

---

# DNA-basierte molekulare Maschinen und Aktuatoren

Andreas Reuter

---



München 2007



---

# **DNA-basierte molekulare Maschinen und Aktuatoren**

**Andreas Reuter**

---

Dissertation  
an der Fakultät für Physik  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Andreas Reuter  
aus Karlsruhe

München, den 8.5.2007

Erstgutachter: PD Dr. habil Friedrich C. Simmel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Joachim O. Rädler

Tag der mündlichen Prüfung: 4.7.2007

Là dove la natura finisce di produrre le sue specie, l'uomo comincia, utilizzando le specie della natura, e in armonia con la natura stessa, a creare una infinità di specie.

Wo die Natur aufhört, neue Formen entstehen zu lassen, beginnt der Mensch, mit den natürlichen Dingen, mit Hilfe eben dieser Natur, eine unendliche Vielfalt der Formen zu erschaffen.

Leonardo da Vinci



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Die Natur als Vorbild . . . . .	3
1.2 Das Erbmolekül als Baustein künstlicher Geräte . . . . .	5
<b>2 Überblick über das Forschungsgebiet</b>	<b>9</b>
2.1 Stand der Forschung . . . . .	9
2.1.1 Bewegung durch Änderung der Umgebungsbedingungen . . . . .	10
2.1.2 DNA als Treibstoff . . . . .	10
2.1.3 Aptamere und Nukleozyme . . . . .	11
2.1.4 Nanopartikel-DNA-Konstrukte . . . . .	14
2.2 Motivation dieser Arbeit . . . . .	14
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1 Desoxyribonukleinsäuren . . . . .	17
3.1.1 Grundlegende Eigenschaften . . . . .	17
3.1.2 Nicht-Watson-Crick-Basenpaarung: Das G-Quartett . . . . .	20
3.1.3 Kreuzungspunktwanderung . . . . .	21
3.2 Untersuchte DNA-basierte Aktuatoren und Maschinen . . . . .	22
3.2.1 DNA-Tweezers . . . . .	22
3.2.2 Gold-Nanopartikel-DNA-Tweezers . . . . .	24
3.2.3 Gold-Nanopartikel-DNA-Stepper . . . . .	29
3.2.4 Schaltbares Thrombin-Aptamer . . . . .	31
3.3 Gelelektrophorese und Absorptionsspektroskopie an DNA . . . . .	34
3.3.1 Physikalische Grundlagen der Gelelektrophorese . . . . .	34
3.3.2 Durchgeführte Gelelektrophoresen . . . . .	36
3.3.3 Absorptionsspektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Bereich . . . . .	37
3.4 Optische Experimente an fluoreszenzmarkierter DNA . . . . .	38
3.4.1 Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-Messungen am optischen Tisch . . . . .	38
3.4.2 Fluoreszenzanisotropie-Messungen . . . . .	39
3.4.3 Hochauflösendes Fluoreszenzspektrometer . . . . .	42
3.5 Konfokale Fluoreszenzmessungen . . . . .	44
3.5.1 Fluoreszenzmessungen an einzelnen Molekülen bzw. Farbstoffpaaren . . . . .	44
3.5.2 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie . . . . .	48

