildung des Cu^{2+} -9-Komplexes, was die Umwandlung von der G-Quadruplex- zur Random-Coil-Struktur bewirkt. Zugabe von EDTA spaltet den Cu^{2+} -9-Komplex durch die Bindung der Cu^{2+} -Ionen. Die Freisetzung von Ligand 9 stellt in Anwesenheit von K^+ -Ionen die G-Quadruplex-Struktur wieder her. B) Zirkulardichroismus (CD)-Spektren a) des durch Ligand 9 und K^+ -Ionen kooperativ stabilisierten G-Quadruplexes und b) des Random-Coil-Zustands nach Eliminierung von Ligand 9 durch die Bildung des Cu^{2+} -9-Komplexes. Einschub: Zyklische Wechsel der CD-Spektren nach Bildung des durch K^+ -Ionen/9-stabilisierten G-Quadruplexes (a), und nach Eliminierung der Stabilisator-Einheiten 9 durch die Bildung der Cu^{2+} -9-Komplexe (b). Mit Genehmigung aus Lit. [18]. Copyright 2008 Wiley-VCH.

helikalen DNA-Spirale durch elektrostatische Bindung der Cu^{2+} -Ligand-Komplexe (Cu^{2+} -9). Nachfolgende Entfernung der Cu^{2+} -Ionen vom Liganden durch Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) regenerierte den freien Dicarboxamid-Liganden (9) und die G-Quadruplex-Struktur. Die Übergänge zwischen G-Quadruplex und helikaler Spiralstruktur wurden mittels Zirkulardichroismus (CD) verfolgt (Abbildung 5B). Über eine CD-Bande bei $\lambda = 295$ nm wurde die Bildung des G-Quadruplexes beobachtet, und nach Auflösung des G-Quadruplexes durch Cu^{2+} -Ionen war diese Bande stark vermindert.

Nukleotidbasen fungieren als Liganden für verschiedene Metallionen. Beispielsweise liefert Thymin stabile Thymin- Hg^{2+} -Thymin(T-Hg $^{2+}$ -T)-Komplexe und Cytosin bildet Cy-

tosin- Ag^+ -Cytosin(C- Ag^+ -C)-Strukturen.^[4] Diese Komplexe können kooperativ die Bildung von DNA-Duplex-Strukturen stabilisieren. Nach Eliminierung der Metallionen aus Metallion-verbrückten Hybriden werden die Duplexe aufgetrennt und liefern damit durch Metallionen schaltbare Strukturen. Um durch Metallionen schaltbare DNA-Strukturen aufzubauen, wurden verschiedene Modelle entwickelt und optische oder elektrochemische Transduktionen der schaltbaren Funktionen der Systeme genutzt, um die molekularen DNA-Schalter zu detektieren. Abbildung 6 A zeigt z. B. eine an den

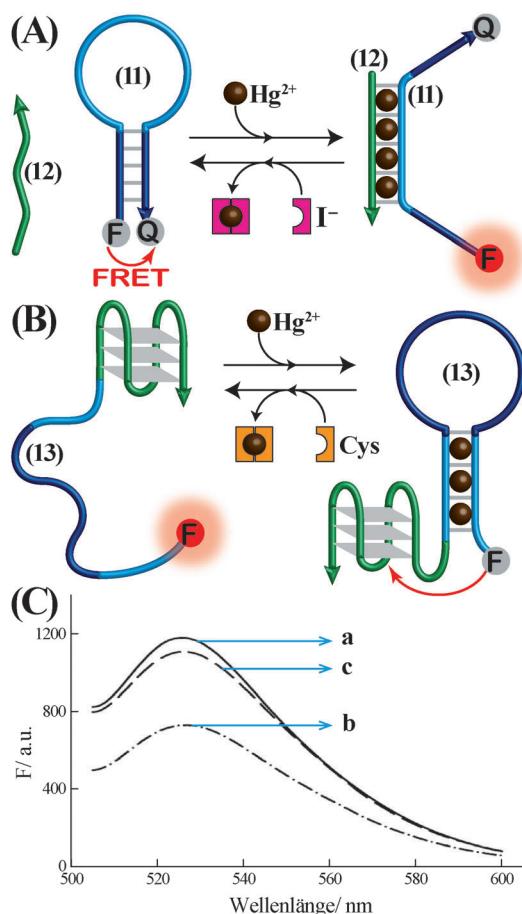


Abbildung 6. A) Schaltbare und reversible Übergänge einer DNA-Haarnadelstruktur in eine Duplex-Anordnung und zurück mit Hg^{2+} - und I^- -Ionen als Auslöser. B) Hg^{2+} /Cystein-gesteuerte, schaltbare Übergänge zwischen einer Random-Coil- und einer Hg^{2+} -verbrückten Haarnadel-Nanostruktur. Der G-Quadruplex fungiert als interner Quencher des Fluorophors (F). C) Fluoreszenzspektren a) der G-Quadruplex-markierten Random-Coil-DNA-Struktur, b) der G-Quadruplex-markierten, über Hg^{2+} -Ionen verbundenen Haarnadelstruktur und c) der nach Eliminierung der Hg^{2+} -Ionen und Auflösung der Haarnadelstruktur entstandenen G-Quadruplex-markierten Random-Coil-Struktur. Mit Genehmigung aus Lit. [20]. Copyright 2012 Royal Society of Chemistry.

3'- und 5'-Enden mit einem Fluorophor/Quencher-Paar (F/Q) funktionalisierte Haarnadelstruktur (**11**). In dieser Haarnadel-Konfiguration ist der Fluorophor effektiv gelöscht und liefert ein „AUS“-Fluoreszenzsignal. In Anwesenheit einer Helfer-Nukleinsäure (**12**), die zur Schleifendomäne der Haarnadel partiell komplementär ist, sowie zugefügter Hg^{2+} -Ionen wird die Haarnadel zur Duplex-Struktur **11/12** geöffnet, die durch komplementäre Basenpaare und T- Hg^{2+} -T-Brücken kooperativ stabilisiert wird. Die räumliche Trennung des Fluorophors (6-Carboxyfluorescein, FAM) vom Quencher (Black Hole Quencher-1, BHQ-1) führt zu einer ineffizienten Löschung des FAM und zu einem verstärkten Fluoreszenzsignal. Weitere Zugabe von I^- -Ionen entfernt die Hg^{2+} -Ionen aus der Duplex-Struktur **11/12**, führt zu deren Auf trennung und Rückführung des Strangs **11** in eine Haarnadelstruktur mit gelöschter Fluoreszenz des FAM.^[19] Abbildung 6 B beschreibt einen anderen Ansatz, um einen fluoreszierenden DNA-Schalter auf der Basis von T- Hg^{2+} -T-Brückeneinheiten zu konstruieren.^[20] Das System nutzt die Tatsache aus, dass der G-Quadruplex als Quencher von Fluorophoren wirkt. Folglich wurde die Nukleinsäure **13**, die aus dem an die T-reiche Einzelstrangdomäne gebundenen G-Quadruplex besteht und am 5'-Ende mit dem FAM-Fluorophor (F) verbunden ist, als funktionaler DNA-Schalter verwendet. Die räumliche Trennung zwischen dem FAM-Fluorophor und dem G-Quadruplex führte zur ineffizienten Löschung des Fluorophors und dem Fluoreszenzzustand „AN“ des Schalters (Abbildung 6 C, Kurve a). In Anwesenheit von Hg^{2+} -Ionen verläuft die intramolekulare Faltung der einzelsträngigen DNA **13** über die Bildung von T- Hg^{2+} -T-Brücken, was zu geringen Abständen zwischen dem FAM-Fluorophor und dem G-Quadruplex führt (Abbildung 6 C, Kurve b). Anschließende Behandlung des „AUS“-Zustandes mit Cystein (Cys) eliminierte die Hg^{2+} -Ionen aus der gefalteten Struktur und bewirkte die Regeneration der Haarnadelstruktur mit starker Fluoreszenz (Abbildung 6 C, Kurve c).

Ein DNA-basierter, elektrochemischer Schalter wurde unter Verwendung von T- Hg^{2+} -T-Brückeneinheiten auf Elektrodenoberflächen aufgebracht (Abbildung 7 A).^[21] Eine 3'-thiolierte Nukleinsäure (**14**), die zwei T-reiche Domänen I und II enthält, wurde auf einer Elektrodenoberfläche angeordnet. Das 5'-Ende von Strang **14** wurde mit dem redoxaktiven Marker Ferrocen (Fc) funktionalisiert. In der einzelsträngigen Random-Coil-Konfiguration ist der Redoxmarker räumlich von der Elektrode getrennt, was einen ineffizienten Elektronentransfer und somit ein schwaches voltammetrisches Signal in Zustand A nach sich zieht. In Gegenwart von Hg^{2+} -Ionen werden die Domänen I und II in eine T- Hg^{2+} -T-verbrückte Struktur gefaltet, worin der Fc-Redoxmarker nahe zur Elektrode gelangt. Dies resultiert in einem effizienten Elektronentransfer und einem großen voltammetrischen Signal in Zustand B. Die Cystein(Cys)-vermittelte Eliminierung der Hg^{2+} -Ionen regenerierte die Random-Coil-Konfiguration (Zustand A) mit schwachem voltammetrischen Signal. Durch die zyklische Behandlung der mit einer DNA-Monoschicht modifizierten Elektrode mit Hg^{2+} -Ionen und Cys wurden die voltammetrischen Signale zwischen hohen (AN)- und niedrigen (AUS)-Werten geschaltet (Abbildung 7 B).

Die kooperative Stabilisierung der DNA-Duplex-Strukturen durch T- Hg^{2+} -T und die Cys-vermittelte Trennung der Doppelstränge durch Entfernen der Hg^{2+} -Ionen wurde genutzt, um ein schaltbares DNAzym-System zu entwickeln (Abbildung 8 A).^[22] Dieses System besteht aus den Strängen **15**, **16** und **17**. Die Stränge **15** und **16** enthalten Untereinhei-

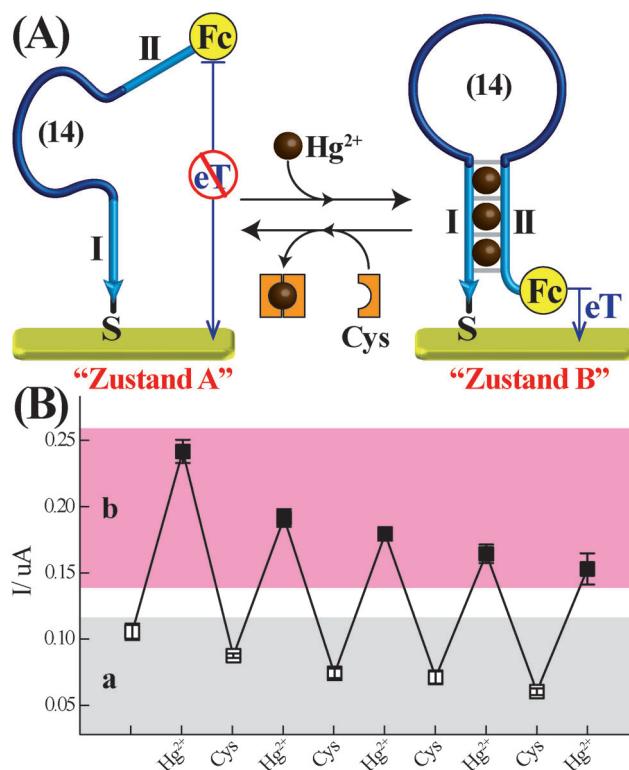


Abbildung 7. A) Elektrochemische Transduktion schaltbarer Hg^{2+} -Ion/Cystein-gesteuerter Übergänge zwischen einer Random-Coil- und einer Hg^{2+} -überbrückten Haarnadelstruktur, die an eine Elektrode gebunden sind. Der räumliche Abstand zwischen dem an den verschiedenen DNA-Strukturen gebundenen Redoxmarker Ferrocen (Fc) und der Elektrode bestimmt die voltammetrischen Antworten des Redoxmarkers Fc. B) Zyklische voltammetrische Signale a) in Gegenwart der Random-Coil-Struktur und b) der durch Hg^{2+} -Ionen überbrückten Haarnadelstruktur. Mit Genehmigung aus Lit. [21]. Copyright 2009 Royal Society of Chemistry.

ten analog zum HRP-imitierenden Hämin/G-Quadruplex-DNAzym. Jede dieser Sequenzen ist mit T-haltigen Domänen verlängert, die teilweise komplementär zu Strang **17** sind. In Abwesenheit von Hg^{2+} -Ionen war das Hämin/G-Quadruplex-DNAzym stabil, was zur katalytischen Entstehung von Chemilumineszenz über die DNAzym-vermittelte Oxidation von Luminol durch H_2O_2 führte (Zustand A). In Anwesenheit von Hg^{2+} -Ionen führte der durch die kooperative Bildung von T- Hg^{2+} -T-Brücken zwischen Strang **17** und den Anhängen der Stränge **15** und **16** gebildete Duplex zur Auf trennung der DNAzym-Struktur und zur Bildung der katalytisch inaktiven Komplexstruktur **15/16/17** (Zustand B, Abbildung 8 A). In dieser Anordnung war die Entstehung von Chemilumineszenz unterdrückt. Die Zugabe von Cystein (Cys) entfernte die Hg^{2+} -Ionen aus der Komplexstruktur **15/16/17** und initiierte die Auf trennung der Struktur sowie die Regeneration des katalytisch aktiven Hämin/G-Quadruplex-DNAzyms. Durch die zyklische Zugabe von Hg^{2+} -Ionen zum System im Zustand A, um zu Zustand B zu gelangen, und den Cys-vermittelten Übergang von Zustand B in Zustand A wurde die vom System generierte Chemilumineszenz zwischen „AN“- und „AUS“-Zuständen geschaltet (Abbildung 8 B).

In ähnlicher Weise wurde das Mg^{2+} -abhängige DNAzym durch Bildung oder Spaltung von T- Hg^{2+} -T-Komplexen „AN“ und „AUS“ geschaltet (Abbildung 8 C).^[23] Die Stränge **18** und **19** enthalten in den Domänen I und II die Sequenzen, die den DNAzym-Untereinheiten entsprechen, und die Domänen III und IV können mit dem Ribonukleobase-haltigen Substrat **20** hybridisieren. Die Domänen V und VI in den Strängen **18** und **19** weisen partiell Basenkomplementarität und T-Basen-Fehlpaarungen auf. Während in Abwesenheit von Hg^{2+} -Ionen die Bildung von stabilen Mg^{2+} -abhängigen DNAzym-Strukturen verhindert wird, bewirkte die Zugabe von Hg^{2+} -Ionen eine kooperative Stabilisierung der Mg^{2+} -abhängigen DNAzym-Struktur, die mit dem Substratstrang **20** hybridisierte. Die resultierende DNAzym/Substrat-Struktur katalysierte die hydrolytische Spaltung des Substrats. Da das Substrat mit einem Fluorophor/Quencher-Paar (F/Q) markiert war, führte die Spaltung des Substrats zu einem Fluorophor-markierten Produktfragment, das den Fluoreszenznachweis des Hg^{2+} -stimulierten, angeschalteten DNAzyms ermöglichte. Die Kombination des Systems mit magnetischen Partikeln (MP), die mit Liponsäure funktionalisiert waren, ermöglichte die Eliminierung der Hg^{2+} -Ionen aus den DNAzym-Nanostrukturen und die magnetische Abtrennung der Hg^{2+} -Ionen aus dem System. Daraus resultierten die Auf trennung der DNAzym-Untereinheiten und die Bildung eines katalytisch inaktiven Systems. Wiederzugabe von Hg^{2+} -Ionen zum System regenerierte die katalytisch aktive Struktur des DNAzyms. Durch die zyklische Behandlung des Systems bestehend aus den Strängen **18**, **19** und **20** mit Hg^{2+} -Ionen und Liponsäure-funktionalisierten magnetischen Partikeln wurde das Mg^{2+} -abhängige DNAzym zwischen „AN“- und „AUS“-Zuständen geschaltet (Abbildung 8 D).

Analog zu den T- Hg^{2+} -T-Brücken, die DNA-Duplex-Strukturen kooperativ stabilisieren, haben Cytosin- Ag^{+} -Cytosin($\text{C}-\text{Ag}^{+}-\text{C}$)-Brückenkomplexe ähnliche Anwendungen gefunden. Beispielsweise wurde der schaltbare und zyklische „AN“- und „AUS“-Betrieb des HRP-imitierenden Hämin/G-Quadruplex-DNAzyms auch mit Ag^{+} -Ionen und Cystein (Cys) als Auslöser beschrieben.^[24] Es sollte angemerkt werden, dass viele durch Ionen ausgelöste Schalter die Grundlage für die Entwicklung von Ionensensoren und Sensorregenerationssystemen bilden.^[25]

2.2. pH-gesteuerte DNA-Schalter

Die Selbstorganisation Cytosin-reicher i-Motive bei sauren pH-Werten (ca. 5.0) wurde als allgemeines Konzept für das Design schaltbarer DNA-Strukturen verwendet. Abbildung 9 A veranschaulicht dies anhand eines Systems, das aus der C-reichen Sequenz **21** und einer teilweise komplementären Sequenz **22** besteht.^[26] Die 5'- und 3'-Enden von Strang **21** wurden mit einem Fluorophor (F = Rhodamingrün, RhG) bzw. einem Quencher (Q = Dabcyl, Dab) funktionalisiert. Bei saurem pH (pH 5.0) wird das i-Motiv des Stranges **21** stabilisiert, worin das Fluorophor/Quencher-Paar eng benachbart ist und daher eine effektive Fluoreszenzlösung ermöglicht. Neutralisieren des Systems löste das i-Motiv auf und stimulierte die Bildung des Duplexes aus den Nuklein-

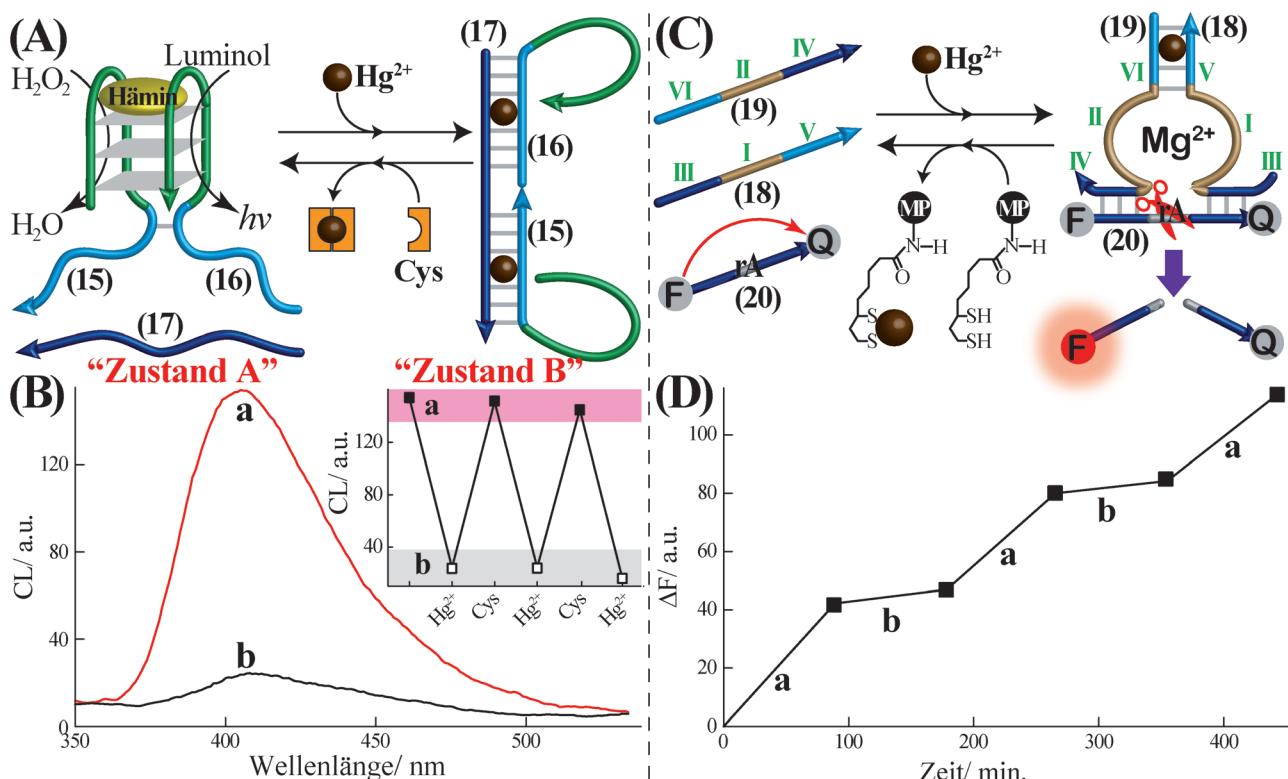


Abbildung 8. A) Hg²⁺-Ion/Cystein-gesteuerte, zyklisch schaltbare Umwandlung einer Hämogen/G-Quadruplex-DNA-Struktur, die aus den DNA-Strukturen 15 und 16 besteht, in eine katalytisch inaktive, Hg²⁺-stabilisierte Duplexstruktur. B) Untersuchung der Übergänge zwischen Hämogen/G-Quadruplex-DNA-Struktur und Duplex über die Hämogen/G-Quadruplex-DNA-Struktur-katalysierte Oxidation von Luminol durch H₂O₂ und die Entstehung von Chemilumineszenz: a) Chemilumineszenzspektrum des Hämogen/G-Quadruplex-DNA-enzymes. b) Chemilumineszenzspektrum der Hg²⁺-Ionen-stabilisierten Duplexstruktur. Einschub: Zyklische Chemilumineszenzintensitäten a) in Anwesenheit des Hämogen/G-Quadruplex-DNA-enzymes und b) der durch Hg²⁺-Ionen stabilisierten Duplexstruktur, erzeugt in Gegenwart von Cystein bzw. Hg²⁺-Ionen. Mit Genehmigung aus Lit. [22]. Copyright 2013 American Chemical Society. C) Hg²⁺-getriebene Bildung und katalytische Aktivierung des Mg²⁺-abhängigen DNA-enzymes, sowie das Ausschalten der katalytischen Funktionen des Systems durch Eliminierung der Hg²⁺-Ionen mit Liponsäure-funktionalisierten magnetischen Partikeln (MP). D) Schaltbare AN/AUS-Aktivierung des Mg²⁺-abhängigen DNA-enzymes: a) Nach Zugabe von Hg²⁺-Ionen. b) Nach Eliminierung der Hg²⁺-Ionen mit Liponsäure-modifizierten MPs. Mit Genehmigung aus Lit. [23]. Copyright 2010 Royal Society of Chemistry.

säuren **21** und **22**. Die räumliche Trennung von Fluorophor und Quencher führte nun zu einer verstärkten Fluoreszenz des Fluorophors. Die Durchführung reversibler pH-Zyklen mit pH 5.0 und pH 8.0 führte zur zyklisch schaltbaren Bildung von i-Motiven und DNA-Duplexen, die über die Fluoreszenzintensität des Fluorophors beobachtet wurde (Abbildung 9B).

Der pH-gesteuerte Übergang eines Nukleinsäure-Doppelstrangs zum i-Motiv wurde eingesetzt, um eine schaltbare Nanofeder zu entwickeln (Abbildung 10A).^[27] Der DNA-Ring α wurde separat durch die Nukleinsäuren **23** oder **24** vernetzt, um die Doppelring-Untereinheiten I bzw. II zu bilden. Daraufhin wurde der an beiden Enden mit einem Fluorophor/Quencher-Paar modifizierte Strang **25** verwendet, um die Untereinheiten I und II durch zwei zu Ring α komplementären Hybridisierungsdomänen zu überbrücken, wodurch oligomere Ketten aus den alternierenden Untereinheiten I und II, verbunden durch Strang **25** entstanden. Alle Brückenstränge **23**, **24** und **25** bestehen aus G-reichen Sequenzen, die bei pH 6.0 G-Quadruplexe bilden können. Die Brückenstränge wurden mit dem C-reichen Komplementärstrang **26** hybridisiert, um die verstiefe, ge-

streckte Federstruktur zu erhalten (Zustand I). Bei pH 6.0 wurde der C-reiche Strang **26** von den Duplexstrukturen freigesetzt und in Form des i-Motivs stabilisiert, während die Brückeneinheiten die verdichteten G-Quadruplex-Strukturen einnahmen und die komprimierte Federstruktur (Zustand II) lieferten. Durch den zyklischen Wechsel zwischen saurem (pH 6.0) und neutralem (pH 8.0) Milieu wurde das System reversibel zwischen gestauchten und gestreckten Federstrukturen umgeschaltet. Die Übergänge wurden mithilfe von Rasterkraftmikroskopie (AFM) und Fluoreszenzmessungen beobachtet. Abbildung 10B zeigt die zyklischen Veränderungen der Fluoreszenzintensität während der pH-gesteuerten Übergänge des Systems zwischen der gestreckten (Zustand I) und gestauchten (Zustand II) Federstruktur. Die zyklischen, pH-vermittelten Übergänge des Nanofedersystems zwischen den gestreckten und gestauchten Zuständen wurden ferner genutzt, um die Aggregation/Desaggregation von Au-Nanopartikel(Au-NP)-Ketten zu steuern (Abbildung 10C). Au-NPs wurden mit einer einzelnen Nukleinsäure (**26**) funktionalisiert, die zu den Brückensträngen **23**, **24** und **25** komplementär war. Die Hybridisierung der mit **26** modifizierten Au-NP mit den Federuntereinheiten führte bei

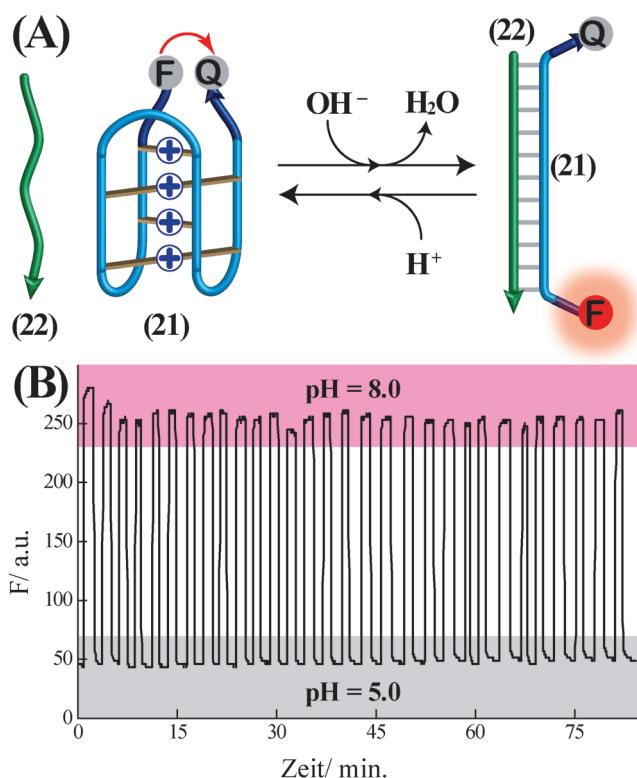


Abbildung 9. A) pH-gesteuerte Übergänge zwischen i-Motiv- und Duplexstrukturen. Die strukturellen Übergänge wurden anhand der Fluoreszenzintensitäten eines Fluorophors in Gegenwart einer Quencher-Einheit verfolgt. B) Zyklische Änderungen der Fluoreszenzintensität des Fluorophors, erzeugt von der i-Motiv-Struktur (pH 5.0, geringe Intensität) und der rekonfigurierten Duplexstruktur (pH 8.0, hohe Intensität). Mit Genehmigung aus Lit. [26]. Copyright 2003 Wiley-VCH.

pH 8.0 zu der gestreckten Au-NP-funktionalisierten Federstruktur, Zustand III (Abbildung 10C). Die transmissions-elektronenmikroskopische (TEM) Analyse der resultierenden Au-NP-Ketten ergab einen Partikelabstand von etwa 10 nm, im Einklang mit den Abständen zwischen den Ringen (Abbildung 10D, Bild a). Ansäuern des Systems auf pH 6.0 führte zur Abspaltung der mit **26** modifizierten Au-NPs und zur Bildung der gestauchten Nanofederstruktur, Zustand IV. Dieser Übergang wurde durch das TEM-Bild nachgewiesen, das einzelne Au-NPs erkennen ließ (Abbildung 10D, Bild b). Anschließendes Neutralisieren des Systems auf pH 8.0 stellte die mit Au-NP funktionalisierte, gestreckte Nanofederstruktur wieder her, um Ketten mit Partikelabständen von etwa 10 nm zu bilden (Abbildung 10D, Bild c).