<b>4</b>	<b>Theoretischer Hintergrund</b>	<b>53</b>
4.1	Reaktionskinetik bei DNA-Reaktionen . . . . .	53
4.1.1	Reaktionskinetik allgemein . . . . .	53
4.1.2	Kinetik von DNA-Hybridisierungsreaktionen . . . . .	55
4.1.3	Kinetik der Kreuzungspunktwanderung . . . . .	56
4.1.4	Kinetisches Modell für das Thrombin-Aptamer . . . . .	58
4.2	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer . . . . .	60
4.2.1	Fluoreszenz . . . . .	60
4.2.2	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer . . . . .	60
4.2.3	Einzelmolekül-FRET-Messungen . . . . .	64
4.3	Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie . . . . .	66
4.3.1	Fluoreszenzfluktuationen . . . . .	66
4.3.2	Autokorrelationsfunktion . . . . .	68
4.3.3	Triplet-Zustände . . . . .	71
<b>5</b>	<b>Experimente, Ergebnisse und Interpretation</b>	<b>75</b>
5.1	Einzelmolekülmessungen an den DNA-Tweezers . . . . .	75
5.1.1	Ensemblemessungen an den DNA-Tweezers . . . . .	75
5.1.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese der DNA-Tweezers . . . . .	76
5.1.3	FRET-Experimente an einzelnen Donor-Akzeptor-Paaren . . . . .	79
5.2	DNA-Nanopartikel-Konstrukte . . . . .	85
5.2.1	Gold-Nanopartikel-DNA-Tweezers . . . . .	85
5.2.2	Gold-Nanopartikel-DNA-Stepper . . . . .	88
5.3	Schaltbares DNA-Thrombin-Aptamer . . . . .	94
5.3.1	Gelnachweis . . . . .	94
5.3.2	UV-Absorptionsspektroskopie-Schmelzkurven . . . . .	95
5.3.3	Fluoreszenzmessungen an der Aptamermaschine . . . . .	96
5.3.4	Kinetik der Proteinfreigabe durch die Aptamermaschine . . . . .	100
<b>6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>111</b>
6.1	Einzelmolekülfluoreszenzmessungen an „DNA-Devices“ . . . . .	111
6.2	Metallnanopartikel-DNA-Maschinen . . . . .	111
6.3	Schaltbare DNA-Aptamere . . . . .	112
6.4	Medizinische und pharmazeutische Anwendungen . . . . .	113
6.5	Werkzeugkasten für Systembiologen . . . . .	114
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>115</b>
A.1	Moleküldarstellungen . . . . .	115
A.2	IGOR-Fitfunktion für FCS-Daten . . . . .	115
A.3	IGOR Macro zur Auswertung von Zeiss ConfoCor 2 RAW-Data . . . . .	116
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>120</b>

# Zusammenfassung

In dem jungen Gebiet der Nanobiotechnologie hat sich Desoxyribonukleinsäure (DNA) bereits als ein Baustein mit vielseitigen Eigenschaften etabliert. In der vorliegenden Arbeit werden aus künstlich synthetisierten kurzen DNA-Strängen selbstorganisierte und steuerbare Nanoaktuatoren sowie eine funktionelle „Nanomaschine“ entworfen und charakterisiert. Die zum Aufbau und der Untersuchung der DNA-Nanogeräte verwendeten Methoden kommen aus der Physik und aus der Biochemie.

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit sind:

- Die Charakterisierung der DNA-Tweezers in der offenen und geschlossenen Konfiguration mittels Einzelmolekülfluoreszenzmessungen. Hierbei wurde die Verteilung der Transfereffizienzen für beide Zustände bestimmt und der Einfluss der Salzkonzentration beim offenen Zustand. Daraus konnten die Verteilungen für die Werte der Abstände zwischen den Farbstoffen (und damit zwischen den beiden Armen des Tweezers) ermittelt werden. Im geschlossenen Zustand wurden drei Subpopulationen entdeckt.
- Gold-Nanopartikel unterschiedlicher Größe wurden erfolgreich in schaltbaren DNA-Aktuatoren implementiert. Hierbei wurde die Fluoreszenzemission von Farbstoffen gemessen, deren Abstand zu einem Gold-Nanopartikel über einen DNA-Aktuator variiert wurde. Die durchgeführten Ensemblemessungen zeigen, dass Gold-Nanopartikel erfolgreich als Quencher für Fluoreszenzfarbstoffe in DNA-Nanoaktuatoren eingesetzt werden können, um Abstandsänderungen  $\geq 10$  nm zu verfolgen.
- In früheren Arbeiten entwickelte Konzepte zur Arbeitsweise nanomechanischer DNA-Maschinen konnten für die Konstruktion des ersten schaltbaren Aptamers eingesetzt werden. Schaltbare Aptamere sind in der Lage ein Protein oder sonstiges Molekül reversibel zu binden und wieder freizugeben. Im vorliegenden Fall wurde eine molekulare Maschine konstruiert, die auf einem DNA-Aptamer basierend das Protein  $\alpha$ -Thrombin wiederholt binden und freigeben kann. Tatsächlich kann man sich diese Aptamermaschine als einen spezifischen „molekularen Greifer“ vorstellen. Die Operationsweise dieses schaltbaren Aptamers wurde mit Fluoreszenzresonanz-Energietransfer- und Fluoreszenzanisotropiemessungen überprüft und charakterisiert. Um die Kinetik der Freigabe von Thrombin detailliert zu untersuchen, wurde die Bindungskonstante unserer Aptamermaschine mit einer Fluoreszenzkorrelationspektroskopie-Titration bestimmt und ein Modell der einzelnen Reaktionsschritte aufgestellt. Das System der Rategleichungen wurde numerisch simuliert und an die experimentell ermittelten Kurven angepasst.

Die Kombination des Operationssprinzips von DNA-basierten nanomechanischen Strukturen mit den Bindungseigenschaften von DNA-Aptameren erweitert bedeutend den Spielraum für die Konstruktion weiterer funktionaler DNA-Nanostrukturen. Es ist davon auszugehen, dass in Zukunft Einzelmolekülmessungen verstärkt bei der Entwicklung von DNA-Nanomaschinen und -aktuatoren eingesetzt werden, um Einblick in die tatsächlich vorliegenden Strukturen der DNA-Konstrukte zu gewinnen.

# Summary

In the emerging field of nanobiotechnology, deoxyribonucleic acid (DNA) has already established as a key building block with versatile properties. In the present thesis, self-organising and controllable nanoactuators and a functional “nanomachine”, consisting of artificially synthesised short DNA strands, have been designed and characterised. The techniques employed for the construction and analysis of the DNA nanodevices are from the field of physics and biochemistry.

The essential results of this work are:

- Characterisation of the DNA tweezers in their open and closed configuration by the means of single-molecule fluorescence measurements. Hence the distribution of the transfer efficiency could be determined for both states and the influence of salt concentration on the distribution in the open state. Based on these results, the distributions of the distances between the dye molecules (and therefore the distances between both arms of the tweezers) could be calculated. For the closed state three subpopulations have been found.
- The successful integration of gold nanoparticles into switchable DNA actuators. Here, the fluorescence emission of dyes was measured whose distance to a gold nanoparticle was varied by the DNA actuator. The bulk experiments showed that gold nanoparticles can be effectually used as quenchers for the fluorescent dyes in DNA nanoactuators to monitor distance changes  $\geq 10$  nm.
- The existing concepts for the operation of nanomechanical DNA machines could be employed for the construction of the first switchable aptamer. Switchable aptamers fulfil the function of binding and releasing a protein or other molecules reversibly in a controlled way. In the present project, a molecular machine based on a DNA aptamer was constructed that can cyclically bind to the human protein  $\alpha$ -thrombin and release it upon addition of fuel strands. In fact, one can imagine the developed aptamer machine as a specific “molecular claw”. The mode of operation of this switchable aptamer was verified and characterised by fluorescence resonance energy transfer and fluorescence anisotropy measurements. To study the kinetics of the release of thrombin in detail the binding constant of the aptamer machine has been determined using fluorescence correlation spectroscopy measurements. A model of the single reaction steps has been put up, simulated numerically and fitted to the experimentally obtained curves.

The combination of the operation principle of DNA based nanomechanical devices with the binding properties of DNA aptamers greatly expands the scope for the design and construction of further functional DNA nanodevices. It is assumed that in the near future single-molecule measurements will be increasingly employed within the development of DNA nanomachines and actuators to gain insight in the actually existing structures of these devices.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Natur als Vorbild

In der Natur gibt es eine Vielzahl von komplexen molekularen Maschinen, die viele essentielle Aufgaben erfüllen. Proteine sind die wichtigsten Vertreter der biomolekularen Maschinen und erfüllen unter anderem folgende Funktionen [1, Kapitel 1]: Strukturproteine wie Kollagen oder Tubulin gewährleisten die mechanische Stabilität von Gewebe und Zellen, Enzyme dienen als Katalysator für das Aufbrechen oder die Bildung von kovalenten Bindungen, Lagerproteine bieten einen Vorrat an kleinen Molekülen oder Ionen (z.B. wird Eisen in der Leber in dem kleinen Protein Ferritin gelagert), Rezeptorproteine detektieren spezifische Signale und übermitteln diese zur Weiterverarbeitung, Ionenpumpen binden Ionen und transportieren sie gegen chemische Gradienten, Motorproteine erzeugen Bewegung in Zellen und Gewebe, genregulierende Proteine wie der lac-Repressor binden an DNA, um Gene wie in diesem Fall aus- oder auch anzuschalten.