Die pH-induzierten Strukturumwandlungen von DNA-Duplexen zu i-Motiven wurden weiterhin angewendet, um schaltbare DNAzym-Systeme zu entwickeln.^[28,29] Die C-reiche Sequenz, die bei saurem pH-Wert das i-Motiv bildet, kann bei neutralem pH mit einer G-reichen Sequenz hybridisieren, die eine G-Quadruplex-Struktur eingehen kann. Solche G-Quadruplexe können Hämin binden, um ein Meerrettichperoxidase-imitierendes Hämin/G-Quadruplex-DNAzym zu bilden.^[30] Folglich wurde die Haarnadelstruktur **27** so entworfen, dass sich in Domäne **a** die C-reiche Sequenz und in Domäne **b** die teilweise komplementäre G-reiche Se-

quenz befindet (Abbildung 11A).^[28] Die Hybridisierung zwischen den Domänen **a** und **b** ergab bei neutralem pH die energetisch stabilisierte Haarnadelstruktur, bei der die G-reiche Sequenz in einer Struktur eingeschlossen war, die keine G-Quadruplex-Konfiguration zuließ (Zustand I). Bei pH 5.2 wurde die C-reiche Sequenz in Form des i-Motivs stabilisiert, was zur Freilegung der G-reichen Sequenz und deren Faltung in die katalytisch aktive Hämin/G-Quadruplex-DNAzym-Struktur führte (Zustand II). Das resultierende DNAzym katalysierte die H_2O_2 -vermittelte Oxidation von ABTS²⁺ zum farbigen Produkt ABTS⁺ ($\lambda_{\text{max}} = 415 \text{ nm}$), das ein Auslesesignal für den katalytischen Prozess lieferte. Bei pH 7.0 wurde das i-Motiv von Zustand II aufgelöst, was den Wiederaufbau der energetisch stabilisierten Haarnadelstruktur von Zustand I zur Folge hatte, der die katalytischen Funktionen fehlten. Der zyklische Vorgang aus der Öffnung der Haarnadelstruktur in Zustand I bei pH 5.2 und der umgekehrten Wiederschließung der Haarnadelstruktur aus Zustand II bei neutralen Bedingungen (pH 7.0) ging einher mit dem reversiblen Wechsel zwischen „AN“ und „AUS“ der katalytischen Funktionen des HRP-imitierenden Hämin/G-Quadruplex-DNAzys (Abbildung 11B).

Die pH-gesteuerte Bildung und Auflösung der i-Motiv-Struktur wurde auch genutzt, um die katalytischen Funktionen des Mg^{2+} -abhängigen DNAzys reversibel an- und auszuschalten (Abbildung 11C).^[29] Die Nukleinsäuren **28** und **29** wurden als funktionale Untereinheiten verwendet, um die Aktivität des DNAzys über den pH-Wert der Umgebung zu kontrollieren. Die Domänen I und II von **28** bzw. **29** beinhalten die Basensequenzen der Mg^{2+} -abhängigen DNAzym-Untereinheiten und die Domänen III und IV die zum Ribonukleobase-haltigen Substrat **30** komplementären Sequenzen. Die entsprechenden Regionen V und VI in **28** und **29** bestehen aus C-reichen Domänen, die Untereinheiten der i-Motiv-Struktur sind. Die Sequenzen der Domänen VII und VIII in **28** und **29** enthalten nur drei komplementäre Basenpaare. Bei neutralem pH sind die DNAzym-Untereinheiten **28** und **29** sowie das DNAzym-Substrat **30** voneinander getrennt. Bei pH 5.8 wird das i-Motiv zwischen den Domänen V und VI gebildet und die katalytische Kernschleifenstruktur des DNAzys durch die kooperative Hybridisierung der Domänen VII/VIII und die i-Motiv-Nanostrukturen stabilisiert. Dies ermöglicht die Bindung von Substrat **30** an die supramolekulare DNAzym-Nanostruktur. In Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen wird das DNAzym aktiviert, das DNAzym-Substrat zu spalten. Da das Substrat mit einem Fluorophor/Quencher(F/Q)-Paar funktionalisiert ist, führt seine katalytische Spaltung zu einer fragmentierten, mit einem Fluorophor funktionalisierten Nukleinsäure, und die resultierende Fluoreszenz liefert ein Auslesesignal für die DNAzym-Aktivität. Anschließendes Neutralisieren des Systems führt zur Auf trennung des i-Motivs und der Auflösung des supramolekularen DNAzym-Komplexes in die getrennten DNAzym-Untereinheiten **28** und **29**, gleichbedeutend mit der Abschaltung der DNAzym-Funktionen des Systems. Durch einen zyklischen Wechsel des pH-Wertes zwischen 5.8 und 7.2 werden die katalytischen Funktionen des DNAzym-Systems reversibel zwischen „AN“- bzw. „AUS“-Zuständen umgeschaltet (Abbildung 11D).

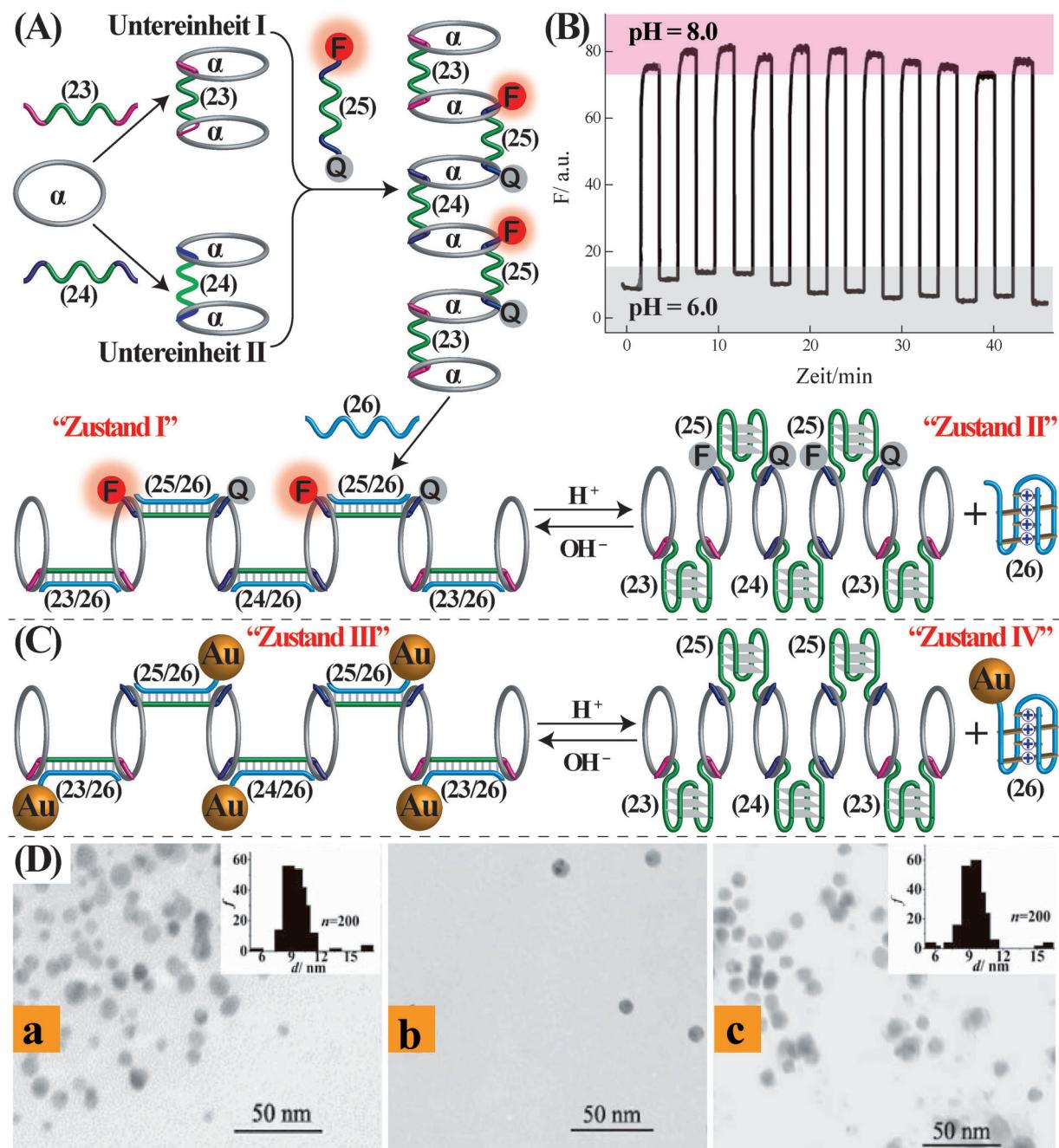


Abbildung 10. A) Synthese einer pH-gesteuerten DNA-Nanofeder und die zyklischen, pH-gesteuerten, schaltbaren Übergänge der Feder zwischen der gestreckten Konfiguration, Zustand I (pH 8.0), und der komprimierten Konfiguration, Zustand II (pH 6.0). Zur Untersuchung dieser Übergänge sind die Federeinheiten mit einem Fluorophor/Quencher-Paar markiert. Die gestreckte Konfiguration, Zustand I, generiert hohe Fluoreszenzintensitäten, während die komprimierte Konfiguration, Zustand II, geringe Fluoreszenzintensitäten aufweist. B) Fluoreszenzwechsel durch das pH-gesteuerte zyklische Umschalten der DNA-Nanofeder zwischen Zustand I (pH 8.0, starke Fluoreszenz) und Zustand II (pH 6.0, geringe Fluoreszenz). C) Funktionalisierung der DNA-Nanofeder mit Au-NPs mittels Nukleinsäure-funktionalisierten Au-NPs als Duplex-überbrückende Einheiten der gestreckten Nanofeder-Konfiguration. Ansäubern dieses Systems liefert die komprimierte G-Quadruplex-Nanofeder und die abgetrennten individuellen i-Motiv-funktionalisierten Au-NPs. D) TEM-Bilder und die entsprechenden Histogramme der interpartikulären Abstände a) der Au-NP-modifizierten, gestreckten Nanofeder bei pH 8.0, b) der nach Behandlung des Systems aus (a) bei pH 6.0 entstandenen Au-NPs sowie c) der Au-NP-Anordnungen, die durch Behandlung des Systems aus (b) bei pH 8.0 und Regeneration der gestreckten, Au-NP-modifizierten Nanofeder gebildet wurden. Mit Genehmigung aus Lit. [27]. Copyright 2010 Wiley-VCH.

Die pH-gesteuerten Übergänge zwischen i-Motiven und Random-Coil-Strängen wurden auch angewendet, um die Aggregation von Au-NPs zu kontrollieren.^[31] Während einzelne Au-NPs eine lokalisierte plasmonische Anregungsbän-

de ($\lambda \approx 530$ nm) aufweisen, führt die Aggregation von Au-NPs zu einer breiten interpartikulären Anregung gekoppelter Plasmonen ($\lambda > 560$ nm) und einem Farbübergang von Violett (einzelne NPs) zu Blau (aggregierte NPs). Solche Aggrega-

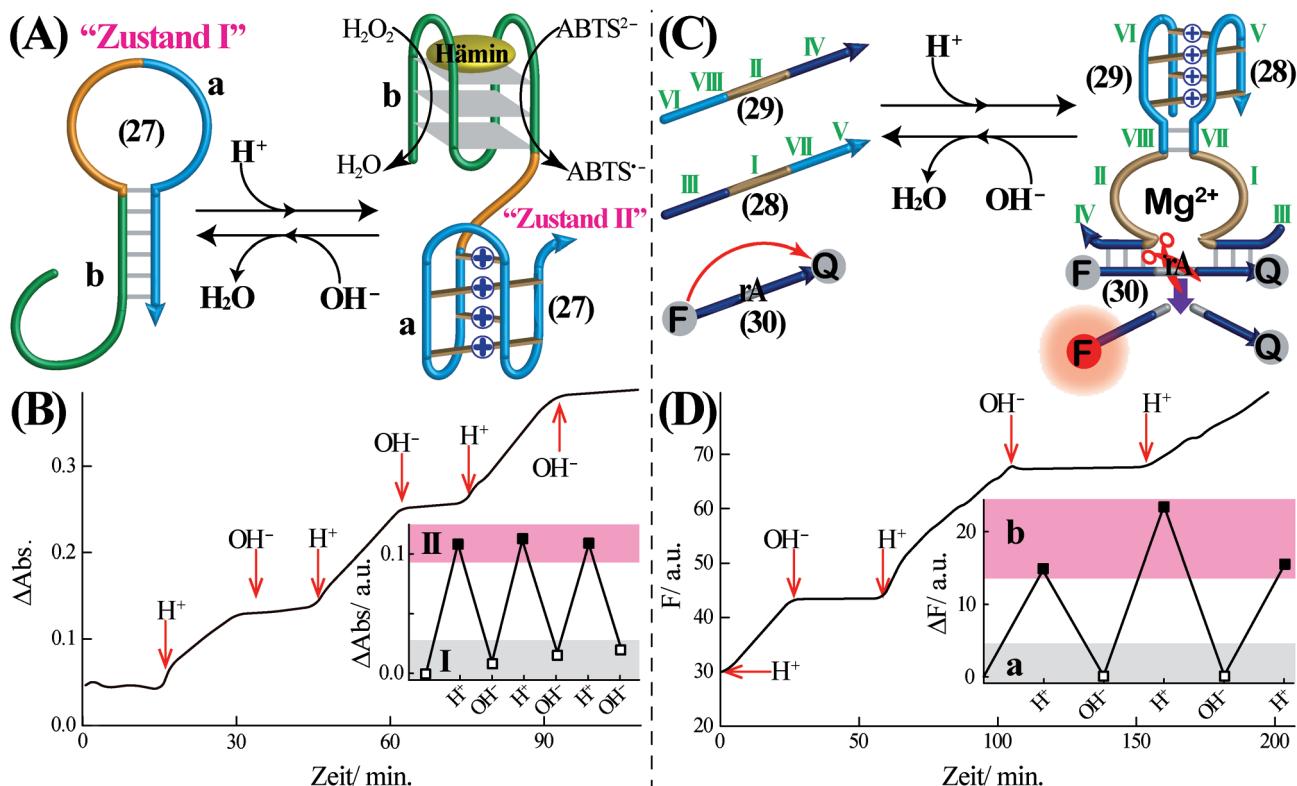


Abbildung 11. A) Zykliche pH-gesteuerte, schaltbare Übergänge einer funktionalen Haarnadelstruktur, Zustand I, in ein i-Motiv-Hämin/G-Quadruplex-Konjugat, Zustand II, und umgekehrt. Die Übergänge werden über die „AN“- und „AUS“-Aktivitäten des Hämin/G-Quadruplex-DNAzyms in den Zuständen II bzw. I nachverfolgt. B) Absorptionsänderungen bei der H⁺-induzierten Bildung des i-Motiv-Hämin/G-Quadruplex-DNAzym-Konjugats, Zustand II, das im „AN“-Zustand die H₂O₂-vermittelte Oxidation von ABTS²⁻ zu ABTS[·] katalysiert, und der OH⁻-induzierten Bildung des „AUS“-Zustandes, Zustand I. Einschub: Zykliche Absorptionsänderungen durch Umschalten des Systems zwischen Zustand I bzw. II. Mit Genehmigung aus Lit. [28]. Copyright 2011 Royal Society of Chemistry. C) Zykatisch schaltbare, pH-gesteuerte Anordnung und Auflösung des Mg²⁺-abhängigen DNAzyms mithilfe eines i-Motivs als Brückeneinheit. Das i-Motiv stabilisiert die DNAzym-Untereinheiten **28** und **29** kooperativ in der katalytisch aktiven DNAzym-Struktur. Die Aktivität des DNAzyms wird durch Fragmentierung des Fluorophor/Quencher-modifizierten Substrats und der darauf folgenden Erzeugung von Fluoreszenz beobachtet. D) Fluoreszenzänderungen nach der schaltbaren Aktivierung (H⁺) und Spaltung (OH⁻) des Mg²⁺-abhängigen DNAzyms. Einschub: Schaltbare Fluoreszenzänderungen nach der pH-gesteuerten „AN/AUS“-Aktivierung des DNAzyms. Mit Genehmigung aus Lit. [29]. Copyright 2010 Royal Society of Chemistry.

tionsphänomene von Au-NPs wurden ausgiebig genutzt, um verschiedene Sensoren und Biosensoren zu entwickeln.^[32] Abbildung 12 A stellt schematisch die pH-gesteuerte Aggregation von Au-NPs dar. Zwei Au-NP-Typen, I und II, wurden angefertigt, wobei Typ-I-Partikel mit der C-reichen Nukleinsäure **31** funktionalisiert und Typ-II-Partikel mit der zu Strang **31** komplementären Nukleinsäure **32** modifiziert wurden. Bei neutralem pH-Wert lieferte die Hybridisierung von **31** und **32** die aggregierten Au-NPs. Dagegen bildet der Strang **31** bei pH 5.0 das stabile i-Motiv, das eine Aggregation der Au-NPs verhindert. Setzt man die Aggregate einem sauren Milieu (pH 5.0) aus, so führt dies zur Trennung der Aggregate infolge der Stabilisierung der einzelnen, durch i-Motiv-DNA geschützten NPs. Durch abwechselndes Neutralisieren und Ansäuern wird die Aggregation der Au-NPs reversibel zwischen den „AN“- und „Aus“-Zuständen geschaltet (Abbildung 12B).

Der pH-gesteuerte Wechsel von DNA-Strukturen zwischen zwei Zuständen wurde auf Systeme ausgeweitet, die mechanischen Maschinen nachempfunden sind. Zum Beispiel zeigt Abbildung 13 A das pH-induzierte Öffnen und Schlie-

ßen von DNA-Pinzen. Das System besteht aus den beiden „Armen“ **33** und **34**, die über die Stränge **35** und **36** verbunden sind. Die Sequenzen I und II innerhalb der „Arme“ **33** und **34** beinhalten C-reiche Domänen, die bei pH 5.2 i-Motive bilden können. Der Brückenstrang **35** wurde an den 3'- und 5'-Enden mit einem Fluorophor/Quencher-Paar modifiziert, um den mechanischen Betrieb der DNA-Anordnung anzuzeigen. Bei pH 7.2 überbrückt die Verbindungsstränge **35** und **36** die „Arme“ **33** und **34**, um die geschlossene Struktur der Pinzette zu bilden (Zustand A). Die enge Nachbarschaft zwischen Fluorophor und Quencher führt zu einer effektiven Lösung des Fluorophors (Abbildung 13B, Kurve a). Ansäuern des Systems bewirkt den Übergang der Domänen I und II der „Arme“ in i-Motive. Dies führt zur Freisetzung der Brückeneinheit **36** und zur Öffnung der Pinzette (Zustand B). Die räumliche Trennung zwischen Fluorophor- und Quencher-Einheit im offenen Zustand der Pinzette bedingt eine weniger effektive Lösung und eine stärkere Fluoreszenz des Fluorophors (Abbildung 13B, Kurve b). Neutralisieren des Systems löst das i-Motiv auf, was die erneute Bindung des Brückenstrangs **36** an

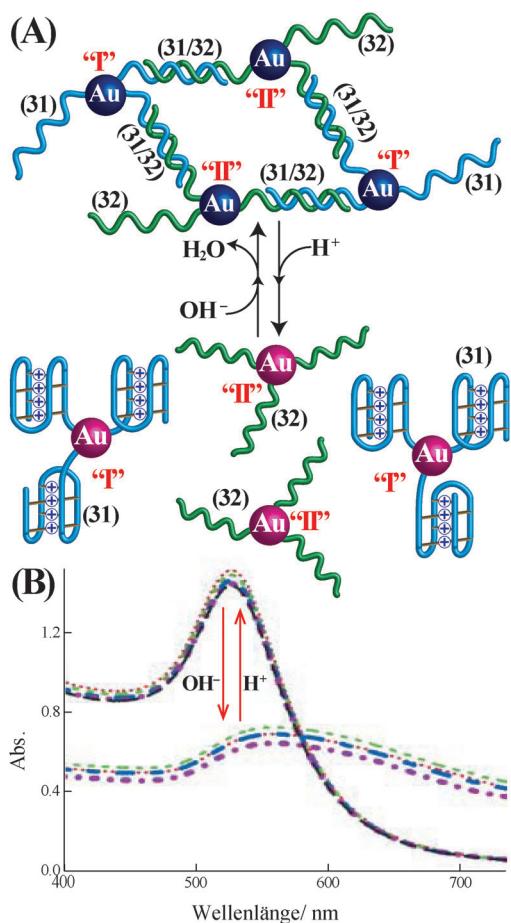


Abbildung 12. A) Zykisch schaltbare, pH-gesteuerte Aggregation und Desaggregation von Au-NPs. B) Absorptionspektren der getrennten Au-NPs (unter sauren Bedingungen) und der aggregierten Au-NPs (basische Bedingungen). Mit Genehmigung aus Lit. [31]. Copyright 2007 Royal Society of Chemistry.

die „Arme“ **33** und **34** und die Schließung der Pinzette nach sich zieht. Durch den Wechsel des molekularen DNA-Systems zwischen pH 5.2 und pH 7.2 pendelte die Pinzette zwischen offenen bzw. geschlossenen Zuständen (Abbildung 13B, Einschub). Ein ähnlicher Ansatz wurde zur pH-induzierten Rekonfiguration einer dreieckigen DNA-Nanostruktur verfolgt (Abbildung 13C).^[34] Das System bestand aus einem zweiarmigen Nukleinsäure-„Rahmen“ **37** und einem geschlossenen Schleifentemplat **38** mit den zum Rahmen komplementären Domänen III und IV sowie einer dritten, zum Hilfsstrang **39** komplementären C-reichen Domäne V. Unter neutralen Bedingungen ist der DNA-Verband zu einem DNA-Dreieck gespannt (Zustand C). Die 3'- und 5'-Enden des Rahmenstrangs **37** wurden so mit einem Fluorophor/Quencher-Paar markiert, dass die räumliche Trennung des Paares durch die Dreiecksstruktur eine ineffiziente Lösung der Fluorophore und ein starkes Fluoreszenzsignal ergab. Da die Domäne V des Templaats **38** C-reich ist, wird durch Ansäuern des Systems die i-Motiv-Struktur stabilisiert, Strang **39** freigesetzt und die DNA-Nanostruktur (Zustand D) aufgebaut. Die Nähe zwischen Fluorophor- und Quencher-Einheit in Zustand D ergab eine wirksame Fluoreszenzlösung. Neutralisieren des Systems löste das i-Motiv auf, was wieder zur Bindung des Hilfsstrangs **39** an die Domäne V auf Strang **38** und der Bildung der gestreckten dreieckigen DNA-Nanostruktur (Zustand C) führte. Durch abwechselndes Ansäuern und Neutralisieren des Systems wurde das DNA-Gerüst zwischen den Zuständen D und C umgeschaltet und die mechanischen Vorgänge der Maschine mittels schwacher und starker Fluoreszenzsignale nachverfolgt (Abbildung 13D). Auch verkettete DNA-Ringe (Catenane) wurden durch pH-induzierte Bildung/Auflösung einer i-Motiv-Struktur reversibel umgeschaltet.^[35] Unter Verwendung eines oszillierenden pH-Systems, das pH-Änderungen zwischen 5.2 und 6.9 ausführte, wurde die autonome Oszillation der verknüpften Catenane zwischen zwei Zuständen (ein „DNA-Pendel“) demonstriert.^[35] Auch wurden reversible pH-induzierte Walker auf DNA-Gerüsten beschrieben, die über Bildung oder Auflösung von i-Motiven gesteuert werden.^[36]

pH-induzierte Übergänge zwischen Random-Coil- und i-Motiv-Strukturen wurden auch auf Oberflächen, vor allem auf leitenden Oberflächen (Elektroden) untersucht. Die strukturellen Übergänge führten zur Etablierung von elektrischen oder photoelektrochemischen, DNA-basierten Schaltern und zur Kontrolle des Elektronentransfers an Elektrodenoberflächen. Abbildung 14A zeigt die schematische Funktionsweise eines pH-gesteuerten elektrochemischen Schalters.^[37] Die thiolisierte Nukleinsäure **40** wurde auf einer Elektrodenoberfläche angeordnet und mit der teilweise dazu komplementären, Ferrocen-markierten Nukleinsäure **41** hybridisiert. Die beiden Stränge enthalten die nicht-komplementären, C-reichen Domänen I und II. Der resultierende versteifte Hybrid-Duplex **40/41**, der bei pH 8.0 vorliegt, verursacht eine räumliche Trennung des Redoxmarkers Ferrocen von der Elektrodenoberfläche, woraus ein schwacher Elektronenaustausch mit der Elektrode und ein schwaches voltammetrisches Signal resultieren (Abbildung 14B, Kurve a). Ansäuern der Elektrolytlösung auf pH 5.8 veranlasst die Umlagerung der Duplexstruktur zu einem i-Motiv, in dem sich der Redoxmarker Ferrocen in enger Nähe zur Elektrodenoberfläche befindet. Dies führt zu einem effektiven elektrischen Kontakt zwischen dem Redoxmarker und der Elektrode, was sich in einem starken voltammetrischen Signal widerspiegelt (Abbildung 14B, Kurve b). Durch die periodische Änderung des pH-Werts in der Elektrolytlösung zwischen pH 8.0 und pH 5.8 wurden die voltammetrischen Signale des Systems zwischen geringen und hohen Werten geschaltet (Abbildung 14B, Einschub). Die pH-induzierte Kontrolle der voltammetrischen Signale einer Elektroden-assoziierten, Ferrocen-markierten DNA, die schaltbare Übergänge von Random-Coil- zu i-Motiv-Strukturen ermöglicht, wurde auch zur Entwicklung elektrochemischer pH-Sensoren angewendet.^[38]