### Beispiele biomolekularer Maschinen

Das Protein Adenosintriphosphat-Synthase (ATP-Synthase) besteht aus zwei Teilen: einem Teil, der in die Membran eingebaut ist und Protonen über die Membran befördert, und einem Kopfteil, der aus drei Sorten von Untereinheiten besteht, von denen eine rotiert, wenn die Synthase aktiv ist (siehe Abbildung 1.1). Dieses Protein faltet sich spontan und selbständig in seine arbeitsfähige Struktur ausgehend von der langen Peptidkette, die in den Ribosomen aufgebaut wurde. Dieser komplexe Mechanismus ist ein Beispiel der natürlichen Selbstorganisation von Biopolymeren. Bis heute ist es nicht möglich, für eine bekannte Aminosäuresequenz die gefaltete Struktur des Proteins korrekt vorherzusagen. Die ATP-Synthase selbst kann nun entweder durch Ausnutzung des Protonengradienten Adenosintriphosphat synthetisieren oder durch Spaltung von ATP Protonen gegen den Gradienten pumpen [1, Kapitel 13].

Zwei andere biomolekulare Maschinen sind neben anderen Motorproteinen verantwortlich für den Transport in Zellen: Dynein und Kinesin. Diese Proteine benutzen die Mikrotubuli (ein aus dem Protein  $\alpha$ -Tubulin aufgebauter Bestandteil des Zellskeletts) als Transportwege, entlang derer sie Lasten wie Organellen oder Vesikel durch die Zelle verschieben. Die Motoren gewinnen Energie durch die Spaltung von ATP und bewegen sich jeweils nur in eine Richtung entlang der Mikrotubuli, die vom Zellkern radial nach außen zur Zellmembran verlaufen. Kinesine bewegen sich vom Zellkern nach außen, Dyneine in der entgegengesetzten Richtung [1, Kapitel 16].

Das Ribosom ist die biomolekulare Maschine der Translation. Nachdem die Erbinformation bei der Transkription von der Desoxyribonukleinsäure (DNA vom Englischen „deoxyribonucleic

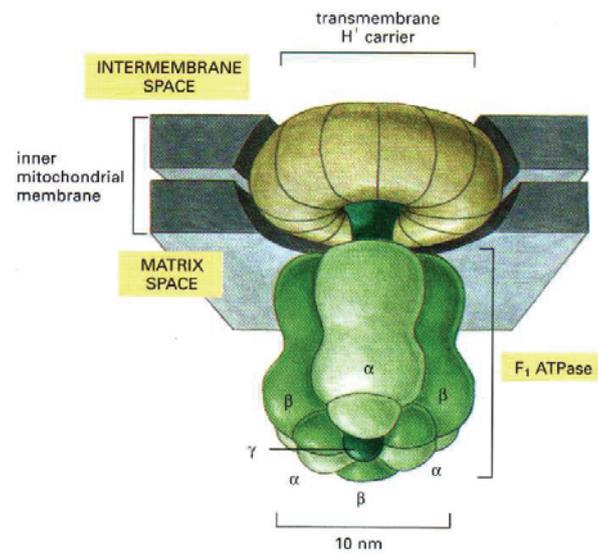


Abbildung 1.1: Schematisches Diagramm der biomolekularen Maschine ATP-Synthase. Diese besteht aus einem Kopfteil (F<sub>1</sub>-ATPase) und einem „Transmembran-Protonen-Transporter“, die beide aus mehreren Untereinheiten bestehen. Die  $\gamma$ -Untereinheit des Kopfteils rotiert gegen oder mit dem Uhrzeigersinn, bei der ATP-Synthese bzw. -Hydrolyse. Bei der ATP-Hydrolyse werden Protonen gegen den H<sup>+</sup>-Gradienten durch die innere mitochondriale Membran gepumpt. Aus [1].

acid“) auf die messenger-Ribonukleinsäure (mRNA, von „ribonucleic acid“) übertragen wurde, erstellt das Ribosom aus diesem Code die spezifischen Proteine für die vielfältigen Lebensaufgaben der Zelle und des Organismus. Dazu verfügt das Ribosom über mehrere RNA-Bindungsstellen [1, Kapitel 7]. Vergleichbar einer Produktion am Fließband einer Fabrik wird nun eine Polypeptidkette entsprechend der vorliegenden mRNA (Konstruktionsplan) gebaut.

Biomolekulare Maschinen sind im Hinblick auf ihre Funktionen gut mit Maschinen vergleichbar, die von Menschen entworfen und konstruiert wurden und werden. Ihre Wirkungsweise ist dagegen häufig eine andere: sie nutzen u. a. Brownsche Bewegung, es wirken andere Kräfte und Trägheit spielt keine Rolle. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen beiden Sorten von Maschinen besteht allerdings darin, dass die von Menschen entworfenen technischen Maschinen in der Regel von Anfang an bewusst zur Erfüllung einer bestimmten Aufgabe hin konstruiert werden, wohingegen die biomolekularen Maschinen das Ergebnis der chemischen und biologischen Evolution durch natürliche Selektion sind. Sie haben eine Milliarden Jahre dauernde Entwicklung hinter sich, was für unsere technischen Maschinen kein akzeptabler Entwicklungszeitraum ist.

## Nanobiotechnologie

Die Vorbilder in der Natur mit phantastischen Eigenschaften lassen Forscher davon träumen, ähnlich kleine und funktionale Nanomaschinen entwerfen und umsetzen zu können. Die rasanten Entwicklungen auf den Gebieten der Molekularbiologie, der Biochemie, der supramolekularen und Polymerchemie sowie die enorme Erweiterung an physikalischen Messmethoden, nanotechnologischen Herstellungsverfahren lassen diesen Traum in letzter Zeit Stück für Stück realistischer erscheinen. Das Forschungsgebiet, das sich mit den Grundlagen und zukünftigen Anwendungen dieser biologisch inspirierten Nanotechnologie befasst und zu diesem Zweck biologische Moleküle als Baumaterial einsetzt, ist durch ein hohes Maß an Interdisziplinarität geprägt und wird als Nanobiotechnologie bezeichnet [2].

## 1.2 Das Erbmolekül als Baustein künstlicher Geräte

Die beiden bislang aussichtsreichsten biologischen Baumaterialien für die Nanotechnologie sind die Proteine und die Nukleinsäuren. Proteine besitzen viele erstrebenswerte Eigenschaften aufgrund ihrer natürlichen Aufgaben, stellen aber auch wesentlich höhere Anforderungen an ihre Umgebung, damit ihre komplexen Funktionen gewährleistet sind. Die Ribonukleinsäure (RNA) fand gerade in den letzten Jahren sehr starkes Interesse aufgrund der genetischen „Interferenz“ durch doppelsträngige RNA (RNAi, siehe [3, 4]). RNA erweist sich aber im Vergleich zur DNA als weniger stabil: Wegen der zusätzlichen OH-Gruppen an den Zuckereinheiten ist RNA sehr viel hydrolyseempfindlicher. RNA wird daher wesentlich häufiger durch Ribonukleasen abgebaut. DNA ist etwas stabiler, es gibt aber auch Desoxyribonukleasen. Zudem bildet einsträngige RNA eine Vielzahl von Sekundärstrukturen, was bei DNA ebenfalls nicht so häufig vorkommt, da diese in der Natur doppelsträngig ist. In dieser Arbeit wird DNA als Baumaterial für künstliche Nanoaktuatoren und -maschinen eingesetzt.

## Argumente für DNA in der Nanotechnologie

Die Struktur der DNA wurde 1953 von Watson und Crick aufgeklärt: Die beiden Einzelstränge bilden eine Doppelhelix [5]. Sie ist Träger der genetischen Information bei allen Lebewesen. Die DNA erfüllt diese Funktion aufgrund der komplementären Natur der Basenpaarung: Adenin (A) paart sich spezifisch mit Thymin (T) und Guanin (G) paart sich spezifisch mit Cytosin (C). Die biologische Konsequenz dieser Komplementarität ist, dass die zelluläre Maschinerie die Information, die in jedem Strang enthalten ist, so vervielfältigen kann, dass ein informationstragender Strang erhalten bleibt und die Tochterzellen dasselbe genetische Komplement erhalten.