Ein ähnlicher Ansatz wurde genutzt, um einen DNA-basierten photoelektrochemischen Schalter zu entwickeln (Abbildung 14C).^[39] Eine 5'-thiolisierte Nukleinsäure **42**, bestehend aus einer C-reichen Sequenz, wurde auf eine Au-Elektrode aufgebracht und am 3'-Ende mit CdSe/ZnS-Quantenpunkten (QDs) modifiziert. Bei saurem pH (pH 5.0) faltete sich die Nukleinsäure **42** in ein i-Motiv, wodurch die

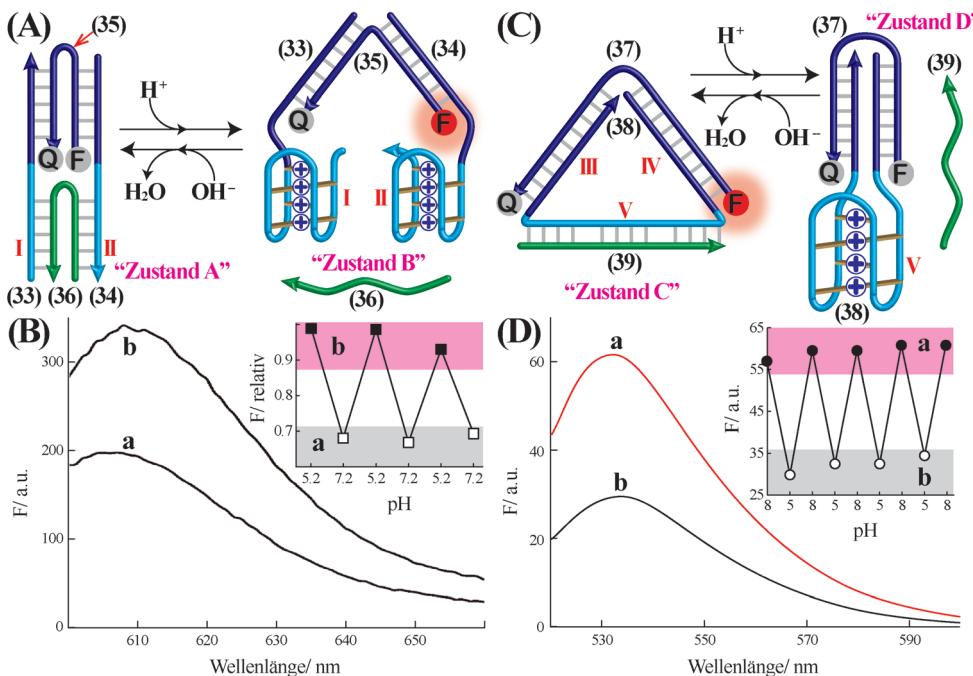


Abbildung 13. A) pH-gesteuerte, zyklisch schaltbare Öffnung und Schließung einer DNA-Pinze. Die mechanische Funktion des Systems wird mittels Markierung der Pinzetteneinheit mit einem Fluorophor/Quencher-Paar verfolgt (offene Pinze: starke Fluoreszenzintensität, geschlossene Pinze: niedrige Fluoreszenzintensität). B) Fluoreszenzspektren von a) der geschlossenen Pinze und b) der offenen Pinze. Einschub: Zyklische Änderungen der Fluoreszenzintensität als Reaktion auf das Umschalten der Pinze zwischen geschlossenem (a) und offenem Zustand (b). Mit Genehmigung aus Lit. [33]. Copyright 2009 American Chemical Society. C) pH-gesteuerte, zyklisch schaltbare Rekonfiguration einer DNA-Dreiecksstruktur. Das System wechselt hierbei zwischen einer gestreckten Struktur und einer i-Motiv-gestützten, komprimierten Struktur. Die Übergänge werden durch Beobachtung der Fluoreszenzeigenschaften des mit einem Fluorophor/Quencher-Paar functionalisierten Systems detektiert. D) Fluoreszenzspektren von a) der gestreckten Struktur und b) der komprimierten Struktur. Einschub: Schaltbare Änderungen der Fluoreszenzintensität durch reversible, pH-gesteuerte Umwandlung der gestreckten Struktur (starke Fluoreszenz) in die komprimierte, i-Motiv-bedingte Struktur (geringe Fluoreszenz) und zurück. Mit Genehmigung aus Lit. [34]. Copyright 2009 Royal Society of Chemistry.

QDs und die Elektrodenoberfläche eng benachbart waren. Dies führte zur Entstehung eines starken Photostroms. Der Photostrom wurde der Injektion photoangeregter Leitungsbandelektronen an die Elektrode und der nachfolgenden Oxidation von Wasser zu O₂ durch die Valenzbandlöcher zugeschrieben. Nach Neutralisieren des Systems und Zugabe des Hilfsstrangs **43**, der zu **42** komplementär ist, löste sich das i-Motiv auf und bildete den versteiften QD-funktionalisierten Doppelstrang. Dies führte zur räumlichen Trennung der QDs von der Elektrode und folglich zu einem ineffizienten Elektronentransfer aus dem Leitungsband in die Elektrode und zur Blockade des Photostroms. Diese modifizierten Elektroden lieferten bei zyklischen pH-Änderungen zwischen 5.0 und 8.0 an- und ausschaltbare Photoströme (Abbildung 14D).

Die interfacialen Elektronentransfereigenschaften der C-reichen, mit einer DNA-Monoschicht modifizierten Elektroden wurden durch pH-gesteuerte Übergänge zwischen Random-Coil- und i-Motiv-Konfigurationen geschaltet (Abbildung 15A).^[40] Eine thioierte Nukleinsäure **44**, bestehend aus einer C-reichen Sequenz, wurde an eine Au-Elektrode angeheftet. Die mit der Random-Coil-DNA-Monoschicht

verbundene negative Ladung stieß negativ geladene, in der Elektrolytlösung gelöste Redoxmarker (z. B. [Fe(CN)₆]^{3-/4-}) ab, wodurch der interfaciale Elektronentransferwiderstand anstieg (Abbildung 15B, Kurve a). Die pH-gesteuerte Bildung der i-Motiv-Struktur zwischen protonierten Cytosin-Basen verringerte die mit der Elektrode assoziierte, negative Ladung, womit der Elektronentransferwiderstand reduziert wurde (Abbildung 15B, Kurve b). Die entsprechenden interfacialen Elektronentransferwiderstände wurden mittels Faradayscher Impedanz-Spektroskopie gemessen. Die mit einer Random-Coil-Monoschicht modifizierte Elektrode zeigte einen hohen interfacialen Elektronentransferwiderstand ($R_{et} = 500 \Omega$), während die mit der i-Motiv-Monoschicht functionalisierte Elektrode einen geringeren Elektronentransferwiderstand aufwies ($R_{et} = 300 \Omega$). Durch zyklische pH-Änderung der Elektrolytlösung zwischen den Werten 5.8 und 7.0 wurden die Elektronentransferwiderstände zwischen niedrigen und hohen Werten umgeschaltet (Abbildung 15C).

Die pH-abhängige Steuerung der Fluoreszeigenschaften einer Fluorophor-modifizierten i-Motiv-Monoschicht auf einer Elektrode wurde durch den reversiblen, pH-induzierten Übergang von i-Motiv zu Duplex-DNA demonstriert (Abbildung 15D).^[41] In der Fluorophor-modifizierten i-Motiv-Monoschicht **45** wird der Fluorophor aufgrund der Nähe zur metallischen Oberfläche effektiv gelöscht. Neutralisieren des Systems und Anwesenheit des zu **45** komplementären Hilfsstrangs **46** führte zur Dissoziation der i-Motiv-Struktur und der Hybridisierung der Nukleinsäuren **45** und **46**. Die Versteifung des Fluorophor-gebundenen Strangs durch Bildung der **45/46**-Duplexstruktur und die räumliche Trennung des Fluorophors von der Oberfläche resultieren in einer ineffizienten Löschung des Fluorophors und Auslösung von Fluoreszenz. Durch zyklische pH-Änderungen zwischen pH 5.2 und pH 7.2 wurde das System zwischen i-Motiv- (geringe Fluoreszenz) und Duplex-Strukturen (starke Fluoreszenz) umgeschaltet. Die autonomen, oszillatorischen Übergänge zwischen Random-Coil- und i-Motiv-Strukturen auf Oberflächen mithilfe eines oszillatorischen pH-Systems

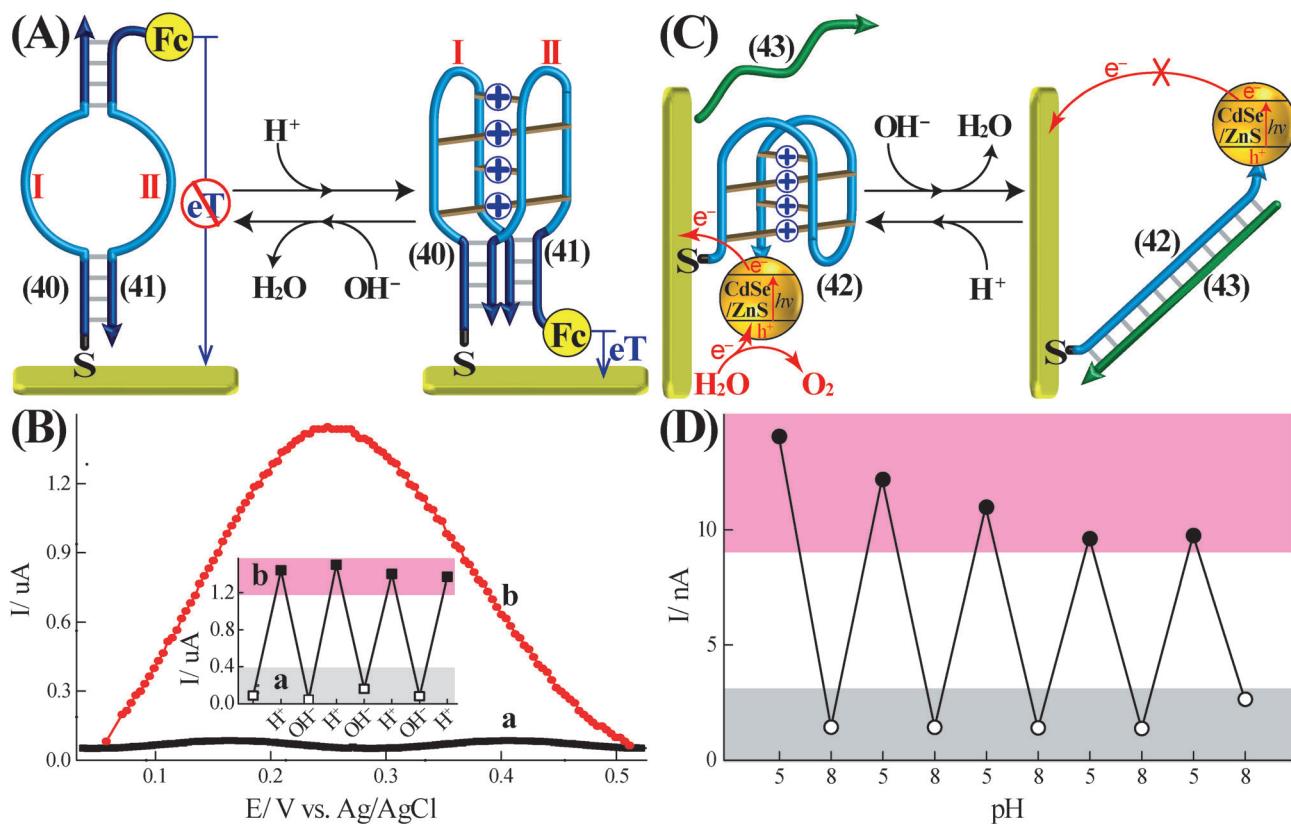


Abbildung 14. A) Elektrochemische Transduktionen der pH-gesteuerten, zyklisch schaltbaren Rekonfiguration einer redoxmarkierten DNA-Struktur auf einer Elektrodenoberfläche. Die Rekonfiguration verläuft zwischen einer Ferrocen-markierten schleifenhaltigen Duplexstruktur (pH 8.0) und einer Ferrocen-markierten i-Motiv-Struktur (pH 5.8). B) Voltammetrische Signale der Ferrocen-markierten DNA-Nanostrukturen: a) in der Schleife-Duplex-Konfiguration, b) in der i-Motiv-Konfiguration. Einschub: CV-Signale nach pH-Wechsel der modifizierten Elektrode zwischen a) der Schleife-Duplex-Struktur und b) der i-Motiv-Struktur. Mit Genehmigung aus Lit. [37]. Copyright 2012, Elsevier. C) Photoelektrochemische Transduktionen der pH-gesteuerten Übergänge zwischen i-Motiv-funktionalisierten CdS-NPs und mit Duplex-DNA modifizierten CdS-NPs. Die i-Motiv-funktionalisierten CdS-NPs (pH 5.0), die die Elektrode modifizieren, liefern aufgrund des geringen Abstands zwischen den NPs und der Elektrode einen starken Photostrom. Die Auflösung der i-Motiv-Struktur (pH 8.0) und die Versteifung der separierten Strände durch den 42/43-Duplex trennt die CdS-NP räumlich von der Elektrode und unterbindet dadurch den Photostrom. D) Zyklisch pH-induzierte Photoströme nach reversiblen Übergängen zwischen den i-Motiv-CdS-NPs (pH 5.0) und den Duplex-DNA-Cd-NPs (pH 8.0). Mit Genehmigung aus Lit. [39]. Copyright 2009 Royal Society of Chemistry.

wurden auch mittels Fluoreszenzspektroskopie beobachtet (Abbildung 15E).^[42] Eine Au-Oberfläche wurde mit einer 5'-thiolierten Nukleinsäure **47** modifiziert, die am 3'-Ende mit einem Fluorophor (F = Rhodamingrün) funktionalisiert war. In der Random-Coil-Konfiguration bei pH 7.0 war der Fluorophor räumlich von der Au-Oberfläche getrennt, was zur ineffizienten Lösung des Fluorophors führte (Abbildung 15F, Kurve a). Dagegen faltete sich die Monoschicht von **47** bei pH 5.5 in ein i-Motiv mit engem Kontakt zwischen Fluorophor und Au-Oberfläche. Dies resultiert in einer effektiven Lösung des Fluorophors (Abbildung 15F, Kurve b). Die Fluorophor-markierte, mit einer DNA-Monoschicht modifizierte Au-Oberfläche wurde einem chemischen oszillierenden pH-System, bestehend aus NaIO₃/Na₂SO₃/Na₂S₂O₃/H₂SO₄, ausgesetzt. Die entstehenden pH-Oszillationen des Systems zwischen den Werten 5.5 und 6.2 führten zum zyklischen Wechsel der Monoschicht von **47** zwischen i-Motiv- und Random-Coil-Konfigurationen und lieferten überlappende, oszillierende Fluoreszenzsignale zwischen niedrigen (pH 5.5) und hohen (pH 6.3) Werten (Abbildung 15G).

Analog wurden pH-getriebene, oszillierende Übergänge zwischen einer i-Motiv-Struktur und einer Random-Coil-Konfiguration durch Fluoreszenzspektroskopie in Lösung abgebildet.^[43]

2.3. Lichtgesteuerte DNA-Schalter

Die Wechselwirkung photoisomerisierbarer Verbindungen mit Duplex-DNA könnte mithilfe von Licht die Stabilität der resultierenden doppelsträngigen DNA-Strukturen kontrollieren. Insbesondere bei photoisomerisierbaren Azobenzolverbindungen beobachtete man Interaktionen mit DNA. Azobenzolverbindungen durchlaufen eine *trans*-*cis*-Photoisomerisierung (bei UV-Bestrahlung) und umgekehrt eine *cis*-*trans*-Photoisomerisierung (bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht). Es wurde nachgewiesen, dass *trans*-Azobenzol-Einheiten durch π - π -Wechselwirkungen in Duplex-DNA-Strukturen interkalieren. Dieser Prozess führt zur kooperativen Stabilisierung der Duplexstrukturen. *cis*-Azobenzol dagegen

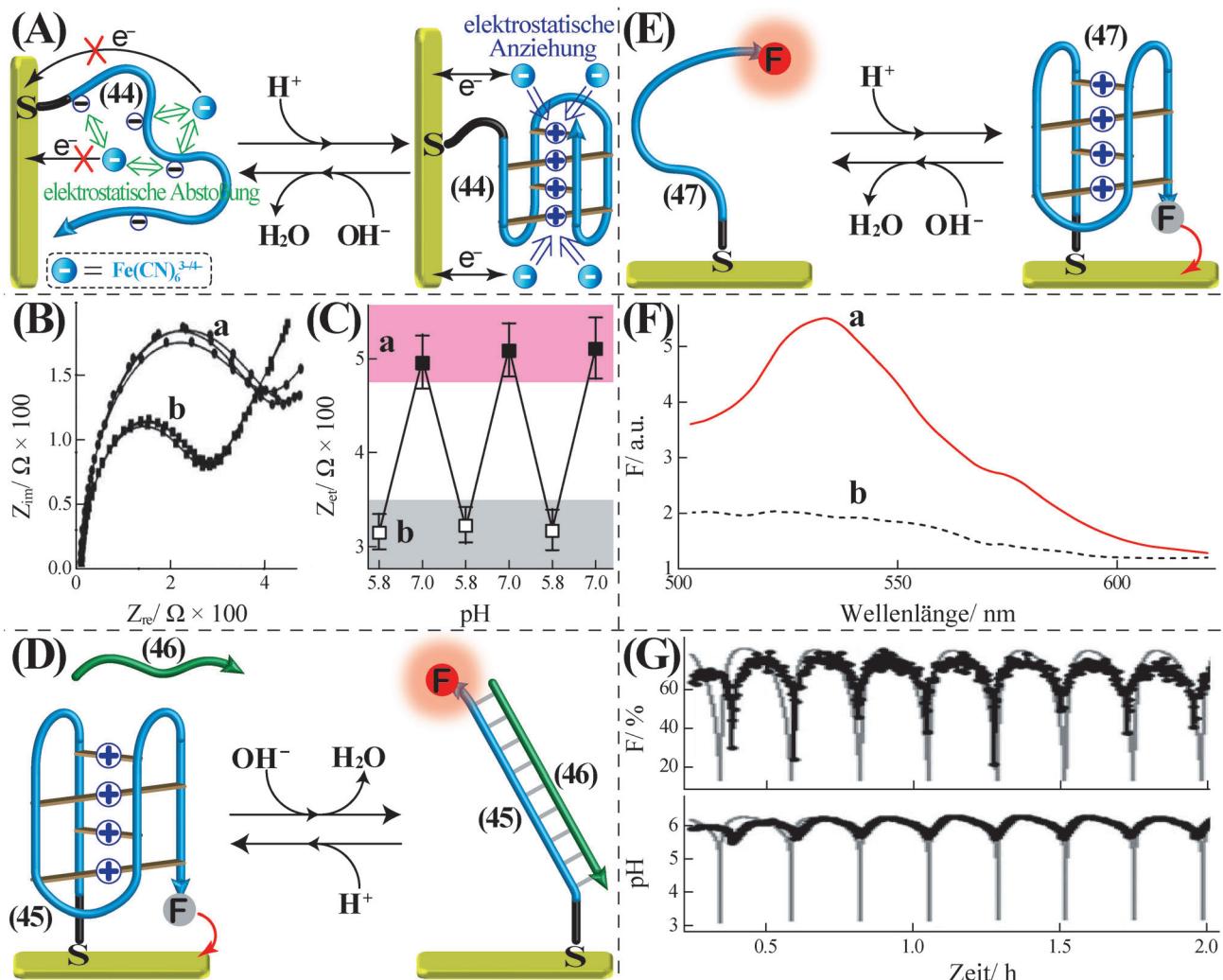


Abbildung 15. A) Steuerung der Elektronentransferwiderstände an der Grenzfläche zu einer Au-Elektrode durch pH-induzierte Übergänge zwischen einer Random-Coil-Nukleinsäure (pH 7.0) und einer i-Motiv-Struktur (pH 5.8). Die interfacialen Elektronentransferwiderstände wurden durch Impedanzspektroskopie mit $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/-4-}$ als Redoxsensor gemessen. B) Impedanzspektren von a) der Random-Coil-DNA-modifizierten Elektrode (pH 7.0) und b) der i-Motiv-modifizierten Elektrode (pH 5.8). C) Periodische interfaciale Elektronentransferwiderstände durch reversibles Umschalten der einschichtig mit DNA modifizierten Elektrode zwischen a) Random-Coil- und b) i-Motiv-Nanostrukturen. Mit Genehmigung aus Lit. [40]. Copyright 2013 Royal Society of Chemistry. D) Fluoreszenzuntersuchung der zyklisch schaltbaren Übergänge zwischen einer i-Motiv-DNA-Struktur und einer versteiften Duplexstruktur, angelagert an eine Au-Oberfläche. E) Fluoreszenzuntersuchung der Übergänge von Random-Coil zu i-Motiv mithilfe einer an eine Au-Oberfläche angelagerten, Fluorophor-modifizierten DNA-Monoschicht. F) Fluoreszenzspektren von a) der Random-Coil-Konfiguration und b) der i-Motiv-Konfiguration. G) Autonome Fluoreszenzänderungen nach Einbringen des in (E) gezeigten Systems in ein oszillierendes pH-System. Mit Genehmigung aus Lit. [42]. Copyright 2006 Wiley-VCH.

hat keine Affinität zur Duplex-DNA und stabilisiert somit die Nukleinsäure-Duplex-Strukturen nicht.^[44,45] Diese grundlegenden Wechselwirkungen zwischen den photoisomerisierbaren Azobenzolverbindungen und doppelsträngigen Nukleinsäuren wurde verwendet, um zyklisch lichtgesteuerte DNA-Schalter zu entwickeln, die reversible Übergänge von Duplex- in Random-Coil-Strukturen eingehen (Abbildung 16 A).^[46] Die Nukleinsäure **48** wird in der Haarnadelstruktur durch kooperative Wechselwirkungen, bestehend aus Basenpaarungen und den interkalierten *trans*-Azobenzol-Chromophoren, stabilisiert. Nach Modifizierung der Haarnadelstruktur an den 5'- und 3'-Enden mit einem Fluorophor/Quencher-Paar, erfolgt die effiziente Lösung des Fluorophors und somit geringe Fluoreszenz, Zustand I. Die UV-

induzierte Photoisomerisierung von *trans*-Azobenzol zu *cis*-Azobenzol resultiert in einer mangelnden Affinität der Chromophore zur Stammregion der Haarnadel. Dies verursacht die Auflösung der Haarnadel in eine Random-Coil-Struktur mit starker Fluoreszenz, Zustand II. Die umgekehrte, durch sichtbares Licht induzierte Photoisomerisierung der *cis*-Azobenzol-Einheiten zu *trans*-Azobenzol-Verbindungen regeneriert die *trans*-Azobenzol-stabilisierte Haarnadelstruktur mit geringer Fluoreszenz, Zustand I. Durch die zyklische Photoisomerisierung der Azobenzoleinheiten zwischen den *trans*- und *cis*-Zuständen wechselt die Nukleinsäure reversibel zwischen der Haarnadelstruktur (Zustand I) mit geringer Fluoreszenz und der Random-Coil-Konfiguration (Zustand II) mit hoher Fluoreszenz (Abbil-