Seit etwa 30 Jahren wird in der Gentechnik das Paaren von kurzen intermolekularen Überhängen, den sogenannten „sticky ends“ (auf deutsch: klebrige Enden), verwendet, um DNA Fragmente gezielt miteinander zu verbinden. Diese intermolekulare Wechselwirkung ist in der Chemie einzigartig, denn sie ist programmierbar, indem die Basensequenzen der sticky ends variiert wird. Für ein  $n$  Basen langes sticky end erhalten wir  $4^n$  Basensequenzen. Aufgrund dieser einzigartigen Erkennungsmöglichkeiten, der bereits erwähnten physikochemischen Stabilität, der für ein Biomolekül hohen mechanischen Steifigkeit und ihrer Größe ist DNA ein vielversprechendes Baumaterial für die Nanotechnologie.

Ein weiterer Vorteil beim Einsatz von DNA ist die automatisierte Synthese. In der Praxis bedeutet das, dass man heute per e-Mail die DNA-Sequenz an eine kommerzielle Firma schickt und einem wenige Tage später das entsprechende Oligonukleotid geliefert wird, welches von der Firma in Standardverfahren synthetisiert wurde. Beim „Basteln mit DNA“ kann man auf den großen biochemischen Werkzeugkasten zurückgreifen: Polymerasekettenreaktion (engl. „polymerase chain reaction“, PCR) zur Vervielfältigung von DNA, Gelelektrophorese, usw. Aus der Biochemie kennt man auch die DNA-modifizierenden Enzyme wie z. B. Nukleasen, Ligasen oder Polymerasen, welche DNA an definierten Stellen schneiden, verbinden oder kopieren können und somit wesentliche Funktionen zum Einsatz der DNA in der Nanobiotechnologie bieten. Wie bei allen Biomolekülen bietet DNA schließlich den Vorteil, dass die aus ihr gebauten Konstrukte grundsätzlich biokompatibel sind.

## DNA-Nanostrukturen und DNA-Nanomaschinen

Vor etwa 25 Jahren hatte Nadrian Seeman (heute New York University) die Idee, aus DNA Nanostrukturen aufzubauen (siehe [6]). Bereits wenig später gelang es in seinem Labor, immobilisierte DNA-Kreuzungen aus Oligonukleotiden herzustellen [7]. Diese DNA-Kreuzungen zwischen vier Doppelhelixbereichen kommen in der Natur in Form der sogenannten Holliday-Junction vor. Das Problem dieser einfachen Verzweigungen ist ihre mangelnde mechanische Stabilität. In den Neunzigern gelang die Architektur interessanter Gebilde wie eines dreidimensionalen Würfels [8] und eines abgestumpften Oktaeders [9]. Weiterentwickelt wurde diese Struktur von Shih et al., die aus einem langen Einzelstrang ein Oktaeder konstruiert haben [10], und Goodman et al., die aus vier Oligonukleotiden einen Tetraeder entworfen haben, der sich bei gleichzeitiger Addition aller Einzelstränge in kurzer Zeit selbst zusammenbaut [11]. Eine andere wichtige Entwicklung ist die von DNA-Gittern und DNA-Kristallen. Ein wesentlicher Fortschritt war hier die Entwicklung von sogenannten double- und triple Crossover (DX bzw. TX) Strukturen [12, 13]. Diese neuen DNA-Verzweigungen sind wesentlich stabiler als einfache Helix-Kreuzungen. Winfree et al. entwickelten auf der Basis von DX-Strukturen ein Konzept für selbstorganisierende zweidimensionale DNA-Kristalle, die aus

zwei oder vier Grundmotiven aufgebaut sind [14].

Auf die DNA-Nanostrukturen wird im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen. Sie wurden u.a. von Stefan Beyer im Rahmen seiner Dissertation erforscht [15]. Aktuelle Reviews zu diesem Forschungsgebiet finden sich z. B. in [16, 17].