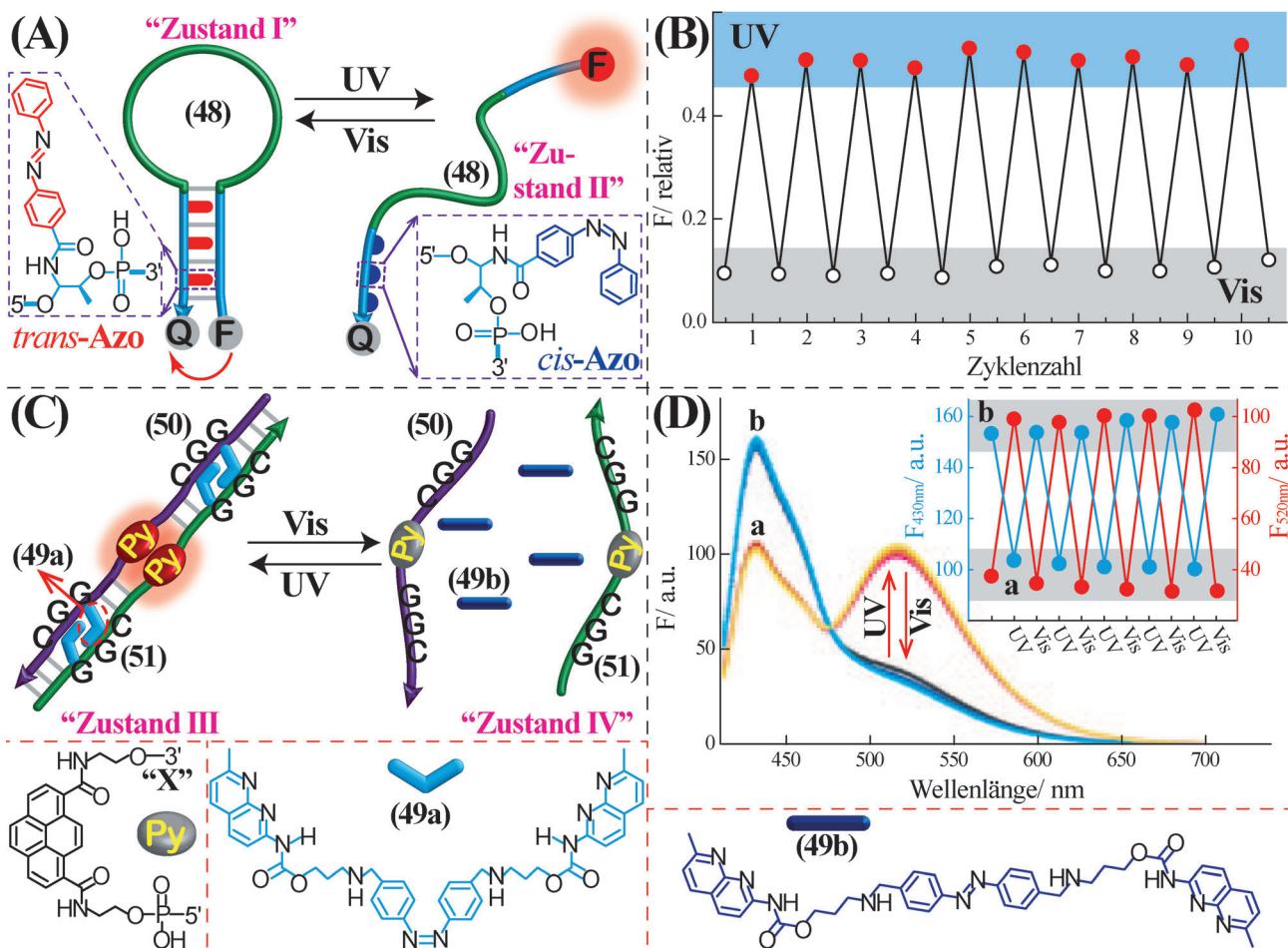


Abbildung 16. A) Photoinduzierte zyklisch schaltbare Übergänge zwischen einer Haarnadelstruktur, Zustand I, und einer Random-Coil-Konfiguration, Zustand II, vermittelt durch photoisomerisierbare Azobenzol-Einheiten. B) Fluoreszenzänderungen während der zyklisch schaltbaren Übergänge zwischen Zustand I und II. Mit Genehmigung aus Lit. [46]. Copyright 2009 American Chemical Society. C) Photoinduzierte Übergänge von Duplex- zu Einzelstrang-Strukturen über photoisomerisierbare Azobenzol-Interkalatoren (49). Die Exciplex/Monomer-Emissionen von Pyren-Markierungen, die an die Strände gebunden sind, folgen den zyklischen Übergängen zwischen den Zuständen III und IV. D) Emissionsspektren der Pyren-Markierungen in a) Zustand III und b) Zustand IV. Einschub: Zyklische Fluoreszenzänderungen bei $\lambda = 430$ nm (blau) und $\lambda = 520$ nm (rot) während das System zwischen den Zuständen III und IV geschaltet wird. Mit Genehmigung aus Lit. [48]. Copyright 2009 Wiley-VCH.

nung 16B). Die Auswirkung photoisomerisierbarer Azobenzoleinheiten auf die Stabilität von Duplex-DNA-Strukturen wurde in mehreren Studien mittels Schmelztemperaturmessungen und CD-Spektren der DNA-Strukturen in Gegenwart der verschiedenen Photoisomere untersucht.^[45]

Programmierte, photoisomerisierbare Azobenzolmoleküle können mit sequenzspezifischen Domänen von Duplex-DNA-Strukturen interagieren und dadurch die Stabilität der resultierenden Duplexe kontrollieren.^[47] Beispielsweise wurde beobachtet, dass zwei Stränge mit 5'-CGG-3'/3'-GGC-5'-Mismatch-Sequenzen selektiv cis-Bisnaphthyridincaramatazobenzol (cis-NADA, 49a) binden, und zwar durch Bildung von Wasserstoffbrücken zu den nicht komplementären Guanosin(G)-Einheiten auf den gegenüberliegenden Seiten der beiden Nukleinsäurestränge (Abbildung 16C).^[48] Ebenso enthielten die beiden DNA-Stränge 50 und 51 das Pyren-Chromophor (X) als internen Wandler und sequenzspezifische Domänen zur Bindung von cis-NADA (49a). In Gegenwart von 49a erfolgte eine kooperative Stabilisierung des DNA-Duplex 50/51, wodurch kettenübergreifend das

Pyren-Excimer ($\lambda_{\text{em}} = 520$ nm), Zustand III, gebildet wurde. Die durch sichtbares Licht ausgelöste Photoisomerisierung von cis-NADA (49a) zum trans-Isomer (trans-NADA, 49b) verringerte die Affinität zwischen 49b und den Nukleinsäuresträngen, was zu ihrer Trennung führte, Zustand IV. Die getrennten DNA-Stränge 50 und 51 zeigten die charakteristische Fluoreszenz von monomerem Pyren ($\lambda_{\text{em}} = 430$) (Abbildung 16D). Durch die zyklische Photoisomerisierung zwischen den Zuständen 49a und 49b wurde die reversibel schaltbare Bildung der Duplexstruktur 50/51 (Zustand III) bzw. der getrennten Stränge 50 und 51 (Zustand IV) demonstriert (Abbildung 16D, Einschub).

Die photoinduzierten Übergänge von DNA-Nanostrukturen mithilfe photoisomerisierbarer Azobenzoleinheiten wurden weiterhin genutzt, um G-reiche Telomerketten zwischen G-Quadruplex- und Random-Coil-Konfigurationen umzuschalten. Das Bis(piperidinium-*trans*-Azobenzol (52a) zeigte eine hohe Bindungsaffinität zur G-reichen Telomeresequenz 53, wodurch die G-Quadruplex-Struktur stabilisiert wurde. Dem durch UV-Licht photoisomerisierten cis-Bis-

piperidinium-Isomer **52b** fehlte die Bindungsaffinität zur Nukleinsäure **53**, und seine Trennung von den Telomerketten destabilisierte die G-Quadruplex-Nanostrukturen, was zu einer einzelsträngigen Random-Coil-Konfiguration führte (Abbildung 17 A).^[49] Durch zyklische Photoisomerisierung

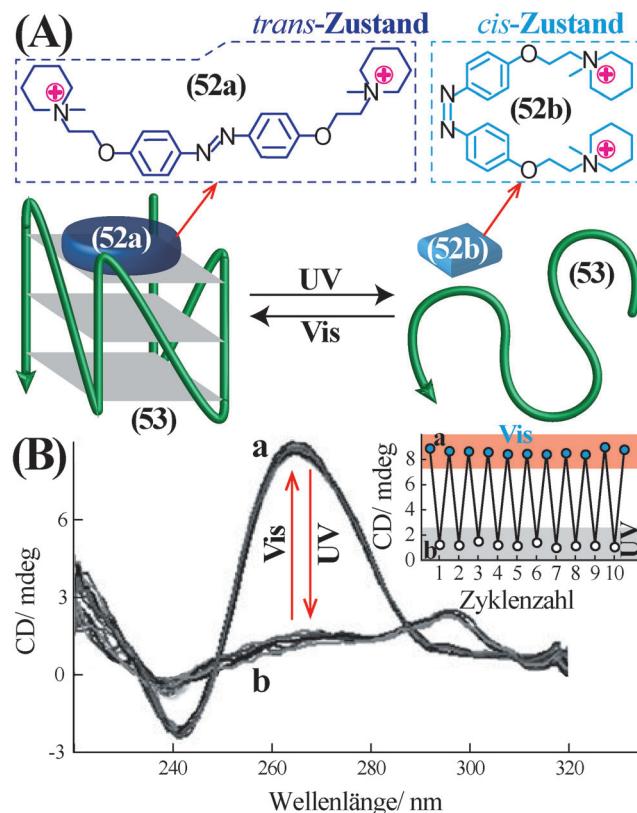


Abbildung 17. A) Photoinduzierte Übergänge von der G-Quadruplex- zur Random-Coil-Struktur unter Verwendung des photoisomerisierbaren Azobenzol-Interkalators **52a**, der die G-Quadruplex-Struktur stabilisiert. B) CD-Spektren von a) der in Gegenwart von **52a** stabilisierten G-Quadruplex-Struktur und b) der Random-Coil-Struktur in Anwesenheit von **52b**. Einschub: Zyklische CD-Intensitätsänderungen bei $\lambda = 265$ nm durch photoinduziertes Umschalten zwischen G-Quadruplex- und Random-Coil-Struktur. Mit Genehmigung aus Lit. [49]. Copyright 2010 Wiley-VCH.

der Azobenzolverbindung zwischen den *trans*- und *cis*-Isomeren wurde die Telomerkette **53** reversibel zwischen den G-Quadruplex- und Random-Coil-Konfigurationen umgeschaltet. Die Strukturübergänge der Nukleinsäure wurden mittels CD-Spektren verfolgt, worin die Bildung des G-Quadruplex durch eine positive Bande bei $\lambda = 265$ nm sichtbar wurde, die nach Umwandlung in die Random-Coil-Struktur verschwand (Abbildung 17 B).

Des Weiteren wurde die durch sichtbares Licht induzierte Stabilisierung von Duplex-DNA durch *trans*-Azobenzole und die anschließende Trennung des Duplexes durch die UV-vermittelte Photoisomerisierung von *trans*-Azobenzol zu *cis*-Azobenzol eingesetzt, um die Aggregation von Au-NPs zu photoregulieren (Abbildung 18 A).^[50] Es wurden zwei Arten Nukleinsäure-funktionalisierter Au-NPs (Typ I und II) hergestellt, wobei Typ-I-Au-NPs mit Nukleinsäure **54** modifiziert

wurden, die photoisomerisierbare *trans*-Azobenzol-Anhänger enthielten, während Typ-II-Au-NPs mit Nukleinsäure **55** funktionalisiert wurden, die partiell komplementär zu Strang **54** ist. Die Vermischung der beiden NP-Typen führte über die kooperative Stabilisierung der Duplexe (**54/55**) durch *trans*-Azobenzol zur Aggregation der NPs. UV-Bestrahlung der aggregierten NPs photoisomerisierte die *trans*-Azobenzol-Einheiten zu *cis*-Azobenzol, was die Auflösung der Aggregate bewirkte. Die zyklische Aggregation/Desaggregation der NPs wurde mittels Absorptionspektroskopie detektiert und konnte auch visuell beobachtet werden (Abbildung 18 B).

Die Azobenzol-gesteuerte Bildung und Dissoziation von Duplex-DNA-Strukturen wurde verwendet, um schaltbare DNA-Strukturen auf Einzelmolekülebene zu verfolgen.^[51] Es wurde ein DNA-Origami-Rahmen mit den überhängenden Verankerungsmöglichkeiten **a**, **b**, **c** und **d** hergestellt und diese mit den Duplex-DNA-Strängen **L**₁ und **L**₂, die die passenden Gegenstücke **a'**, **b'** bzw. **c'**, **d'** enthielten, verbrückt. Die Duplexstrukturen **L**₁ und **L**₂ beinhalteten die beiden Gerüste **x'** und **y'**, an die die Stränge **x**₁, **x**₂, sowie **y**₁ und **y**₂ hybridisiert wurden. Die Sequenzen **x**₁ und **y**₁ enthielten die überhängenden Ketten **e** und **f**, die partiell komplementär sind, und hatten photoisomerisierbare Azobenzolchromophore gebunden. In der *cis*-Azobenzol-Konfiguration war der Duplex **e/f** energetisch instabil, und die Duplexstrukturen **L**₁ und **L**₂ interagierten nicht miteinander, was zu den steifen, die Stellen **a** und **b** bzw. **c** und **d** auf dem Origami-Rahmen verbrückenden Doppelsträngen **L**₁ und **L**₂ führte (Abbildung 19 A). Die durch sichtbares Licht ausgelöste Photoisomerisierung der *cis*-Azobenzol-Einheiten in die *trans*-Azobenzol-Konfiguration führte zur kooperativen Stabilisierung des Duplexes **e/f**, der die Doppelstränge **L**₁ und **L**₂ verbindet, und ergab eine vernetzte Nanostruktur. Durch die reversible, UV-induzierte Photoisomerisierung der *trans*-Azobenzol-Einheiten zu den *cis*-Isomeren wurde die vernetzende Stelle zwischen den Duplexen getrennt, was wieder die einzelnen, versteiften Duplexen **L**₁ und **L**₂ lieferte. Die zyklischen Übergänge der getrennten Duplexen zu den vernetzten Duplexen und zurück infolge der zyklischen Photoisomerisierung der *cis*-Azobenzol-modifizierten Duplexe in den *trans*-Azobenzol-Zustand und zurück wurden durch AFM abgebildet (Abbildung 19 B). Ebenso wurden sechseckige Origami-Rahmen synthetisiert, die an festgelegten Kanten mit den überhängenden Nukleinsäuren **56** oder **57** modifiziert wurden, die partiell komplementär und mit photoisomerisierbaren Azobenzoleinheiten ausgestattet waren (Abbildung 19 C).^[52] In der *cis*-Azobenzol-Konfiguration der angebundenen Nukleinsäuren blieben die sechseckigen DNA-Origami-Einheiten getrennt, da die Basenpaarung zwischen den Strängen **56** und **57** nicht ausreicht, um die Duplexstrukturen zu stabilisieren. Dagegen führt die Photoisomerisierung der *cis*-Azobenzol-Einheiten zu *trans*-Azobenzol durch sichtbares Licht zur kooperativen Stabilisierung der Duplexe (**56/57**) an den Kanten der Sechsecke, was Dimere der sechseckigen Origami-Strukturen liefert. Durch zyklische Photoisomerisierung des Systems zwischen *cis*- und *trans*-Azobenzol-Zuständen wurden schaltbare Übergänge zwischen monomeren und dimeren Sechseck-Strukturen nachgewiesen (Abbildung 19 D). Zudem wurde durch Funktionalisierung von zwei unter-

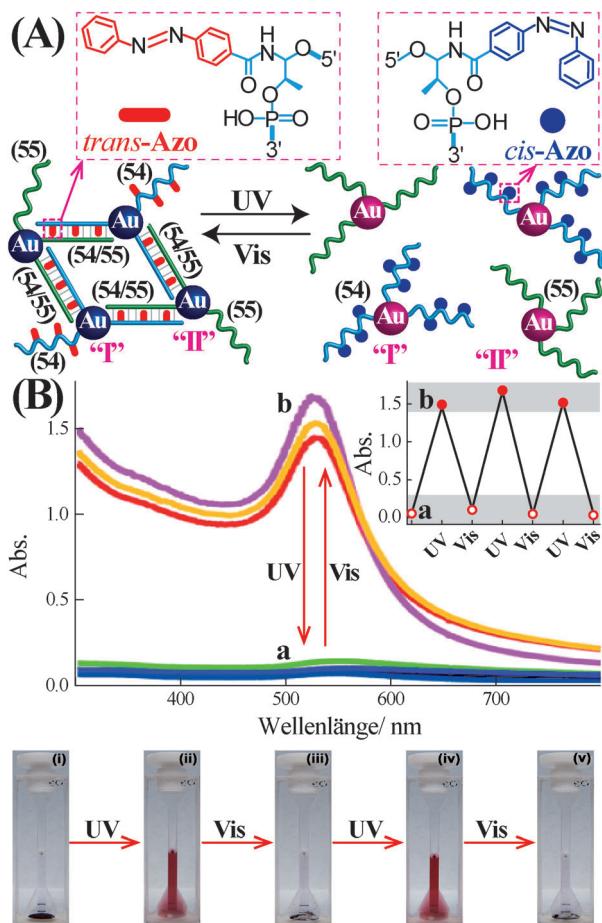


Abbildung 18. A) Photoinduzierte Aggregation/Desaggregation von Nukleinsäure-funktionalisierten Au-NPs, die photoisomerisierbare Azo-benzol-Komponenten enthalten. B) Absorptionsspektren von a) den aggregierten Au-NPs in Gegenwart der *trans*-Azobenzol-Interkalatoren und b) den desaggregierten Au-NPs in Gegenwart der *cis*-Azobenzol-Einheiten. Einschub: Zyklische Absorptionsänderungen infolge der zyklischen, lichtgesteuerten Aggregation und Desaggregation der NPs. Darunter: Fotografien der lichtinduzierten Aggregate der Au-NPs (i, iii und v) und der desaggregierten Au-NPs (ii und iv). Mit Genehmigung aus Lit. [50]. Copyright 2012 American Chemical Society.

schiedlichen Kanten eines der Sechsecke mit Anhängen, die photoisomerisierbare Azobenzoleinheiten enthalten, die lichtinduzierte, programmierte Anordnung mehrerer sechseckiger Strukturen verwirklicht. Zum Beispiel lieferte die Reaktion des sechseckigen, an gegenüberliegenden Kanten mit den *cis*-Azobenzol-funktionalisierten Nukleinsäuren **56** modifizierten Origamis O_1 mit dem sechseckigen Origami O_2 , das die überhängenden *cis*-Azobenzol-modifizierten Sequenzen **57** nur an einer Kante (O_1/O_2 -Verhältnis 1:2) enthielt, nach der durch sichtbares Licht induzierten Photoisomerisierung der *cis*-Einheiten zu *trans*-Azobenzol die lineare Struktur aus drei Sechsecken (Abbildung 19E). Andererseits führte die Behandlung der sechseckigen, *cis*-Azobenzol-funktionalisierten Origami-Struktur O_2 mit einer sechseckigen Origami-Struktur O_3 (O_3/O_2 -Verhältnis 1:2), die an zwei Kanten, welche durch eine weitere Kante getrennt sind, die überhängenden *cis*-Azobenzol-Nukleinsäure-Einheiten **56** enthält, nach der durch sichtbares Licht ausgelösten Photo-

isomerisierung der *cis*-Azobenzol-Einheiten zu *trans*-Azobenzol-Gruppen zu einer kooperativ stabilisierten gebogenen Struktur aus drei Secksecken (Abbildung 19F).

Die reversiblen Übergänge von Doppelstrang- zu Einzelstrang-DNA mittels Photoisomerisierung von *trans*- zu *cis*-Azobenzolen und zurück wurden eingesetzt, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu kontrollieren^[53] sowie schaltbare nanoskopische Maschinen^[54-57] und lichtgesteuerte DNAzyme zu entwerfen.^[58-61] Abbildung 20A zeigt die schaltbare Kontrolle des FRET (resonanter Energietransfer nach Förster) zwischen dem cyan fluoreszierenden Protein (CFP) und dem gelb fluoreszierenden Protein (YFP) unter Verwendung der Photoisomerisierung von Azobenzoleinheiten als Schaltmotiv.^[53] Ein DNA-Gerüst **58**, das die beiden Domänen I und II enthält, fungierte als Templat, um die beiden Proteine CFP und YFP zu organisieren. Domäne II auf Gerüst **58** enthielt Basen, die an die *cis*-Azobenzol-Einheiten gebunden waren, und das Protein CFP wurde mit einer zu Domäne I komplementären Nukleinsäure **59** funktionalisiert. Das Protein YFP war mit einer Nukleinsäure **60** funktionalisiert, die eine begrenzte Anzahl komplementärer Basen enthielt, die mit Domäne II hybridisierten. Unter diesen Bedingungen hybridisiert lediglich das CFP-Protein mit Domäne I. Die durch sichtbares Licht induzierte Photoisomerisierung der *cis*-Azobenzol-Einheiten in den *trans*-Zustand stabilisierte kooperativ die Hybridisierung des YFP-Proteins mit dem Gerüst **58**. Der geringe Abstand zwischen den CFP- und YFP-Proteinen stimulierte den effizienten FRET-Prozess zwischen CFP-Donor und YFP-Akzeptor. Durch zyklische Photoisomerisierung der Azobenzoleinheiten zwischen *trans*- und *cis*-Zuständen konnte das Proteinsystem zwischen der FRET-auslösenden Konfiguration und der getrennten Konfiguration (ohne FRET-Reaktion) geschaltet werden. Abbildung 20B zeigt eine wippenartig angeordnete DNA-Maschine, die durch photoisomerisierbare Azobenzolchromophore aktiviert werden kann und verschiedene Substituenten enthält, die eine programmierte und selektive Photoisomerisierung der unterschiedlichen Chromophore ermöglicht.^[54] Die Nukleinsäure **61** dient als Grundgerüst dieser Anordnung und ist an den 3'- und 5'-Enden mit Pyren(Py, F₁)- und Carboxyfluorescein(FAM, F₂)-Fluorophoren modifiziert. Die mit dem Quencher Anthraquinon (An, Q₁) funktionalisierte Nukleinsäure **62** und die mit dem Quencher *N*-4-(4-Dimethylamino)phenylazobenzoesäure (Dab, Q₂) modifizierte Nukleinsäure **63** wurden als linker und rechter Strang (L-Strang und R-Strang) verwendet, die partielle Komplementarität zu den Domänen I bzw. II der Nukleinsäure **61** zu zeigen. An die Nukleinsäure **62** wurden Dimethylthiomethyl-Substituenten (SDMAzo) und an Nukleinsäure **63** nicht substituierte Azobenzolgruppen gebunden. Die Nukleinsäure **64** (mittlerer Strang) wurde eingesetzt, um mit der zentralen Domäne zu hybridisieren und die Anordnung zu verstauen. Die *trans*-Azobenzol-Konfigurationen der chromophorhaltigen L- und R-Stränge führten zur kooperativen Stabilisierung der Duplexe zwischen L-Strang und R-Strang mit den Domänen I und II des Gerüstes und lieferten Zustand A der Maschine. Unter diesen Bedingungen wurden das Py- (F₁) und das FAM-Chromophor (F₂) gelöscht. Die Bestrahlung von Zustand A mit $\lambda = 390$ nm

DNA-Schalter

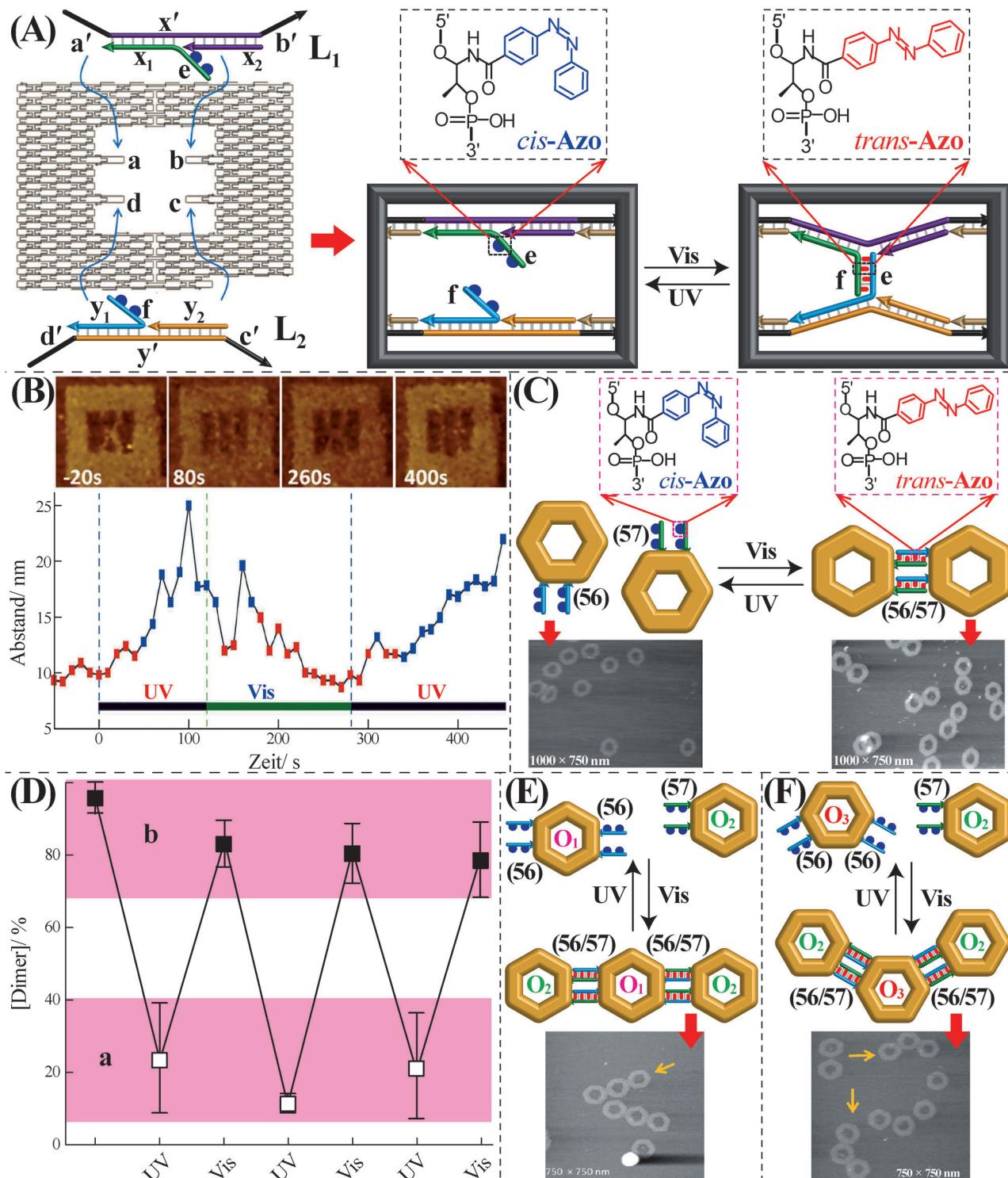


Abbildung 19. A) Schematische Darstellung der photoinduzierten, zyklisch schaltbaren Übergänge zweier einzelsträngiger Verbindungsstücke (**e** und **f**) zu einer Duplexstruktur (**e/f**) und zurück auf Einzelmolekülebene mit einem DNA-Origami-Rahmen als Templat und photoisomerisierbaren Azobenzoleinheiten als Auslöser der Umschaltung. Das *trans*-Azobenzol stimuliert die Bildung des Duplex, während das *cis*-Azobenzol den Duplex trennt. B) Kinetische Untersuchung der photoinduzierten Übergänge zwischen der Duplex-DNA und der einzelsträngigen DNA durch schnelle AFM-Messungen, die die Abstände zwischen den Duplexsträngen (**L₁** und **L₂**) abbilden. Mit Genehmigung aus Lit. [51]. Copyright 2012 Wiley-VCH. C) Schaltbare, photoinduzierte Anordnung und Spaltung dimerer, sechseckiger DNA-Origami-Strukturen, wobei jedes Sechseck mit einem komplementären Strang aus photoisomerisierbaren Azobenzoleinheiten funktionalisiert ist. Abgebildet sind AFM-Bilder der Dimere/Monomere. D) Schaltbare Änderungen der Dimeranzahl durch Photoisomerisierung der Azobenzol-Einheiten. E) Photoinduzierte Bildung linearer Trimer-DNA-Sechseckstrukturen nach Mischen eines DNA-Origami-Sechsecks (**O₂**), das an einer Kante mit photoisomerisierbaren Azobenzoleinheiten modifiziert ist, mit einem DNA-Origami-Sechseck (**O₁**), das an zwei gegenüberliegenden Kanten mit photoisomerisierbaren Azobenzoleinheiten modifiziert ist (**O₂/O₁**-Verhältnis 2:1). F) Photoinduzierte Anordnung gebogener Trimer-Strukturen aus DNA-Origami-Sechsecken. Ein Teil der Sechsecke (**O₂**) ist an einer Kante mit photoisomerisierbaren Azobenzoleinheiten modifiziert, während das zweite Sechseck (**O₃**) an zwei Kanten asymmetrisch mit photoisomerisierbaren Azobenzoleinheiten modifiziert ist (**O₂/O₃**-Verhältnis 2:1). Mit Genehmigung aus Lit. [52]. Copyright 2012 American Chemical Society.

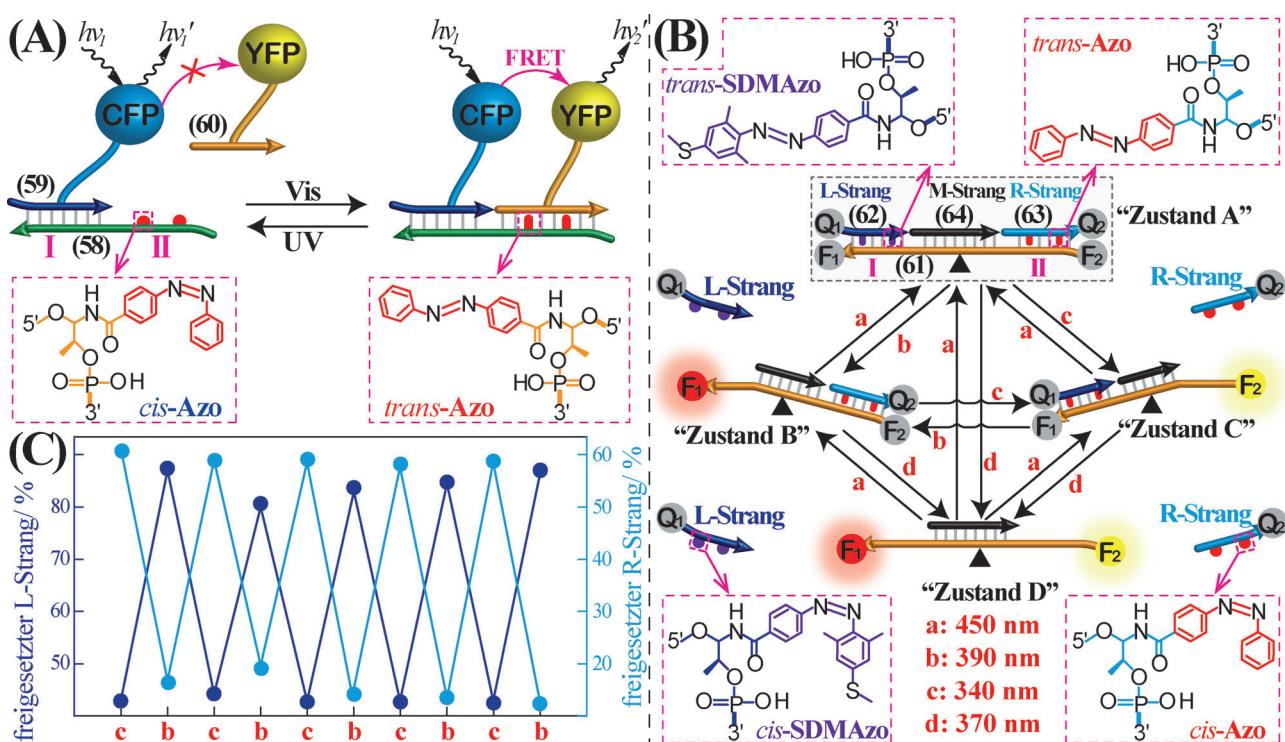


Abbildung 20. A) Photoinduzierte Steuerung des FRET-Prozesses zwischen zwei Proteinen in Gegenwart eines mit photoisomerisierbaren Azobenzoleinheiten funktionalisierten Nukleinsäure-Gerüstes. B) Lichtinduzierte Übergänge einer photogesteuerten „Wippen“-artigen DNA-Anordnung zwischen den Zuständen A, B, C und D mithilfe photoisomerisierbarer Azobenzoleinheiten. Diese Zustände werden über zwei Fluorophor/Quencher-Paare F_1/Q_1 und F_2/Q_2 beobachtet. C) Fluoreszenzänderungen nach den zyklischen Übergängen zwischen den Zuständen B und C. Mit Genehmigung aus Lit. [54]. Copyright 2012 Wiley-VCH.

resultierte in der selektiven Photoisomerisierung der *trans*-SDMAzo-Einheiten des L-Strangs in den *cis*-SDMAzo-Zustand, was die Bildung von Zustand B bewirkte, worin der L-Strang abgetrennt ist, was die Fluoreszenz von Py (F_1) auslöst, während FAM (F_2) ausgeschaltet bleibt. Dagegen folgte aus Bestrahlung des Systems mit $\lambda = 340$ nm die selektive Photoisomerisierung der nicht substituierten *trans*-Azobenzol-Einheiten in die *cis*-Konfiguration, was zur selektiven Abspaltung des R-Strangs und damit zu Zustand C führte. In dieser Konfiguration wird das Py(F_1)-Chromophor gelöscht, während die FAM(F_2)-Fluoreszenz induziert wird. Durch Bestrahlung von Zustand A mit $\lambda = 370$ nm photoisomerisierten die *trans*-Azobenzol-modifizierten Einheiten an den L- und R-Strängen und ergaben Zustand D. In diesem Zustand fluoreszieren sowohl Py(F_1)- als auch FAM(F_2)-Chromophore. Durch die umgekehrte Photoisomerisierung der *cis*-Azobenzol-getrennten Einheiten mit $\lambda > 450$ nm wird die ursprüngliche Anordnung der Maschine wiederhergestellt. Das bedeutet, dass durch Bestrahlung des Systems mit Licht bestimmter Wellenlängen die Umschaltung zwischen allen Zuständen erreicht werden konnte. Abbildung 20C zeigt die schaltbaren Übergänge zwischen den Zuständen B und C mit Py (F_1) und FAM (F_2) als Fluoreszenzmarkern.

Eine lichtgesteuerte Maschine mit zwei Zuständen wurde in ähnlicher Weise mit photoisomerisierbaren Azobenzol-Einheiten als Antriebselemente konstruiert (Abbildung 21 A).^[55] Der geschlossene Zustand der Pinzette, Zustand A, bestand aus den Nukleinsäurearmen **65** und **66**, die

durch die Nukleinsäuren **67** und **68** verbrückt waren, wobei die Hybridisierung des Brückenstrangs **68** mit den Domänen I und II auf beiden Armen kooperativ durch *trans*-Azobenzol-Interkalatoren stabilisiert wurde. Photoisomerisierung der *trans*-Azobenzol-Einheiten in den *cis*-Zustand ($\lambda = 320$ –380 nm) entfernt die Interkalatoren aus den Duplexregionen zwischen Strang **68** und den Domänen I und II, die mit den beiden „Armen“ der Pinzette verbunden sind. Das Entfernen der Interkalator-Einheiten schwächt die Duplexe, führt zur Abtrennung der verbrückenden DNA **68** und zur Öffnung der Pinzette, Zustand B. Die umgekehrte Photoisomerisierung der *cis*-Azobenzol- zu den *trans*-Azobenzol-Einheiten ($\lambda = 440$ –460 nm) führt zur Restabilisierung der Duplexstruktur zwischen **68** und den Domänen I und II, die mit den beiden „Armen“ **65** bzw. **66** assoziiert sind, sowie zum erneuten Schließen der Pinzette, Zustand A. Da der Verbindungsstrang **67** an den 5'- und 3'-Enden mit einem Fluorophor/Quencher-Paar modifiziert ist, wurde das Öffnen und Schließen der Pinzette über die Fluoreszenz des Fluorophormarkers untersucht (geschlossene Pinzette: Zustand A, geringe Fluoreszenz; geöffnete Pinzette: Zustand B, starke Fluoreszenz). Durch die zyklische Photoisomerisierung der Azobenzoleinheiten zwischen den *trans*- und *cis*-Zuständen wurde die Pinzette reversibel zwischen den Zuständen A und B geschaltet (Abbildung 21 B). Ein weiterer lichtstimulierter, mechanischer Schalter wird in Abbildung 21 C dargestellt, wobei ein Nukleinsäure-Walker zyklisch schaltbare Übergänge zwischen zwei Zuständen auf einer DNA-Schiene

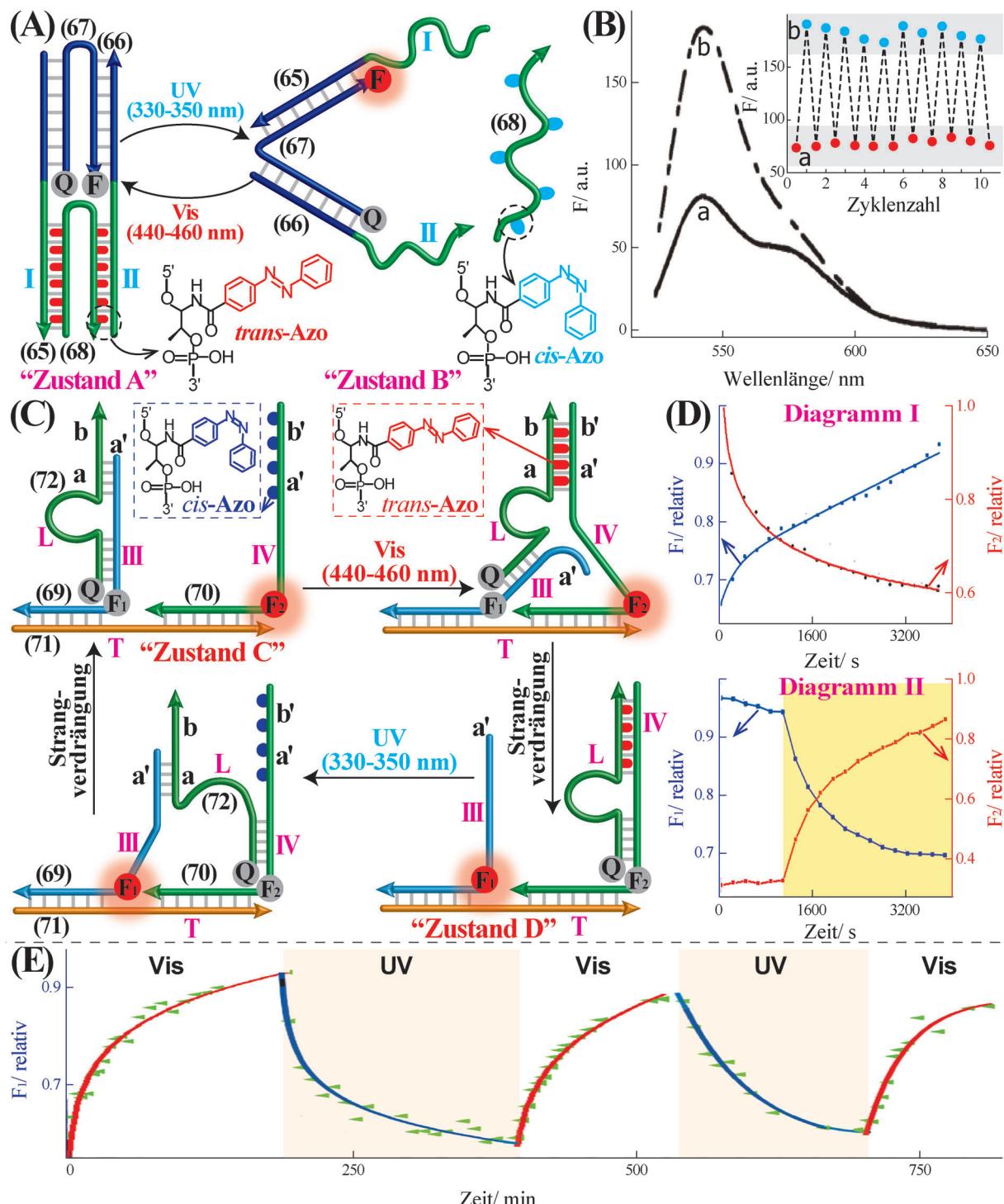


Abbildung 21. A) Auf photoisomerisierbaren Azobenzoleinheiten basierende, photostimulierte DNA-Pinzelze. Das Öffnen und Schließen der Pinzelze wird durch Markieren des verbrückenden „Arms“ mit einem Fluorophor/Quencher-Paar und Verfolgen der in den verschiedenen Zuständen resultierenden FRET-Lösung des Fluorophors untersucht. B) Fluoreszenzspektren von a) der geschlossenen Pinzelze, Zustand A, in Gegenwart von trans-Azobenzol-Einheiten, und b) der geöffneten Pinzelze, Zustand B, in Gegenwart der cis-Azobenzoleinheiten. Einschub: Zyklisch schaltbare Fluoreszenzänderungen durch Schließen und Öffnen des Pinzelze-Systems. Mit Genehmigung aus Lit. [55]. Copyright 2008 Wiley-VCH. C) Ein photoinduzierter DNA-Walker geht reversible, lichtgesteuerte Übergänge zwischen zwei an ein DNA-Gerüst gebundene Überhänge ein. Die Übergänge werden durch Markieren der Stützen III und IV mit den Fluorophoren F₁ bzw. F₂ und des Walker-Elements mit einem Quencher Q detektiert. D) Fluoreszenzänderungen: Feld I – photoinduzierter Übergang des Walkers von Zustand C in D. Feld II – photoinduzierter Übergang des Walkers von Zustand D in C. E) Zeitabhängige Fluoreszenzänderungen durch die photoinduzierten, zyklisch schaltbaren Umwandlungen zwischen den Zuständen C und D. Mit Genehmigung aus Lit. [56]. Copyright 2012 American Chemical Society.

eingeht.^[56] Das System besteht aus zwei Stützsträngen **69** und **70**, die mit der Schiene **71** hybridisiert sind. Diese Stützstränge enthalten die überhängenden Sequenzen III und IV, die Bindungsstellen für den Walker aufweisen. Stützstrang IV ist mit *cis*-Azobenzol-Einheiten modifiziert. Unter diesen Bedingungen ist das Walker-Element, L (**72**), an Stützstrang III gebunden, der die energetisch günstigere Hybridisierungsstelle zur Verfügung stellt, Zustand C. Photoisomerisierung der *cis*-Azobenzol-Einheiten in den *trans*-Azobenzol-Zustand führt zur Verdrängung des Walkers L und dessen Wechsel zu Stützstrang IV, wo der resultierende Doppelstrang durch Paarung komplementärer Basen und die kooperative Bindung von *trans*-Azobenzol an den gebildeten Duplex stabilisiert wird, Zustand D. Photoisomerisierung des *trans*-Azobenzols zurück zum *cis*-Isomer hingegen schwächt den Duplex zwischen dem Walker-Element L und dem Stützstrang IV, was zur umgekehrten Strangverdrängung und Übergang des Walkers L auf Strang III führt, Zustand C. Durch die Markierung der Stützstränge III und IV mit den Fluorophoren F₁ bzw. F₂ und der Funktionalisierung des Walker-Elements L mit einer Quencher-Einheit konnte die Dynamik des Walker-Übergangs von Strang III zu IV und der umgekehrte Prozess über die zeitabhängigen Fluoreszenzänderungen der entsprechenden Fluorophore beobachtet werden (Abbildung 21 D, Diagramme I und II). Durch zyklische Photoisomerisierung der Azobenzoleinheiten zwischen *cis*- und *trans*-Zuständen wurde der reversible Wechsel des Walkers zwischen den Strängen III und IV demonstriert (Abbildung 21 E).

Das „mechanische“ lichtinduzierte Schalten von DNA-Strukturen wurde auf ähnliche Weise durch Verwendung photoisomerisierbarer Azobenzoleinheiten gezeigt (Abbildung 22(A)).^[57] Unter Verwendung der Stränge **73–76** und dem beigefügten *trans*-Azobenzol-funktionalisierten Strang **77** erfolgte Selbstorganisation zur gedehnten Tetraederstruktur, Zustand A, indem die entsprechenden Domänen der Stränge **73, 74, 75, 76** und **77** hybridisierten. Die Interkalation der *trans*-Isomer-Einheiten in die komplementären Domänen zwischen den Strängen **73** und **77** ergab die gedehnte Tetraederstruktur, Zustand A. Photoisomerisierung der *trans*- zu den *cis*-Azobenzol-Komponenten (UV-Licht) führte zur Trennung der Duplexdomänen zwischen den Strängen **73** und **77**, wodurch sich die Tetraederstruktur kontrahierte, Zustand B. Durch die umgekehrte Photoisomerisierung der *cis*-Azobenzol-Einheiten zu *trans*-Azobenzol (sichtbares Licht) wurde die gestreckte Tetraederkonfiguration, Zustand A, wiederhergestellt. Durch Markierung des Strangs **73** mit einem Fluorophor/Quencher-Paar wurde die lichtgesteuerte Schaltung des Systems zwischen der gedehnten und kontrahierten Konfiguration des DNA-Tetraeders verfolgt (Abbildung 22B) (Zustand A: starke Fluoreszenz; Zustand B: geringe Fluoreszenz).

Die photoinduzierte an- und ausschaltbare Aktivierung des Mg²⁺-abhängigen DNAzym vom 10-23-Typ mit photoisomerisierbaren Azobenzolgruppen als optischen Auslösern wird in Abbildung 23 A veranschaulicht.^[58] Die Nukleinsäure **78** enthielt die katalytische DNAzym-Sequenz und gestreckte Anhänge aus teilweise komplementären Basenpaaren, die mit *trans*-Azobenzol-Chromophoren modifiziert waren. In

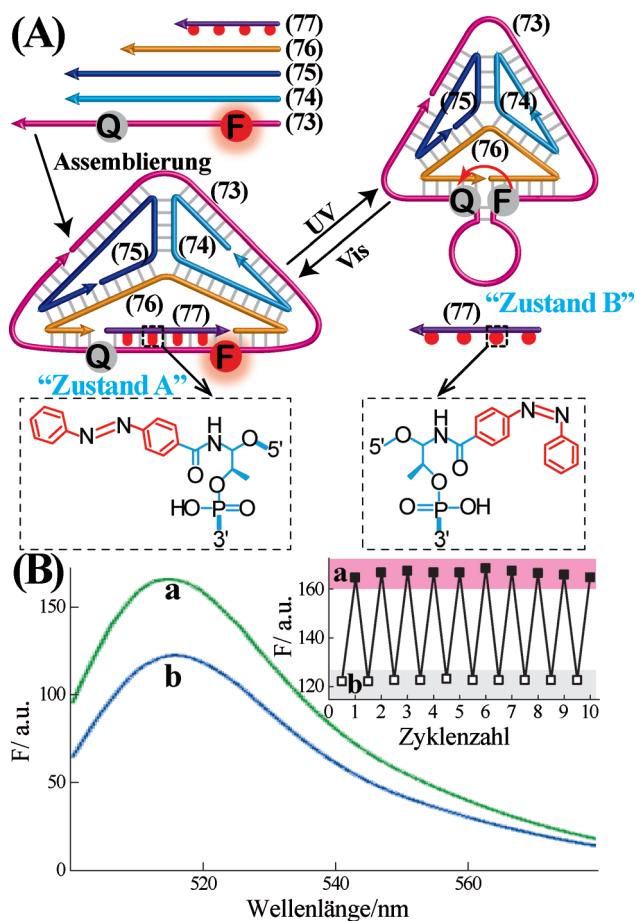


Abbildung 22. A) Photoinduzierte, zyklische Rekonfigurationen eines DNA-Tetraeders über eine gestreckte Konfiguration, Zustand A, und eine komprimierte Konfiguration, Zustand B, unter Verwendung photoisomerisierbarer Azobenzoleinheiten. Durch Markieren einer Tetraederseite mit einem Fluorophor/Quencher-Paar werden die Übergänge zwischen den Zuständen A und B über die Effizienz der entsprechenden FRET-Löschprozesse beobachtet. B) Fluoreszenzspektren a) des Tetraeders in der gestreckten Konfiguration, Zustand A, und b) des Tetraeders in der komprimierten Konfiguration, Zustand B. Einschub: Zyklische Fluoreszenzänderungen durch Umschalten des Tetraeders von Zustand A (starke Fluoreszenz) in Zustand B (geringe Fluoreszenz) und zurück. Mit Genehmigung aus Lit. [57]. Copyright 2011 Royal Society of Chemistry.

dieser Konfiguration stabilisieren die *trans*-Azobenzol-Einheiten die Haarnadelstruktur von Strang **78**. Dadurch wird die Bildung der katalytischen DNAzym-Schleife verhindert. UV-induzierte Photoisomerisierung der *trans*-Azobenzole in den *cis*-Zustand destabilisierte die Stammregion der Haarnadel, wodurch sich diese öffnete. Dies ermöglicht die Selbstorganisation der katalytisch aktiven DNAzym-Schleifensequenz und die Bildung des Komplexes mit dem ribonukleobasehaltigen Substrat **79**. In Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen wurde das Substrat katalytisch gespalten. Die anschließende, durch sichtbares Licht stimulierte Photoisomerisierung der *cis*-Azobenzol-Einheiten zum *trans*-Isomer stellte die katalytisch inaktive Haarnadelstruktur **78** wieder her (Abbildung 23 B). Auch die Modifizierung mit photoisomerisierbaren Azobenzoleinheiten im Inneren der katalytischen Schleifenregion des Mg²⁺-abhängigen 10-23-DNAzyms

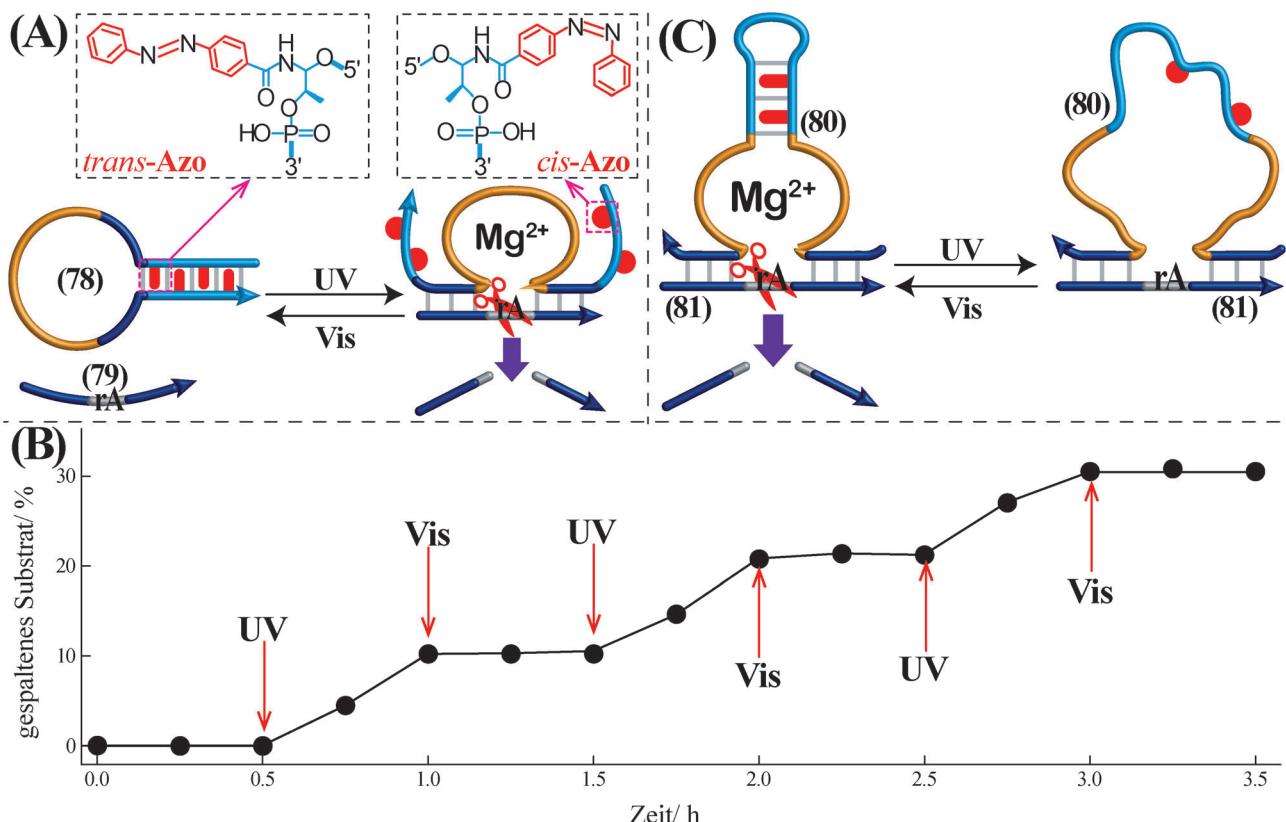


Abbildung 23. A) Photoinduzierte Übergänge einer katalytisch inaktiven DNA-Haarnadelstruktur in das aktive Mg²⁺-abhängige DNAzym und zurück, vermittelt durch photoisomerisierbare Azobenzoleinheiten. B) Photogesteuerte schaltbare Aktivierung des Mg²⁺-abhängigen DNAzyms. Im *trans*-Azobenzol-Zustand liegt die stabilisierte Haarnadelstruktur in einer katalytisch inaktiven Form vor. UV-Bestrahlung des Systems ergibt *cis*-Azobenzol, woraus das katalytisch aktive Mg²⁺-abhängige DNAzym resultiert. Die weitere Reisomerisierung von *cis*-Azobenzol zu *trans*-Azobenzol durch sichtbares Licht stellt die katalytisch inaktive Haarnadelstruktur wieder her. Die photoinduzierte „AN/AUS“-Aktivierung und Inaktivierung des DNAzyms wurde durch die elektrophoretische Charakterisierung der durch das DNAzym gebildeten, fragmentierten Produkte verfolgt. C) Photoinduzierte „AN/AUS“-Aktivierung/Inaktivierung des Mg²⁺-abhängigen DNAzyms durch photoinduzierte Versteifung einer Tandemsequenz, die unter Verwendung von photoisomerisierbaren Azobenzoleinheiten in die Schleifensequenz des DNAzyms eingeführt wurde. Mit Genehmigung aus Lit. [58]. Copyright 2010 Wiley-VCH.

lieferte schaltbare katalytische Funktionen des DNAzyms (Abbildung 23C).^[59] In Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen führte die *trans*-Azobenzol-Konfiguration der DNAzym-Sequenz **80** zu einer katalytisch aktiven Struktur, die eine hydrolytische Spaltung des ribonukleobasehaltigen Substrats **81** katalysierte. Die UV-induzierte Photoisomerisierung der *trans*-Azobenzol-Einheiten zum *cis*-Isomer ($\lambda = 366$ nm) wiederum verzerrte die DNAzym-Schleifenstruktur und störte die katalysierte Spaltung des Substrats **81**. Die umgekehrte, durch sichtbares Licht stimulierte Photoisomerisierung der *cis*-Azobenzol-Einheiten in die *trans*-Azobenzol-Konfiguration ($\lambda = 435$ nm) regenerierte die katalytischen Funktionen des DNAzyms.

2.4. Elektrochemisch schaltbare DNA-Systeme

Die Stabilisierung von G-Quadruplexen durch Metallionen ermöglichte einen elektrochemisch schaltbaren Übergang zwischen durch Pb²⁺-Ionen stabilisierten G-Quadruplex- und Random-Coil-Zuständen (Abbildung 24A).^[62] In Anwesenheit von Pb²⁺-Ionen bildete Strang **82** einen G-

Quadruplex. Elektrochemische Reduktion der Pb²⁺-Ionen trennte den G-Quadruplex in eine Random-Coil-Struktur auf. Die elektrochemische Oxidation des auf der Elektrode abgeschiedenen Pb⁰ zu Pb²⁺-Ionen regenerierte den Pb²⁺-stabilisierten G-Quadruplex. Die zyklischen Übergänge zwischen Pb²⁺-stabilisiertem G-Quadruplex und Random-Coil-Zuständen wurden durch Messung der verstärkten Fluoreszenz von Kristallviolet (KV) nach Assoziation an die Random-Coil-Struktur verfolgt (Abbildung 24B).

Ein weiterer Zugang zur elektrochemischen Schaltung von DNA-Systemen beruhte auf der Verwendung von Elektroden, um den pH-Wert der Elektrolytlösung zu verändern und damit schaltbare DNA-Systeme in Gang zu setzen. Eine Methode nutzte die pH-Erniedrigung der Elektrolytlösung durch Oxidation von H₂O zu Sauerstoff [Gl. (1)] und Neutralisation der sauren wässrigen Lösung durch elektrochemische Reduktion von Wasser und Bildung von Wasserstoff (H₂) [Gl. (2)].^[63]



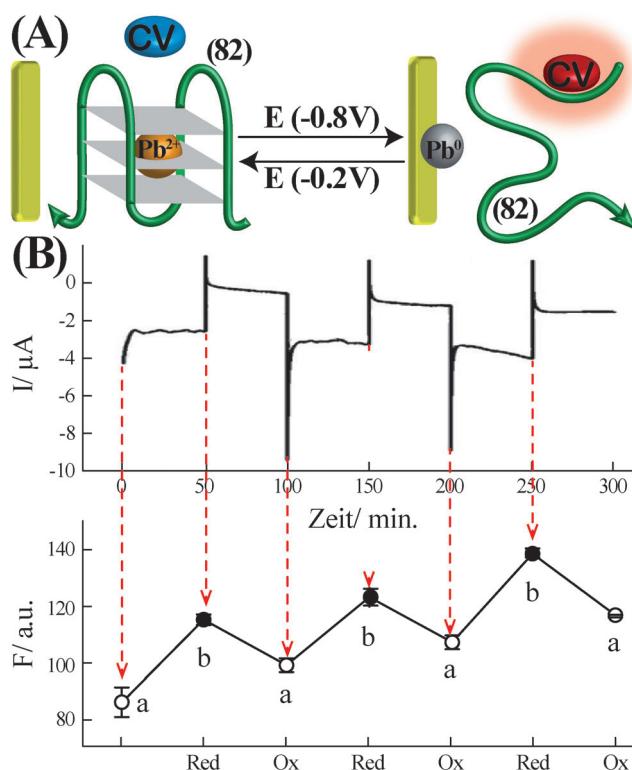


Abbildung 24. A) Elektrochemisch gesteuerte, zyklisch schaltbare Bildung und Dissoziation des Pb^{2+} -stabilisierten G-Quadruplexes. Die voltammetrische Freisetzung von Pb^{2+} und Abscheidung von Pb^0 auf der Elektrode führt zur Auflösung des G-Quadruplexes, während die Reoxidation des Pb^0 zu Pb^{2+} -Ionen den Pb^{2+} -stabilisierten G-Quadruplex regeneriert. An einzelsträngige DNA gebundenes Kristallviolett (CV) erzeugt Fluoreszenz und liefert damit das Auslesesignal. B) Oben: Zyklovoltammetrische Stufen, entsprechend der Reduktion der Pb^{2+} -Ionen zu Pb^0 und der umgekehrten Oxidation von Pb^0 zu Pb^{2+} -Ionen. Unten: Zyklische Änderung der Fluoreszenzintensität von CV in Gegenwart a) des Pb^{2+} -stabilisierten G-Quadruplexes und b) der Random-Coil-DNA. Mit Genehmigung aus Lit. [62] Copyright 2013, Elsevier.

Dementsprechend wurde der an den 5'- und 3'-Enden mit einem Fluorophor/Quencher-Paar markierte C-reiche Strang **83** den elektrochemisch gesteuerten pH-Änderungen ausgesetzt (Abbildung 25 A). Bei saurem pH bildete Strang **83** ein i-Motiv, was zur Lösung der Fluoreszenz des angehängten Fluorophors führte. Die folgende, elektrochemisch gesteuerte Reduktion von Wasser unter H_2 -Entwicklung lieferte eine alkalische Lösung (pH 8.0), was die Auflösung des i-Motivs und eine starke Fluoreszenz des Fluorophors nach sich zog. Durch zyklische, elektrochemisch gesteuerte pH-Änderungen der Elektrolytlösung wurde der DNA-Strang **83** zwischen i-Motiv- und Random-Coil-Konfigurationen umgeschaltet (Abbildung 25 B).

Eine andere Methode, um den pH-Wert der Elektrolytlösung und somit den nachfolgenden „AN/AUS“-Wechsel der katalytischen Aktivität des Mg^{2+} -abhängigen DNAzyms elektrochemisch zu kontrollieren, verwendet eine an die Elektrode gebundene Matrix aus Bis(anilin)-vernetzten Au-Nanopartikeln (NPs) (Abbildung 25 C).^[64] Thioanilin-modifizierte Au-NPs (Durchmesser $3.6 \pm 0.3 \text{ nm}$) wurden auf einer angerauften Elektrode elektropolymerisiert, um die Bis(anilin)-vernetzte Au-NP-Matrix herzustellen. Die Bis(anilin)-Einheiten weisen quasireversible Redoxeigenschaften ($E = -0.05 \text{ V}$ gegen SCE) auf und werden unter Freisetzung von Protonen zum chinoiden Zustand oxidiert. Der umgekehrte Vorgang, bei dem die Chinoid-Einheiten zu den Bis(anilin)-Zuständen reduziert werden, bedingt die Aufnahme von Protonen aus der Lösung. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass die potentialgesteuerte Oxidation der Bis(anilin)-vernetzten AuNP-modifizierten Elektrode ($E = 0.25 \text{ V}$ gegen SCE) in einer neutralen Elektrolytlösung zur Acidifizierung der Lösung bis zu pH 5.8 führte. Die umgekehrte Einstellung des Elektrodenpotentials auf -0.05 V gegen SCE führte zur Reduktion der Chinoid-Brückeneinheiten in den Bis(anilin)-Zustand, wobei Protonen aus der Lösung aufgenommen und die neutrale Elektrolytlösung mit pH 7.2 wiederhergestellt wurde. Dementsprechend wurde diese Bis(anilin)-vernetzte Au-NP-modifizierte Elektrode eingesetzt, um die katalytischen Aktivitäten des Mg^{2+} -abhängigen DNAzyms umzuschalten (Abbildung 25 D). Die Stränge **28** und **29** enthielten die funktionellen Domänen, um die katalytische Aktivität des DNAzyms an- und auszuschalten. Die Domänen I und II umfassen die Sequenzen, aus denen die Schleifenregion des DNAzyms besteht und die Domänen III und IV stellen die Substratbindungsstellen bereit. Die Domänen V und VI der Stränge **28** und **29** enthalten C-reiche Sequenzen, die unter sauren Bedingungen (pH 5.8) ein i-Motiv bilden. Die Domänen VII und VIII weisen drei komplementäre Basenpaarungsregionen auf, die eingefügt wurden, um in saurem Milieu die Selbstorganisation der katalytisch aktiven DNAzym-Einheit durch Stabilisierung der supramolekularen Struktur zwischen den Nukleinsäuren **28** und **29** über eine kooperative i-Motiv-Struktur und Basenpaarung der Duplexdomäne VII/VIII zu begünstigen. Das Substrat des Mg^{2+} -abhängigen DNAzyms (**30**) ist an den 5'- und 3'-Enden mit einem Fluorophor/Quencher-Paar functionalisiert. Die elektrochemisch induzierte Oxidation der die Au-NPs vernetzenden Bis(anilin)-Einheiten ($E = 0.25 \text{ V}$ gegen SCE) ergab eine saure Elektrolytlösung mit pH 5.8, was die katalytisch aktive Struktur des Mg^{2+} -abhängigen DNAzyms lieferte. Diese katalysierte die hydrolytische Spaltung des Substrats **30** und löste beim fragmentierten Fluorophor-modifizierten Produkt Fluoreszenz aus. Anschließende elektrochemische Reduktion der Chinoid-Brücken ($E = -0.05 \text{ V}$ gegen SCE) zu Bis(anilin)-Einheiten verschob den pH-Wert des Elektrolyten wieder zu 7.2, wodurch die i-Motiv-Struktur – ein Teil der DNAzym-Einheit – dissoziierte. Dies trennte die Untereinheiten **28** und **29** in eine katalytisch inaktive Anordnung. Durch abwechselnde Oxidation und Reduktion der verbrückenden Einheiten der Au-NP-Matrix wurde der Elektrolyt-pH zwischen den Werten 5.8 und 7.2 umgeschaltet, was zum zyklischen Wechsel zwischen „AN“ und „AUS“ der DNAzym-Funktionen führte (Abbildung 25 E).

lin)-vernetzte Au-NP-Matrix herzustellen. Die Bis(anilin)-Einheiten weisen quasireversible Redoxeigenschaften ($E = -0.05 \text{ V}$ gegen SCE) auf und werden unter Freisetzung von Protonen zum chinoiden Zustand oxidiert. Der umgekehrte Vorgang, bei dem die Chinoid-Einheiten zu den Bis(anilin)-Zuständen reduziert werden, bedingt die Aufnahme von Protonen aus der Lösung. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass die potentialgesteuerte Oxidation der Bis(anilin)-vernetzten AuNP-modifizierten Elektrode ($E = 0.25 \text{ V}$ gegen SCE) in einer neutralen Elektrolytlösung zur Acidifizierung der Lösung bis zu pH 5.8 führte. Die umgekehrte Einstellung des Elektrodenpotentials auf -0.05 V gegen SCE führte zur Reduktion der Chinoid-Brückeneinheiten in den Bis(anilin)-Zustand, wobei Protonen aus der Lösung aufgenommen und die neutrale Elektrolytlösung mit pH 7.2 wiederhergestellt wurde. Dementsprechend wurde diese Bis(anilin)-vernetzte Au-NP-modifizierte Elektrode eingesetzt, um die katalytischen Aktivitäten des Mg^{2+} -abhängigen DNAzyms umzuschalten (Abbildung 25 D). Die Stränge **28** und **29** enthielten die funktionellen Domänen, um die katalytische Aktivität des DNAzyms an- und auszuschalten. Die Domänen I und II umfassen die Sequenzen, aus denen die Schleifenregion des DNAzyms besteht und die Domänen III und IV stellen die Substratbindungsstellen bereit. Die Domänen V und VI der Stränge **28** und **29** enthalten C-reiche Sequenzen, die unter sauren Bedingungen (pH 5.8) ein i-Motiv bilden. Die Domänen VII und VIII weisen drei komplementäre Basenpaarungsregionen auf, die eingefügt wurden, um in saurem Milieu die Selbstorganisation der katalytisch aktiven DNAzym-Einheit durch Stabilisierung der supramolekularen Struktur zwischen den Nukleinsäuren **28** und **29** über eine kooperative i-Motiv-Struktur und Basenpaarung der Duplexdomäne VII/VIII zu begünstigen. Das Substrat des Mg^{2+} -abhängigen DNAzyms (**30**) ist an den 5'- und 3'-Enden mit einem Fluorophor/Quencher-Paar functionalisiert. Die elektrochemisch induzierte Oxidation der die Au-NPs vernetzenden Bis(anilin)-Einheiten ($E = 0.25 \text{ V}$ gegen SCE) ergab eine saure Elektrolytlösung mit pH 5.8, was die katalytisch aktive Struktur des Mg^{2+} -abhängigen DNAzyms lieferte. Diese katalysierte die hydrolytische Spaltung des Substrats **30** und löste beim fragmentierten Fluorophor-modifizierten Produkt Fluoreszenz aus. Anschließende elektrochemische Reduktion der Chinoid-Brücken ($E = -0.05 \text{ V}$ gegen SCE) zu Bis(anilin)-Einheiten verschob den pH-Wert des Elektrolyten wieder zu 7.2, wodurch die i-Motiv-Struktur – ein Teil der DNAzym-Einheit – dissoziierte. Dies trennte die Untereinheiten **28** und **29** in eine katalytisch inaktive Anordnung. Durch abwechselnde Oxidation und Reduktion der verbrückenden Einheiten der Au-NP-Matrix wurde der Elektrolyt-pH zwischen den Werten 5.8 und 7.2 umgeschaltet, was zum zyklischen Wechsel zwischen „AN“ und „AUS“ der DNAzym-Funktionen führte (Abbildung 25 E).

3. Anwendungen schaltbarer DNA-Systeme

Die Entwicklung von DNA-Hydrogelen weckt in letzter Zeit erhebliche Forschungsinteressen.^[65] DNA-Hydrogelen werden durch Vernetzung von DNA-Untereinheiten oder

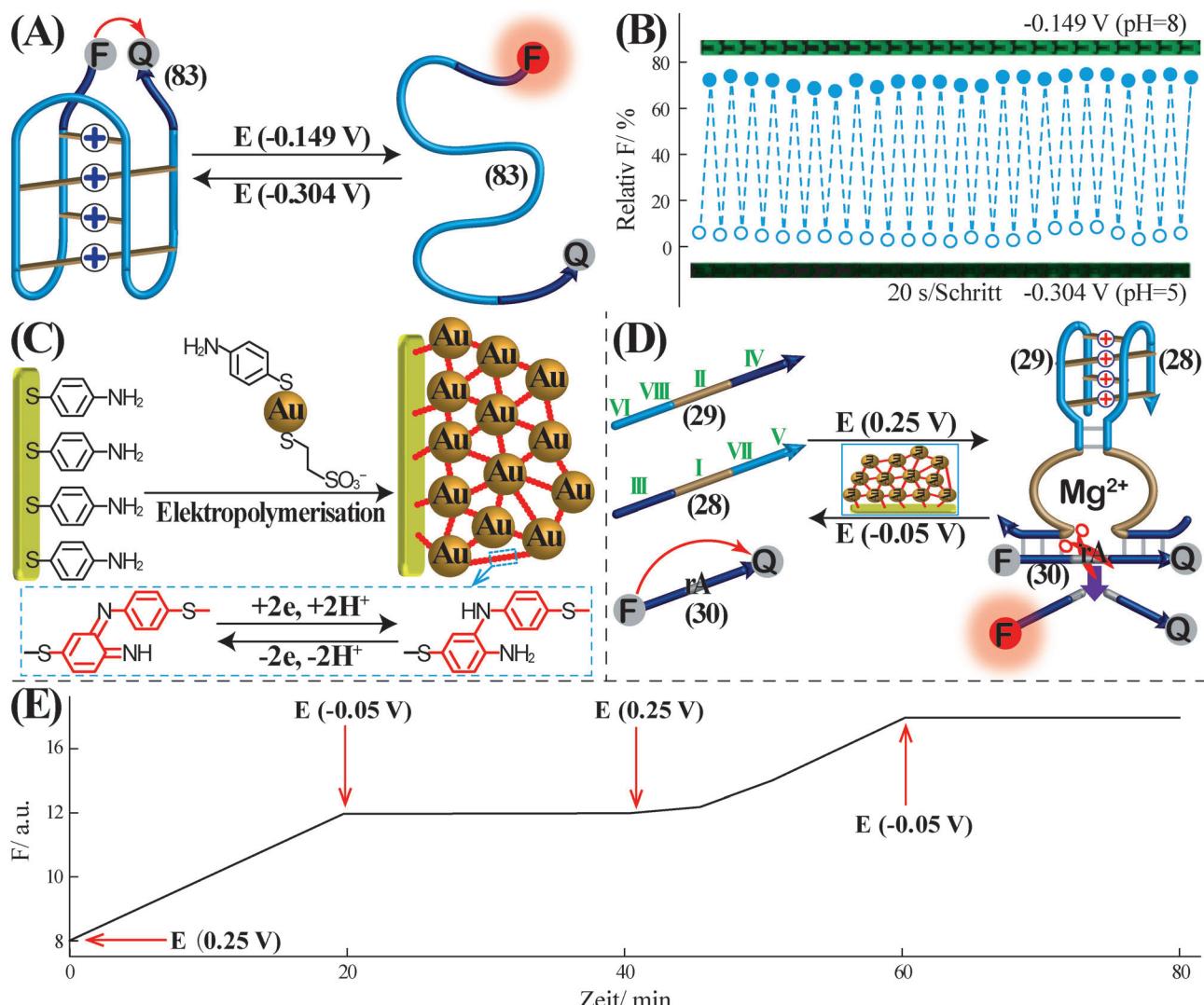


Abbildung 25. A) Elektrochemisch gesteuerte Übergänge von einer i-Motiv- zur Random-Coil-Struktur durch zyklische elektrochemische Oxidation von Wasser (pH 5.0) und elektrochemische Reduktion von Wasser zu Wasserstoff (pH 8.0). Die DNA-Struktur ist mit einem Fluorophor/Quencher-Paar markiert, und die schaltbaren i-Motiv/Random-Coil-Übergänge werden über die Fluoreszenzänderungen des Fluorophors beobachtet. B) Fluoreszenzänderungen nach zyklisch schaltbaren Übergängen des i-Motivs, pH 5.0 (geringe Fluoreszenz), in die Random-Coil-Konfiguration, pH 8.0 (starke Fluoreszenz), und zurück. Mit Genehmigung aus Lit. [63]. Copyright 2010 American Chemical Society. C) Elektrochemische Synthese von Bis(anilin)-vernetzten Au-NP-Matrizes auf einer Elektrodenoberfläche und zyklisches, elektrochemisch gesteuertes Ansäuern oder Neutralisieren der Elektrolytlösung durch Oxidation oder Reduktion der vernetzenden Bis(anilin)-Brückeneinheiten. D) Elektroinduzierte Aktivierung und Inaktivierung des Mg²⁺-abhängigen DNAzyms durch elektrochemisches Umschalten des pH-Werts der Elektrolytlösung mittels Oxidation und Reduktion der durch Bis(anilin) vernetzten und mit der Elektrode assoziierten Au-NPs. E) Elektrochemisch induzierte „AN“/„AUS“-Schaltung des Mg²⁺-abhängigen DNAzyms unter Verwendung der Bis(anilin)-vernetzten, an die Elektrode gebundenen NPs als funktionaler Matrix für elektrogesteuerte pH-Änderungen. Die „AN“- und „AUS“-Aktivierung bzw. -Inaktivierung des DNAzyms wird über die Fluoreszenz registriert, die bei der DNAzym-katalysierten Spaltung des Fluorophor/Quencher-modifizierten Substrats entsteht. Mit Genehmigung aus Lit. [64]. Copyright 2010 American Chemical Society.

Nukleinsäure-funktionalisierten, hydrophilen Polymerketten, z. B. Nukleinsäure-modifizierten Acrylamid-Copolymerketten, gebildet. Die Möglichkeit, Nukleinsäure-Einheiten durch Basenpaarung,^[66] Ionen-stabilisierte Strukturen,^[67] pH^[68] oder Licht^[69] zu verknüpfen, bietet eine vielseitige Plattform an Vernetzungsmotiven. Besonders interessant sind schaltbare DNA-Hydrogele, die stimuliinduzierte Übergänge vom Gel zur Lösung eingehen. Für DNA-Hydrogele wurden Anwendungen im kontrollierten Wirkstofftransport,^[69] der Katalyse^[70] und der Schadstoffentfernung^[71] vorgeschlagen. Der

Aufbau eines pH-gesteuerten DNA-Hydrogels wird in Abbildung 26 A dargestellt.^[68] Baustein des Gels ist eine dreiarige, Y-förmige DNA-Struktur mit drei einzelsträngigen Überhängen I, II und III, die je eine Untereinheit des C-reichen i-Motivs bilden. Bei pH 5.2 führte die Vernetzung der Y-förmigen DNA-Einheiten durch die Bildung von i-Motiv-Bindungen zur Entstehung des Hydrogels. Neutralisieren des Systems (pH 7.0) spaltete die i-Motiv-Brücken und ergab eine Lösung der monomeren Y-förmigen Nukleinsäure-Einheiten. Die pH-gesteuerten Gel-Lösung-Übergänge wurden durch

rheologische Messungen charakterisiert. Ein weiterer Ansatz zum Design schaltbarer, katalytischer DNA-Hydrogele verwendete die Synthese eines Acrylamid-Copolymers, das aus der Acrydit-Nukleinsäure **84** und dem Acrylamid-Monomer zusammengesetzt ist.^[70] Die Copolymer-Ketten enthielten die aus 5'-AAGGG-3' bestehenden Nukleinsäureanhänge **84**, wodurch Untereinheiten für die durch K⁺-Ionen induzierte Anordnung des G-Quadruplex-verbrückten Hydrogels zur Verfügung gestellt wurden (Abbildung 26B). Die Eliminierung der stabilisierenden K⁺-Ionen von den G-Quadruplex-Einheiten durch Zugabe von 18-Krone-6-Ether (CE) löste die G-Quadruplexe auf und führte zu einer Lösung der getrennten Acrylamid-Ketten. Durch abwechselnde Zugabe von K⁺-Ionen und CE wurde das System zwischen den Hydrogel- bzw. Lösungsphasen umgeschaltet. Rheologische Messungen bestätigten die Hydrogel-Lösung-Übergänge (Speichermodul des Hydrogels $G' \approx 5$ Pa). Die Bindung von Hämin an das durch K⁺-Ionen induzierte Hydrogelnetzwerk durch die G-Quadruplex-Einheiten führte zur Bildung des katalytisch aktiven, HRP-imitierenden Hämin/G-Quadruplex-DNAzyms, das die Oxidation von ABTS²⁻ mit H₂O₂ zum

farbigen Produkt ABTS⁻ katalysierte (Abbildung 26C). Über die zyklische, durch K⁺-Ionen gesteuerte Bildung des katalytisch aktiven DNAzym-Hydrogels und die durch CE induzierte Auflösung des Hydrogels wurden die katalytischen Funktionen des Systems zwischen „AN“- und „AUS“-Zuständen umgeschaltet. Beschrieben wurde auch die durch Ag⁺-Ionen gesteuerte Vernetzung aller Y-förmigen Nukleinsäureeinheiten oder der Nukleinsäure-funktionalisierten Acrylamid-Copolymere zur Herstellung eines Hydrogels durch Bildung kooperativ stabilisierter Duplex-Nukleinsäuren mittels C-Ag⁺-C-Brücken.^[67] Die schaltbaren Hydrogel-Lösung-Übergänge wurden durch Eliminierung der Ag⁺-Ionen aus den Brückeneinheiten unter Verwendung von Cysteamin erreicht.

Mesoporöse Materialien und besonders mesoporöse SiO₂-Nanopartikel (MP SiO₂-NP) sind interessante Nanocontainer mit großer Oberfläche, die molekulare Substrate in den Poren einschließen und als Systeme zum Wirkstofftransport dienen können.^[72,73] Besonders interessant sind mit Substraten beladene und durch „intelligente Tore“ verschlossene MP SiO₂-NPs, die in Gegenwart passender Auslöser die Tore öffnen

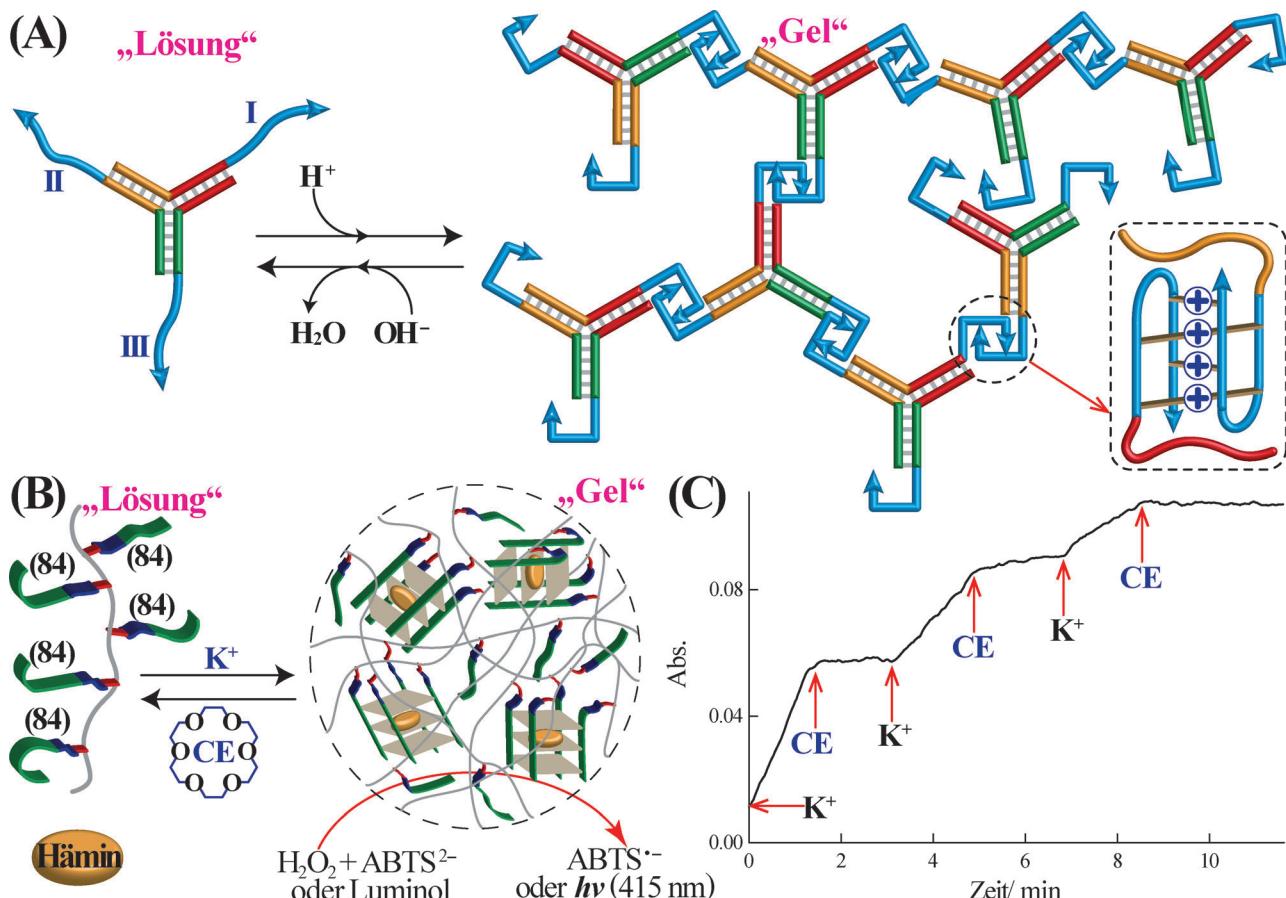


Abbildung 26. A) pH-gesteuerte Anordnung von DNA-Hydrogelen unter Verwendung eines i-Motivs als vernetzendes Element. B) Zykisch schaltbare Übergänge eines Nukleinsäure-modifizierten Acrylamid-Copolymers zwischen der Copolymer-Lösung und G-Quadruplex-vernetzten Hydrogelzuständen. K⁺-Ionen stabilisieren die durch den G-Quadruplex vernetzten Hydrogele, während eine Kronenether-induzierte Bindung der K⁺-Ionen die G-Quadruplex-Einheiten trennt und zur Copolymer-Lösung führt. Die Bindung von Hämin an die G-Quadruplex-Einheiten erzeugt ein Meerrettichperoxidase(HRP)-imitierendes DNAzym-Hydrogel, das die katalytische Oxidation von ABTS²⁻ durch H₂O₂ zu ABTS⁻ vermittelt. C) Absorptionsänderungen während der zyklischen Aktivierung des DNAzym-Hydrogels in Richtung der Oxidation von ABTS²⁻: „AN“-Schalten durch Zugabe von K⁺-Ionen; „AUS“-Schalten durch Zugabe des 18-Kronenethers (CE). Mit Genehmigung aus Lit. [70]. Copyright 2013 American Chemical Society.

und das Medikament abgeben. Bisher wurden verschiedene Auslöser wie Licht,^[74,75] Redoxreaktionen,^[75,76] katalytische Prozesse,^[77] pH^[78] oder thermische Auslöser^[79] verwendet, um die Poren der MP SiO₂-NPs aufzuschließen. Ein großer Fortschritt könnte von der Entwicklung schaltbarer „Abdeckungen“ erwartet werden, da derart verschlossene Poren die dosisabhängige Freisetzung von Wirkstoffen ermöglichen könnten.

Die photoneninduzierte, schaltbare Freisetzung eines Rhodamin-6G(Rh6G)-Substrats aus DNA-gesteuerten MP SiO₂-NPs wurde gezeigt (Abbildung 27 A).^[80] Die MP SiO₂-NPs wurden mit der Nukleinsäure **85** modifiziert und ihre Poren mit dem Rh6G-Substrat beladen. Die intern mit *trans*-Azobenzol functionalisierte Nukleinsäure **86a** wurde verwendet, um die Poren durch Hybridisierung mit den oberflächenverankerten Nukleinsäureeinheiten **85** abzudecken. Die resultierenden Duplexe werden durch Basenpaarung und

die kooperative Interkalation der *trans*-Azobenzol-Einheiten stabilisiert. UV-induzierte Photoisomerisierung der *trans*-Azobenzol-Einheiten zum *cis*-Photoisomer **86b** destabilisierte die Duplexe, was zur Trennung der abdeckenden Duplexe und zur Freisetzung des in den Poren eingeschlossenen Rh6G-Substrats führte. Weitere Photoisomerisierung der *cis*-Azobenzol-markierten DNA **86b** durch sichtbares Licht zum *trans*-Azobenzol **86a** stellte die abdeckenden Einheiten wieder her und verhinderte die Freisetzung des Rh6G-Substrats. Durch zyklische Photoisomerisierung der *trans*-Azobenzol-funktionalisierten Duplexkappen in den *cis*-Zustand und zurück wurde die an- und ausschaltbare Freisetzung des Rh6G-Substrats demonstriert (Abbildung 27B). Für den Einschluss des Chemotherapeutikums Doxorubicin mithilfe der *trans*-Azobenzol-Kappen wurde die UV-gesteuerte, intrazelluläre Freisetzung des Medikaments nachgewiesen.^[80]

Die pH-gesteuerte Abgabe eines in den MP SiO₂-NPs eingeschlossenen Substrats wurde unter Verwendung eines i-Motiv-DNA-Quadruplexes als pH-sensitive Abdeckung demonstriert (Abbildung 28A).^[81] Die C-reiche Nukleinsäure **87** wurde kovalent an die Oberfläche von MP SiO₂-NPs gebunden und die Nanoporen bei pH 8.0 mit dem Substrat Rhodamin B (RhB) beladen. Ansäuern des Systems auf pH 5.0 führte zur Bildung des i-Motivs, das das Substrat in der Pore einschließt. Die Öffnung der Poren bei pH 8.0 und die Umwandlung der i-Motiv-Kappen zu Random-Coil-Strukturen setzte das Substrat frei. Durch den zyklischen Wechsel des pH-Wertes im System zwischen sauren (pH 5.0) und basischen (pH 8.0) Bedingungen wurde der schaltbare Einschluss („AUS“-Zustand) und die Freisetzung („AN“-Zustand) des in den Poren gefangenen RhB gezeigt (Abbildung 28B). Das photonische Auslösen von pH-Änderungen in der Lösung wurde weiter eingesetzt, um die MP SiO₂-NP-Abdeckungen zu öffnen und das in den Poren eingeschlossene Substrat freizusetzen (Abbildung 28C).^[82] Das System machte sich die Tatsache zunutze, dass Malachitgrün-Carbinol (MGC, **88a**) eine photoinduzierte Dissoziation zum Carbokation (**88b**) und OH⁻-Ionen eingeht, die sich im Dunkeln wieder zu MGC (**88a**) re kombinieren.^[83] Dabei setzt die Bestrahlung des Systems OH⁻-Ionen frei, wodurch die Lösung basisch wird, während die Rekombination der ionischen Produkte durch Entfernen der OH⁻-Ionen zu einer sauren Lösung führt. Demzufolge wurde die C-reiche Nukleinsäure **89** kovalent an die Oberfläche der MP SiO₂-NPs gebunden. Das Ru^{II}-Tris-bipyridin-Substrat, [Ru(bpy)₃]²⁺, wurde unter Beibehaltung der Random-Coil-Konfiguration der **89**-Ketten in die Poren eingebracht. Ansäuern des Systems überführte die Nukleinsäurestränge **89** in die i-Motiv-Konfiguration, die die Poren verschloss. In Gegenwart von MGC (**88a**) ermöglichen die photonisch und thermisch gesteuerten pH-Änderungen eine zyklische an- und ausschaltbare Freisetzung des Substrats (Abbildung 28D). Das System wurde sauren Bedingungen ausgesetzt, worin die DNA-Kappen die i-Motiv-Konfiguration beibehielten. Die durch UV-Licht ausgelöste Spaltung von MGC neutralisierte das System, worauf die Auflösung der i-Motiv-Einheiten und die Freisetzung des Substrats [Ru(bpy)₃]²⁺ folgten. Die thermische Rekombination des Carbokations **88b** mit OH⁻-Ionen im Dunkeln säuerte die Lösung erneut an und führte zur Rekonfiguration der i-

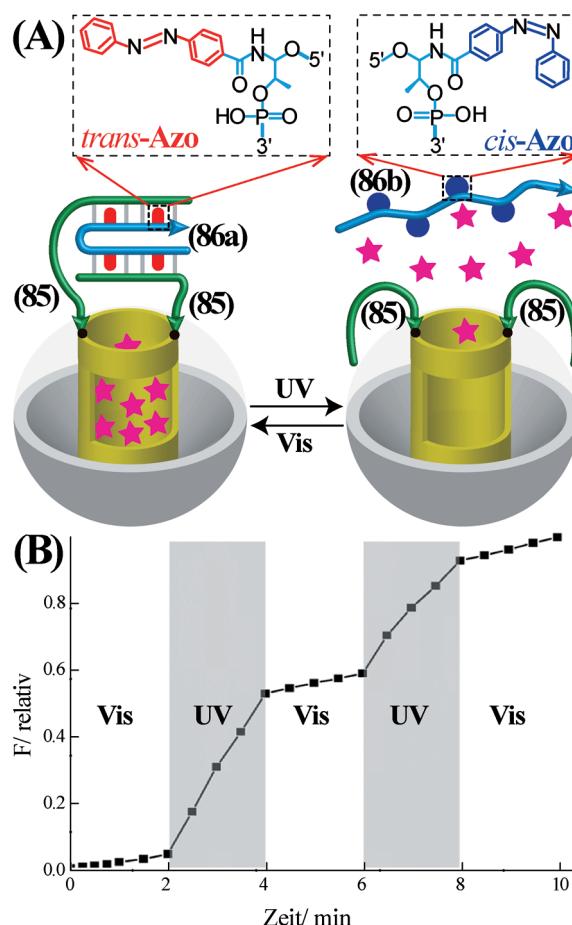


Abbildung 27. A) Photoinduziertes Sperren und Ent sperren mesoporöser SiO₂-NPs durch Nukleinsäure-Kappen (caps), die mit photoisomerisierbaren Einheiten functionalisiert wurden. Die mit *trans*-Azobenzol modifizierte Nukleinsäure **86a** hybridisiert mit den Nukleinsäure-Einheiten **85**, um Duplex-Kappen zu bilden. Photoisomerisierung der *trans*-Azobenzol-Einheiten zu *cis*-Azobenzol trennt den Strang **86b** ab, führt zur Entriegelung der Poren und der Freisetzung des eingeschlossenen Substrats (Rh6G). B) Fluoreszenzänderungen durch die photoinduzierte zyklische Freisetzung aus den Poren und Blockierung von Rh6G in den Poren. Mit Genehmigung aus Lit. [80]. Copyright 2012 American Chemical Society.

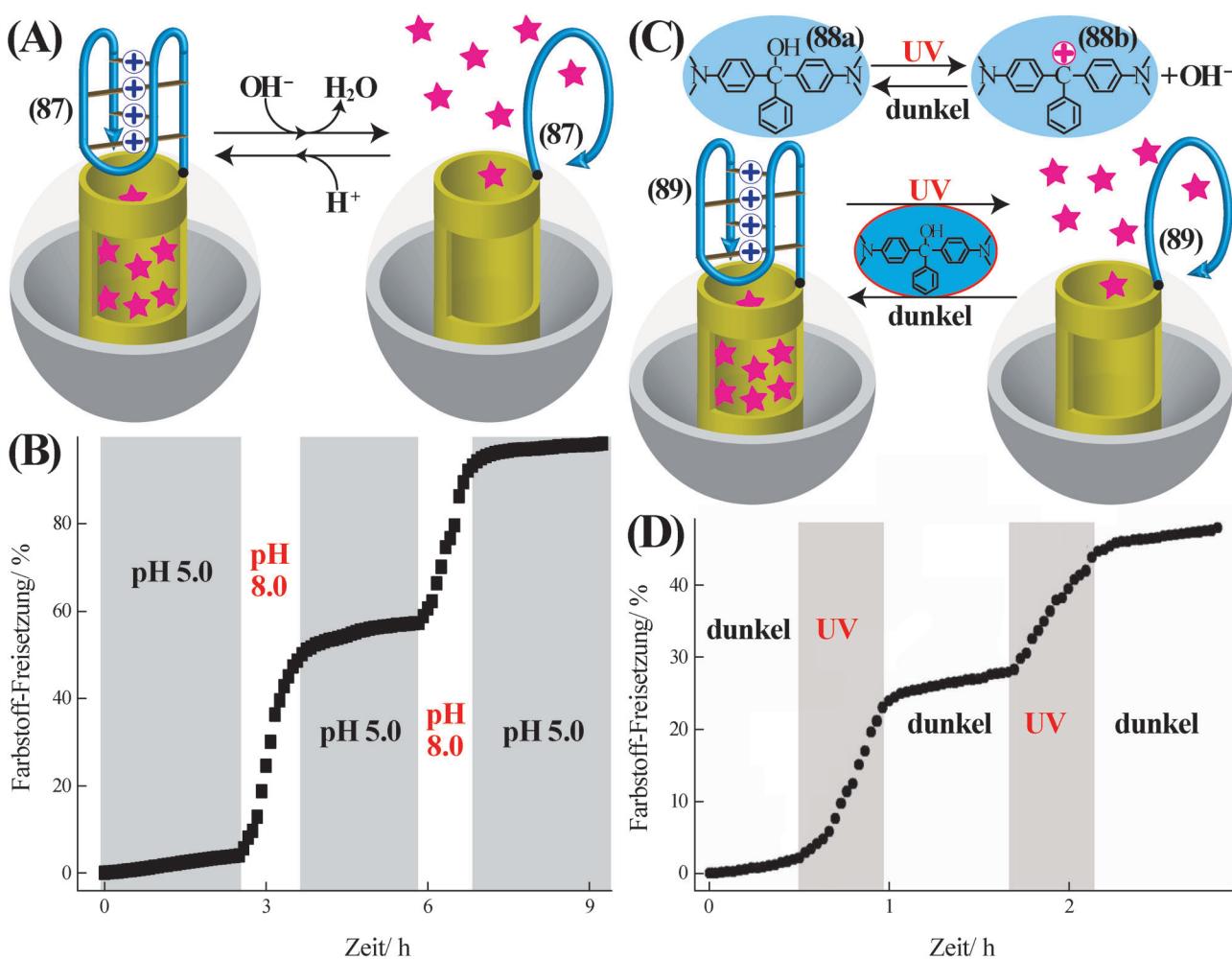


Abbildung 28. A) Die pH-induzierte, zyklische Freisetzung und Blockierung eines Fluoreszenzfarbstoffs (RhB) mithilfe eines i-Motivs als verriegelnde/entriegelnde Schleuseneinheit. B) Zeitabhängige Fluoreszenzänderungen während der pH-schaltbaren Freisetzung von RhB aus den mesoporösen SiO₂-NPs: pH 5.0 „AUS“-geschalteter Zustand; pH 8.0 „AN“-geschalteter Zustand. Mit Genehmigung aus Lit. [81]. Copyright 2011 Oxford University Press. C) pH-Änderungen in der Lösung, ausgelöst durch die Photoanregung von Malachitgrün (88a), verursachen die schaltbare, lichtinduzierte Dissoziation der verriegelnden i-Motive und Freisetzung des eingeschlossenen Fluoreszenzsubstrats [Ru(bpy)]²⁺ und die umgekehrte Verriegelung der Poren durch Rekombination des Carbokations 88b mit dem OH⁻-Photoprodukt im Dunkeln. D) Zyklische Fluoreszenzänderungen nach Entriegelung der i-Motiv-Abdeckungen über die photoinduzierte Dissoziation von Malachitgrün (88a) und reversiblem Wiederverschluss der Poren mit den i-Motiv-Einheiten durch Rekombination des Carbokations 88b und der OH⁻-Photoprodukte. Mit Genehmigung aus Lit. [82]. Copyright 2012 Wiley-VCH.

Motiv-Abdeckungen. Durch zyklische „AN“- und „AUS“-Bestrahlung des Systems wurde die „AN“- bzw. „AUS“-schaltbare Freisetzung des Substrates erreicht.

Eine interessante Anwendung der Ionen-gesteuerten Bildung und Dissoziation von Nukleinsäure-Duplexen nutzt den Hg²⁺-kontrollierten Ionenfluss durch einzelne Nanokanäle.^[84] Konische Nanokanäle wurden durch eine asymmetrische Ätztechnik hergestellt und die Kanäle mit Gold gesputtert. Die Thymin-reiche Random-Coil-Nukleinsäure **90** wurde kovalent an die Goldoberfläche, die die Kanäle auskleidet, gebunden und blockiert auf diese Weise die Poren (Abbildung 29 A).^[84a] In Anwesenheit von Hg²⁺-Ionen wurde die Nukleinsäure **90** versteift und zu durch T-Hg²⁺-T-Brücken stabilisierten Duplex-Haarnadelstrukturen komprimiert, was zur Öffnung der Poren führte. Dabei lieferten die von DNA-Strang **90** blockierten Poren einen geringen Ionenstrom,

während die durch Hg²⁺-Ionen stimulierte Öffnung der Poren einen starken Ionenstrom nach sich zog. Durch die zyklische Behandlung der modifizierten Poren mit Hg²⁺-Ionen/Cystein wurde der Ionenstrom über die Pore zwischen „AN“ bzw. „AUS“-Zuständen umgeschaltet (Abbildung 29B).

Der Aktivierung von Enzym- oder Enzym/DNAzym-Kaskaden findet zunehmendes Interesse in der Nanobiotechnologie.^[85] Besonders die Organisation von Enzymen auf DNA-Gerüsten wurde als generelles Mittel angesehen, um biokatalytische Kaskaden anzuregen. Die photochemisch gesteuerte Bildung oder Dissoziation von doppelsträngigen Nukleinsäuren mittels photoisomerisierbarer Azobenzol-Einheiten wurde genutzt, um biokatalytische Kaskaden oder Enzym/DNAzym-Kaskaden umzuschalten (Abbildung 30).^[86] Meerrettichperoxidase (HRP) wurde mit Nukleinsäure **91** modifiziert und Glucoseoxidase mit Nuklein-

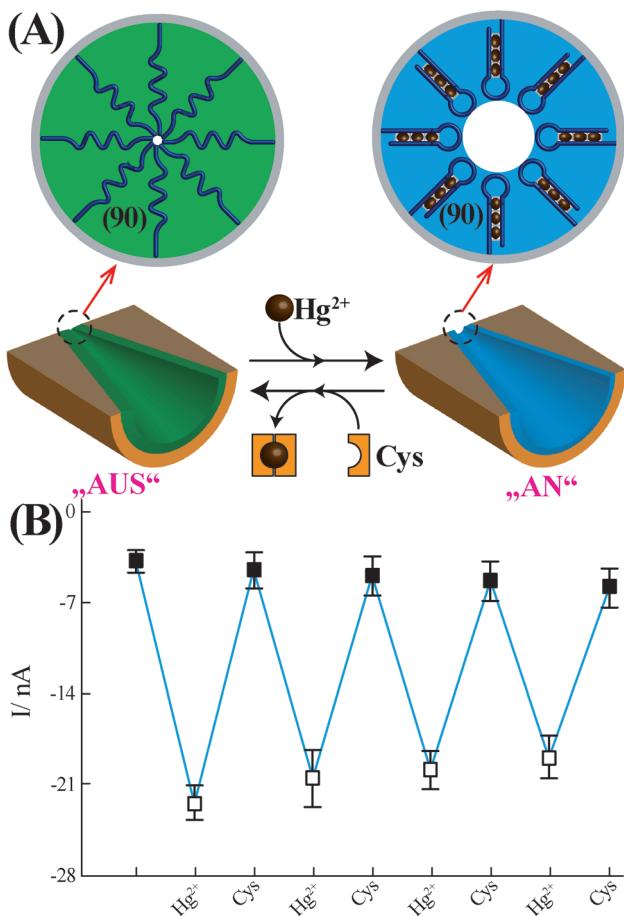


Abbildung 29. A) Mittels Hg^{2+} -Ionen/Cystein schaltbare Öffnung und Schließung von Nanoporen. B) Schaltbare Ionenströme in Gegenwart von geschlossenen Nanoporen (geringer Strom) oder offenen Nanoporen (hoher Strom). Mit Genehmigung aus Lit. [84a]. Copyright 2013 Royal Society of Chemistry.

säure **92**, die zu Strang **91** teilweise komplementär war und photoisomerisierbare *cis*-Azobenzol-Anhänge enthielt. Unter diesen Bedingungen konnte der *cis*-Azobenzol-modifizierte Strang **92** nicht mit Strang **91** hybridisieren, und die beiden Enzyme konnten nicht miteinander kommunizieren. Photoisomerisierung der *cis*-Azobenzol-Anhänge zu *trans*-Azobenzol durch sichtbares Licht ($\lambda = 450 \text{ nm}$) resultierte in der kooperativen Stabilisierung des Doppelstrangs aus **91** und **92** (Abbildung 30). Die Bildung des Duplex **91/92** führte zur sterischen Annäherung zwischen GOx und HRP, wodurch die Zwei-Enzym-Kaskade aktiviert wurde. Die GOx-vermittelte aerobe Oxidation von Glucose lieferte Gluconsäure und H_2O_2 . Letzteres fungierte als Substrat für das Enzym HRP, das die H_2O_2 -induzierte Oxidation von ABTS^{2-} zum farbigen Produkt $\text{ABTS}^{\cdot-}$ katalysierte. Die große sterische Nähe zwischen GOx und HRP verursachte eine hohe lokale Konzentration an H_2O_2 , dem Substrat von HRP, wodurch die Zwei-Enzym-Kaskade wirksam aktiviert werden konnte. Durch die photochemische Isomerisierung der *trans*-Azobenzol-Einheiten zum *cis*-Zustand wurde der Duplex, der die beiden Enzyme zusammenhält, gespalten und führte zum „AUS“-Schalten der Zwei-Enzym-Kaskade.

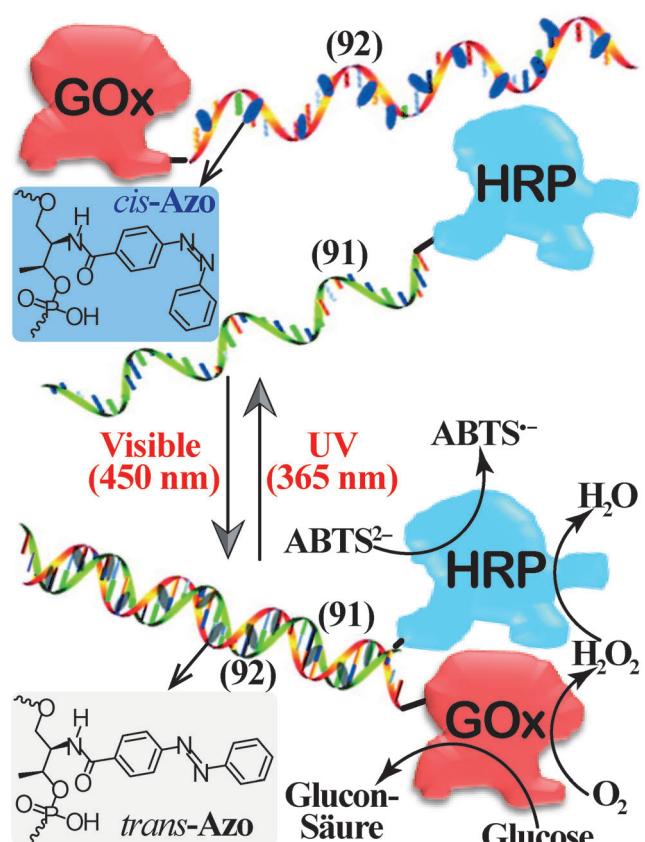


Abbildung 30. Eine photoinduzierte Zwei-Enzym-Kaskade unter Verwendung einer Glucoseoxidase (GOx), funktionaliert mit einer *trans*-Azobenzol-modifizierten Nukleinsäure **91**, und einer mit Nukleinsäure **92** modifizierten Meerrettichperoxidase (HRP). Der durch *trans*-Azobenzol stabilisierte Duplex **91/92** führt zur Aktivierung der Zwei-Enzym-Kaskade. Photoisomerisierung der *trans*-Azobenzol-Einheiten in den *cis*-Azobenzol-Zustand resultiert in der Trennung des Duplex und der Blockierung der Zwei-Enzym-Kaskade. Mit Genehmigung aus Lit. [86]. Copyright 2011 American Chemical Society.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Signalgesteuerte DNA-Schalter bilden eine große Klasse wichtiger funktioneller Materialien für nanobiotechnologische Anwendungen. Verschiedene externe Auslöser wie Metallionen, pH, Licht oder elektrische Stimuli wurden eingesetzt, um die DNA-Schalter zu bedienen, und sowohl der Betrieb in Lösung als auch auf Oberflächen wurde demonstriert. Obwohl erhebliche Fortschritte in der Entwicklung von DNA-Schaltern und deren praktischen Anwendung erreicht wurden, liegen noch wichtige Herausforderungen vor uns. Die Einführung zusätzlicher Auslöser, wie andere Metallionen (z. B. durch den Einbau synthetischer Basen in die DNA, Ligandoside)^[87] oder die Verwendung von Aptamer-Substrat-Komplexen,^[88] könnten die Anwendungsmöglichkeiten dieser molekularen Maschinen erweitern. Auch die Entwicklung zusätzlicher Auslesesignale, um die Schaltsysteme zu untersuchen, wie resonanter Chemilumineszenz-energietausch (CRET),^[89] Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)^[90] und die dynamische Rastersondennmikroskopie,^[91] könnten neue Werkzeuge zur Bildgebung liefern.^[91]

Die Anwendung von DNA-Schaltern stellt eine große wissenschaftliche und technologische Herausforderung dar, doch kann man sich den Nutzen dieser Systeme für die Entwicklung innovativer photonischer Nanostrukturen, für eine „intelligente“ Nanomedizin und die kontrollierte chemische Synthese vorstellen. Von der Schaltung und Rekonfiguration von DNA-Maschinen mit metallischen Nanopartikeln^[92] oder Fluorophor-Metallnanopartikel-Konjugaten^[93] wird erwartet, dass sie zu interessanten plasmonischen Phänomenen wie einer interpartikulären plasmonischen Kopplung oder oberflächenverstärkter Fluoreszenz führen. Insbesondere sind schaltbare plasmonische Maschinen geplant, die als Antennen fungieren.^[94] Ebenso bestehen erstaunliche Möglichkeiten für die Anwendung der reizgesteuerten schaltbaren DNA-Maschinen zur Abbildung intrazellulärer Nanoumgebungen und der Untersuchung der Dynamik intrazellulärer Transformationen. Zum Beispiel könnten pH-gesteuerte DNA-Schalter sowie begleitende Fluoreszenzänderungen und die Freisetzung von Nukleinsäuresträngen für die Aufzeichnung räumlicher und zeitlicher pH-Änderungen in Zellen^[95] bzw. zum Ausschalten schädlicher Gene^[96] eingesetzt werden. Auch die Entwicklung schaltbarer Wirkstoffcontainer im Nano- oder Mikrometermaßstab mit DNA als schaltbarer Matrix für die langsame oder dosisabhängige Freisetzung von Medikamenten ist ein anspruchsvolles Ziel für die Zukunft. Die Anordnung schaltbarer DNA-Hydrogele,^[65] DNA-bedeckter mesoporöser Nanomaterialien mit Schranken aus Nukleinsäureschaltern^[97] sowie die Entwicklung schaltbarer DNA-Schalter und reizgesteuerter DNA-Mikrokapseln^[98] bieten interessante Zugänge. Besonders wichtig wäre die Herstellung schaltbarer Nano-/Mikro-Carrier, die von Biomarkern ausgelöst werden. Solche Systeme könnten als reizgesteuerte Matrix auf zelluläre Umgebungen zielen.

Schließlich könnte die schaltbare Freisetzung von Substraten aus reizgesteuerten Behältern zur programmierten Synthese von Produkten durch selektive und schrittweise Öffnung der entsprechenden Behälter eingesetzt werden. Offensichtlich ist das Feld der DNA-Schalter ein entwicklungsfähiges Forschungsgebiet, das interdisziplinäre Forschungsbemühungen mit außerordentlicher Bedeutung für die Materialwissenschaft, Sensorentwicklung, intrazelluläre Bildgebung, Nanomedizin und programmierte chemische Synthese anziehen wird.

Unsere Forschungen zur DNA-Nanotechnologie werden durch den NanoSensoMach ERC Advanced Grant No. 267574 im Rahmen des EC FP7/2007–2013 Program unterstützt.

Eingegangen am 24. April 2014,
veränderte Fassung am 25. Juni 2014
Online veröffentlicht am 17. Dezember 2014

Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim

[1] a) K. Gehring, J. L. Leroy, M. Guéron, *Nature* **1993**, *363*, 561–565; b) J. L. Leroy, M. Guéron, J. L. Mergny, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 1600–1606; c) S. Nonin, J. L. Leroy, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 399–414.

- [2] a) G. W. Collie, G. N. Parkinson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5867–5892; b) D. Sen, W. Gilbert, *Nature* **1988**, *334*, 364–366; c) J. T. Davis, G. P. Spada, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 296–313.
- [3] a) Y. Miyake, H. Togashi, M. Tashiro, H. Yamaguchi, S. Oda, M. Kudo, Y. Tanaka, Y. Kondo, R. Sawa, T. Fujimoto, T. Machinami, A. Ono, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2172–2173; b) Y. Tanaka, S. Oda, H. Yamaguchi, Y. Kondo, C. Kojima, A. Ono, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 244–245.
- [4] A. Ono, S. Q. Cao, H. Togashi, M. Tashiro, T. Fujimoto, T. Machinami, S. Oda, Y. Miyake, I. Okamoto, Y. Tanaka, *Chem. Commun.* **2008**, 4825–4827.
- [5] a) A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422–4437; b) X. Liang, T. Mochizuki, H. Asanuma, *Small* **2009**, *5*, 1761–1768; c) X. Liang, N. Takenaka, H. Nishioka, H. Asanuma, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 553–560; d) X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1877–1883.
- [6] a) S. E. Osborne, I. Matsumura, A. D. Ellington, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 5–9; b) R. A. Potyrailo, R. C. Conrad, A. D. Ellington, G. M. Hieftje, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3419–3425; c) J. F. Lee, G. M. Stovall, A. D. Ellington, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 282–289; d) I. Willner, M. Zayats, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6408–6418; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6528–6538; e) M. Famulok, G. Mayer, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1349–1358.
- [7] a) R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 223–229; b) I. Willner, B. Shlyahovsky, M. Zayats, B. Willner, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1153–1165; c) M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715–3743; d) S. K. Silverman, *Chem. Commun.* **2008**, 3467–3485; e) G. F. Joyce, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 791–836; f) G. F. Joyce, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6420–6436; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6540–6557.
- [8] a) A. H. Brivanlou, J. E. Darnell, *Science* **2002**, *295*, 813–818; b) M. C. Thomas, C. M. Chiang, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *41*, 105–178; c) M. J. Moscou, A. J. Bogdanove, *Science* **2009**, *326*, 1501; d) J. Boch, H. Scholze, S. Schornack, A. Landgraf, S. Hahn, S. Kay, T. Lahaye, A. Nickstadt, U. Bonas, *Science* **2009**, *326*, 1509–1512; e) V. B. Teif, K. Rippe, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 5641–5655.
- [9] a) P. Widlak, W. T. Garrard, *J. Cell. Biochem.* **2005**, *94*, 1078–1087; b) B. L. Stoddard, *Quart. Rev. Biophys.* **2005**, *38*, 49–95; c) S. West, N. Gromak, N. J. Proudfoot, *Nature* **2004**, *432*, 522–525.
- [10] a) D. Y. Zhang, E. Winfree, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17303–17314; b) D. Y. Zhang, G. Seelig, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 103–113.
- [11] a) M. K. Beissenhirtz, I. Willner, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3392–3401; b) C. Teller, I. Willner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 376–391; c) B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, Jr., F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature* **2000**, *406*, 605–608; d) J. Bath, A. J. Turberfield, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 275–284; e) Y. Krishnan, F. C. Simmel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3124–3156; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3180–3215; f) F. C. Simmel, W. U. Dittmer, *Small* **2005**, *1*, 284–299; g) C. D. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, *397*, 144–146; h) H. Yan, X. Zhang, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **2002**, *415*, 62–65.
- [12] a) I. Smirnov, R. H. Shafer, *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 1–5; b) F. W. Kotch, J. C. Fettinger, J. T. Davis, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3277–3280; c) J. F. Chantot, W. Guselbauer, *FEBS Lett.* **1969**, *4*, 173–176; d) W. Guselbauer, J. F. Chantot, D. Thiele, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1990**, *8*, 491–511; e) N. V. Hud, P. Schultze, V. Sklenar, J. Feigon, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 233–243; f) N. V. Hud, P. Schultze, J. Feigon, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6403–6404; g) J. Li, W. Tan, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 315–318; h) C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3779–3783; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3933–3937.
- [13] T. Li, S. Dong, E. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13156–13157.

- [14] a) X. Yang, T. Li, B. Li, E. Wang, *Analyst* **2010**, *135*, 71–75; b) T. Li, E. Wang, S. Dong, *Chem. Commun.* **2009**, 580–582.
- [15] Y. Sannohe, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16311–16313.
- [16] B. Ge, Y. C. Huang, D. Sen, H. Z. Yu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9965–9967; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 10161–10163.
- [17] A. E. Radi, C. K. O'Sullivan, *Chem. Commun.* **2006**, 3432–3434.
- [18] D. Monchaud, P. Yang, L. Lacroix, M. P. Teulade-Fichou, J. L. Mergny, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4858–4861; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4936–4939.
- [19] X. Wu, J. Chen, J. X. Zhao, *Analyst* **2013**, *138*, 5281–5287.
- [20] X. H. Yang, Y. Zhu, P. Liu, L. L. He, Q. Z. Li, Q. Wang, K. M. Wang, J. Huang, J. B. Liu, *Anal. Methods* **2012**, *4*, 895–897.
- [21] D. Han, Y. R. Kim, J. W. Oh, T. H. Kim, R. K. Mahajan, J. S. Kim, H. Kim, *Analyst* **2009**, *134*, 1857–1862.
- [22] X. Liu, A. Niazov-Elkan, F. Wang, I. Willner, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 219–225.
- [23] S. Shimron, J. Elbaz, A. Henning, I. Willner, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3250–3252.
- [24] T. Li, L. Shi, E. Wang, S. Dong, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3347–3350.
- [25] a) D. L. Ma, H. Z. He, K. H. Leung, H. J. Zhong, D. S. Chan, C. H. Leung, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3427–3440; b) Y. Xiang, Y. Lu, *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 1925–1942.
- [26] D. Liu, S. Balasubramanian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5734–5736; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5912–5914.
- [27] C. Wang, Z. Huang, Y. Lin, J. Ren, X. Qu, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 2792–2798.
- [28] S. Shimron, N. Magen, J. Elbaz, I. Willner, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8787–8789.
- [29] J. Elbaz, S. Shimron, I. Willner, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1209–1211.
- [30] a) P. Travascio, A. J. Bennet, D. Y. Wang, D. Sen, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 779–787; b) P. Travascio, P. K. Witting, A. G. Mauk, D. Sen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1337–1348; c) V. Pavlov, Y. Xiao, R. Gill, A. Dishon, M. Kotler, I. Willner, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2152–2156.
- [31] J. Sharma, R. Chhabra, H. Yan, Y. Liu, *Chem. Commun.* **2007**, 477–479.
- [32] a) K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li, V. M. Rotello, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2739–2779; b) H. Jans, Q. Huo, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2849–2866; c) R. A. Sperling, P. R. Gil, F. Zhang, M. Zanella, W. J. Parak, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1896–1908.
- [33] J. Elbaz, Z. G. Wang, R. Orbach, I. Willner, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 4510–4514.
- [34] W. Wang, Y. Yang, E. Cheng, M. Zhao, H. Meng, D. Liu, D. Zhou, *Chem. Commun.* **2009**, 824–826.
- [35] X. J. Qi, C. H. Lu, X. Liu, S. Shimron, H. H. Yang, I. Willner, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 4920–4924.
- [36] a) Z. G. Wang, J. Elbaz, I. Willner, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 304–309; b) C. Wang, J. Ren, X. Qu, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1428–1430.
- [37] X. Y. Gao, X. H. Li, W. M. Xiong, H. M. Huang, Z. Y. Lin, B. Qiu, G. N. Chen, *Electrochem. Commun.* **2012**, *24*, 9–12.
- [38] X. Xu, B. Li, X. Xie, X. Li, L. Shen, Y. Shao, *Talanta* **2010**, *82*, 1122–1125.
- [39] H. Meng, Y. Yang, Y. Chen, Y. Zhou, Y. Liu, X. Chen, H. Ma, Z. Tang, D. Liu, L. Jiang, *Chem. Commun.* **2009**, 2293–2295.
- [40] G. Pelossof, R. Tel-Vered, S. Shimron, I. Willner, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1137–1144.
- [41] D. Liu, A. Bruckbauer, C. Abell, S. Balasubramanian, D. J. Kang, D. Klenerman, D. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2067–2071.
- [42] T. Liedl, M. Olapinski, F. C. Simmel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5007–5010; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5129–5132.
- [43] T. Liedl, F. C. Simmel, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1894–1898.
- [44] a) H. Asanuma, T. Takarada, T. Yoshida, D. Tamaru, X. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2671–2673; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2743–2745; b) H. Asanuma, T. Ito, T. Yoshida, X. G. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2393–2395; *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2547–2549; c) H. Asanuma, X. G. Liang, M. Komiyama, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1055–1058.
- [45] H. Asanuma, X. Liang, T. Yoshida, M. Komiyama, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 39–44.
- [46] H. Kang, H. Liu, J. A. Phillips, Z. Cao, Y. Kim, Y. Chen, Z. Yang, J. Li, W. Tan, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2690–2696.
- [47] a) C. Dohno, S. N. Uno, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11898–11899; b) C. Dohno, K. Nakatani, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5718–5729.
- [48] S.-n. Uno, C. Dohno, H. Bittermann, V. L. Malinovskii, R. Häner, K. Nakatani, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7362–7365; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7498–7501.
- [49] X. Wang, J. Huang, Y. Zhou, S. Yan, X. Weng, X. Wu, M. Deng, X. Zhou, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5305–5309; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5433–5437.
- [50] Y. Yan, J. I. Chen, D. S. Ginger, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 2530–2536.
- [51] M. Endo, Y. Yang, Y. Suzuki, K. Hidaka, H. Sugiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10518–10522; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10670–10674.
- [52] Y. Yang, M. Endo, K. Hidaka, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20645–20653.
- [53] Y. Hachikubo, S. Iwai, T. Q. P. Uyeda, *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *106*, 1–8.
- [54] H. Nishioka, X. Liang, T. Kato, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1165–1168; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1191–1194.
- [55] X. Liang, H. Nishioka, N. Takenaka, H. Asanuma, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 702–705.
- [56] M. You, F. Huang, Z. Chen, R. W. Wang, W. Tan, *ACS Nano* **2012**, *6*, 7935–7941.
- [57] D. Han, J. Huang, Z. Zhu, Q. Yuan, M. You, Y. Chen, W. Tan, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4670–4672.
- [58] M. Zhou, X. Liang, T. Mochizuki, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2167–2170; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2213–2216.
- [59] Y. Liu, D. Sen, *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 887–892.
- [60] Y. Zou, J. Chen, Z. Zhu, L. Lu, Y. Huang, Y. Song, H. Zhang, H. Kang, C. J. Yang, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8716–8718.
- [61] S. Keiper, J. S. Vyle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3306–3309; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3384–3387.
- [62] B. Y. Won, C. Jung, K. S. Park, H. G. Park, *Electrochem. Commun.* **2013**, *27*, 100–103.
- [63] Y. Yang, G. Liu, H. Liu, D. Li, C. Fan, D. Liu, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 1393–1397.
- [64] M. Frasconi, R. Tel-Vered, J. Elbaz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2029–2036.
- [65] a) J. Liu, *Soft Matter* **2011**, *7*, 6757–6767; b) X. Xiong, C. Wu, C. Zhou, G. Zhu, Z. Chen, W. Tan, *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, *34*, 1271–1283.
- [66] a) S. Nagahara, T. Matsuda, *Polym. Gels Networks* **1996**, *4*, 111–127; b) Y. Murakami, M. Maeda, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2927–2929; c) S. H. Um, J. B. Lee, N. Park, S. Y. Kwon, C. C. Umbach, D. Luo, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 797–801.
- [67] W. Guo, X. J. Qi, R. Orbach, C. H. Lu, L. Freage, I. Mironi-Harpaz, D. Seliktar, H. H. Yang, I. Willner, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4065–4068.
- [68] E. Cheng, Y. Xing, P. Chen, Y. Yang, Y. Sun, D. Zhou, L. Xu, Q. Fan, D. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7660–7663; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7796–7799.
- [69] H. Kang, H. Liu, X. Zhang, J. Yan, Z. Zhu, L. Peng, H. Yang, Y. Kim, W. Tan, *Langmuir* **2011**, *27*, 399–408.
- [70] C. H. Lu, X. J. Qi, R. Orbach, H.-H. Yang, I. Mironi-Harpaz, D. Seliktar, I. Willner, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 1298–1302.

- [71] N. Dave, M. Y. Chan, P. J. Huang, B. D. Smith, J. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12668–12673.
- [72] a) C. Coll, A. Bernardos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 339–349; b) M. W. Ambrogio, C. R. Thomas, Y. L. Zhao, J. I. Zink, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 903–913; c) B. G. Trewyn, I. I. Slowing, S. Giri, H. T. Chen, V. S. Y. Lin, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 846–853.
- [73] a) V. Valtchev, L. Tosheva, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6734–6760; b) P. Yang, S. Gai, J. Lin, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3679–3698; c) J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, *Small* **2010**, *6*, 1952–1967; d) M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7548–7558; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7692–7703.
- [74] a) N. Liu, D. R. Dunphy, P. Atanassov, S. D. Bunge, Z. Chen, G. P. Lopez, T. J. Boyle, C. J. Brinker, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 551–554; b) D. He, X. He, K. Wang, J. Cao, Y. Zhao, *Langmuir* **2012**, *28*, 4003–4008; c) Y. Wen, L. Xu, W. Wang, D. Wang, H. Du, X. Zhang, *Nanoscale* **2012**, *4*, 4473–4476.
- [75] a) E. Aznar, R. Casasús, B. García-Acosta, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 2228–2231; b) Z. Zhang, D. Balogh, F. Wang, R. Tel-Vered, N. Levy, S. Y. Sung, R. Nechushtai, I. Willner, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 3159–3166.
- [76] a) R. Liu, X. Zhao, T. Wu, P. Feng, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14418–14419; b) Z. Luo, K. Cai, Y. Hu, L. Zhao, P. Liu, L. Duan, W. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 640–643; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 666–669; c) X. Wan, D. Wang, S. Liu, *Langmuir* **2010**, *26*, 15574–15579.
- [77] a) A. Yu, Y. Wang, E. Barlow, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1737–1741; b) C. Park, H. Kim, S. Kim, C. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16614–16615; c) C. Lei, Y. Shin, J. Liu, E. J. Ackerman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11242–11243; d) H. Takahashi, B. Li, T. Sasaki, C. Miyazaki, T. Kajino, S. Inagaki, *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 3301–3305.
- [78] a) Q. Yang, S. Wang, P. Fan, L. Wang, Y. Di, K. Lin, F. S. Xiao, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 5999–6003; b) Q. Gao, Y. Xu, D. Wu, W. Shen, F. Deng, *Langmuir* **2010**, *26*, 17133–17138; c) H. Zheng, Y. Wang, S. Che, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 16803–16813.
- [79] a) X. Yang, X. Liu, Z. Liu, F. Pu, J. Ren, X. Qu, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 2890–2895; b) N. Niu, F. He, P. Ma, S. Gai, G. Yang, F. Qu, Y. Wang, J. Xu, P. Yang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 3250–3262; c) Q. Xiao, X. Zheng, W. Bu, W. Ge, S. Zhang, F. Chen, H. Xing, Q. Ren, W. Fan, K. Zhao, Y. Hua, J. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13041–13048; d) J. Peng, L. Zhao, X. Zhu, Y. Sun, W. Feng, Y. Gao, L. Wang, F. Li, *Biomaterials* **2013**, *34*, 7905–7912; e) Y. Chen, H. Chen, J. Shi, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 3144–3176.
- [80] Q. Yuan, Y. Zhang, T. Chen, D. Lu, Z. Zhao, X. Zhang, Z. Li, C. H. Yan, W. Tan, *ACS Nano* **2012**, *6*, 6337–6344.
- [81] C. Chen, F. Pu, Z. Huang, Z. Liu, J. Ren, X. Qu, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1638–1644.
- [82] D. He, X. He, K. Wang, J. Cao, Y. Zhao, *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 4704–4710.
- [83] H. Liu, Y. Xu, F. Li, Y. Yang, W. Wang, Y. Song, D. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2515–2517; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2567–2569.
- [84] a) Y. Tian, Z. Zhang, L. Wen, J. Ma, Y. Zhang, W. Liu, J. Zhai, L. Jiang, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10679–10681; b) F. Xia, W. Guo, Y. Mao, X. Hou, J. Xue, H. Xia, L. Wang, Y. Song, H. Ji, Q. Ouyang, Y. Wang, L. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8345–8350; c) X. Hou, W. Guo, F. Xia, F.-Q. Nie, H. Dong, Y. Tian, L. Wen, L. Wang, L. Cao, Y. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7800–7805.
- [85] F. Wang, C. H. Lu, I. Willner, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2881–2941.
- [86] M. You, R. W. Wang, X. Zhang, Y. Chen, K. Wang, L. Peng, W. Tan, *ACS Nano* **2011**, *5*, 10090–10095.
- [87] a) G. H. Clever, M. Shionoya, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2391–2402; b) F. Wojciechowski, C. J. Leumann, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5669–5679; c) G. H. Clever, C. Kaul, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6226–6236; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6340–6350; d) A. Ono, H. Torigoe, Y. Tanaka, I. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5855–5866; e) Y. Takezawa, M. Shionoya, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2066–2076.
- [88] a) J. Elbaz, R. Tel-Vered, R. Freeman, H. B. Yildiz, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 133–137; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 139–143; b) J. Elbaz, M. Moshe, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3834–3837; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3892–3895; c) G. Pelossof, R. Tel-Vered, X. Liu, I. Willner, *Nanoscale* **2013**, *5*, 8977–8981.
- [89] a) X. Liu, A. Niazov-Elkan, F. Wang, I. Willner, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 219–225; b) X. Liu, R. Freeman, E. Golub, I. Willner, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7648–7655; c) R. Freeman, X. Liu, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11597–11604; d) A. Niazov, R. Freeman, J. Girsh, I. Willner, *Sensors* **2011**, *11*, 10388–10397; e) R. Freeman, J. Girsh, A. F. Jou, J. A. A. Ho, T. Hug, J. Dernedde, I. Willner, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6192–6198.
- [90] a) O. A. Raitman, E. Katz, A. F. Bückmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6487–6496; b) O. A. Raitman, F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *Chem. Commun.* **2002**, 1936–1937; c) V. Chegel, O. Raitman, E. Katz, R. Gabai, I. Willner, *Chem. Commun.* **2001**, 883–884; d) O. A. Raitman, E. Katz, I. Willner, V. I. Chegel, G. V. Popova, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3649–3652; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3761–3764.
- [91] a) M. Endo, H. Sugiyama, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1645–1653; b) A. Rajendran, M. Endo, H. Sugiyama, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1493–1520.
- [92] J. Elbaz, A. Cecconello, Z. Fan, A. O. Govorov, I. Willner, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2000.
- [93] a) A. Cecconello, C. H. Lu, J. Elbaz, I. Willner, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 6275–6280; b) S. Shimron, A. Cecconello, C. H. Lu, I. Willner, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 3791–3795.
- [94] G. P. Acuna, F. M. Möller, P. Holzmeister, S. Beater, B. Lalkens, P. Tinnefeld, *Science* **2012**, *338*, 506–510.
- [95] a) S. Surana, J. M. Bhat, S. P. Koushika, Y. Krishnan, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 340; b) S. Modi, M. G. Swetha, D. Goswami, G. D. Gupta, S. Mayor, Y. Krishnan, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 325–330.
- [96] a) S. Modi, C. Nizak, S. Surana, S. Halder, Y. Krishnan, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 459–467; b) K. A. Afonin, M. Viard, A. N. Martins, S. J. Lockett, A. E. Maciag, E. O. Freed, E. Heldman, L. Jaeger, R. Blumenthal, B. A. Shapiro, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 296–304.
- [97] a) Z. Zhang, D. Balogh, F. Wang, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1934–1940; b) Z. Zhang, D. Balogh, F. Wang, S. Y. Sung, R. Nechushtai, I. Willner, *ACS Nano* **2013**, *7*, 8455–8468; c) Y. Mao, C. Luo, W. Deng, G. Jin, X. Yu, Z. Zhang, Q. Ouyang, R. Chen, D. Yu, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e144; d) Y. Mao, D. Liu, S. Wang, S. Luo, W. Wang, Y. Yang, Q. Ouyang, L. Jiang, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e33.
- [98] a) A. P. R. Johnston, E. S. Read, F. Caruso, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 953–956; b) F. Cavalieri, S. L. Ng, C. Mazzuca, Z. Jia, V. Bulmus, T. P. Davis, F. Caruso, *Small* **2011**, *7*, 101–111; c) A. P. R. Johnston, L. Lee, Y. Wang, F. Caruso, *Small* **2009**, *5*, 1418–1421; d) A. P. R. Johnston, F. Caruso, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2677–2680; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2731–2734.