In dem jungen Gebiet der Nanobiotechnologie hat sich DNA bereits als ein wesentlicher Baustein mit vielversprechenden Eigenschaften etabliert. Diese Arbeit wird davon Gebrauch machen. Im folgenden Kapitel wird der vorherige Stand der Forschung auf dem Gebiet der DNA-Nanomaschinen beleuchtet. Anschließend wird das verwendete Material und die eingesetzten Methoden besprochen. Der theoretische Hintergrund wird in Kapitel 4 erläutert, bevor wir zu den experimentellen Ergebnissen und deren Interpretation kommen. Abgerundet wird die Arbeit durch einen kurzen Ausblick.



# 2 Überblick über das Forschungsgebiet

## 2.1 Stand der Forschung

Wie in der Einleitung dargestellt wurde, spielen biomolekulare Maschinen in der Natur eine entscheidende Rolle. Diese inspirieren Forscher zum Entwerfen und Realisieren künstlicher Nanomaschinen. In diesem Kapitel wird ein Überblick über den Stand der Forschung auf diesem Gebiet der DNA-basierten Nanoaktuatoren und „-maschinen“ zu Beginn dieser Arbeit (Sommer 2003) gegeben. Anschließend werden die Projekte und Ergebnisse dieser Arbeit in diesen Kontext eingeordnet.

### **Begriffsdefinitionen**

Der Begriff Aktuator kommt von dem englischen Begriff actuator, der nach Merriam-Webster eine mechanische Vorrichtung bezeichnet, die etwas bewegt oder kontrolliert. Der Begriff Maschine ist nicht einheitlich definiert. Nach der europäischen Maschinenrichtlinie ist eine Maschine „die Gesamtheit von miteinander verbundenen Teilen oder Vorrichtungen, von denen mindestens eines beweglich ist (...), die für eine bestimmte Anwendung wie die Verarbeitung, Fortbewegung (...) eines Werkstoffs zusammengefügt sind“ [18]. Nach dieser engen Definition existieren wohl bislang und bis in absehbare Zeit keine Nanomaschinen. Im Lexikon der ZEIT findet sich dagegen folgende simple Definition: Eine Maschine ist jede Vorrichtung zur Erzeugung oder Übertragung von Kräften, die technisch nutzbare Arbeit leistet oder eine Form der Energie in eine andere umsetzt [19]. Diese Definition trifft auf einige DNA-basierte Nanomaschinen zu, denn sie setzen chemische Energie in mechanische Bewegung um. Im Englischen kann man die Diskussion um den Begriff der Maschine umgehen, indem man den Begriff device verwendet. Dieser lässt sich nicht so leicht ins Deutsche übersetzen, er bedeutet in diesem Kontext Gerät oder Vorrichtung.

Im Folgenden wird eine Auswahl an interessanten DNA-Konstrukten präsentiert. Der grundsätzliche Ansatz der meisten DNA-Aktuatoren und -Maschinen besteht darin, dass sie zwischen verschiedenen Konformationen „geschaltet“ werden können. Die Kontrolle erfolgt über eine Änderung der Umgebungsbedingungen der DNA-Konstrukte oder durch Zugabe von „Treibstoff“-DNA-Strängen. DNA-Aptamere und -Ribozyme bieten interessante Funktionen und können gezielt evolviert werden. Schließlich werden Arbeiten zu DNA-Nanopartikel-Hybridkonstrukten präsentiert.

Einen Überblick über den Stand der Forschung auf diesem Gebiet, der in etwa dem Stand vom

Sommer 2003 entspricht, findet sich auch in [20]. Eine Übersicht über den aktuellen Stand der Forschung an DNA-basierten Aktuatoren und Maschinen findet sich in [21, 22, 23, 24].

### 2.1.1 Bewegung durch Änderung der Umgebungsbedingungen

1999 wurde von Mao et al. [25] eine DNA-Nanostruktur vorgestellt, die durch Ändern des Puffers eine Rotation ausführt. Der Rotationsbewegung liegt ein Übergang der rechtshändigen B-Form der DNA Doppelhelix in die linkshändige Z-Form zugrunde. Überprüft wurde die Rotation durch das Anbringen von Fluoreszenzfarbstoffen und FRET-Messungen (siehe Kapitel 4.2).

Sen und Gilbert berichteten 1990, dass die Bildung von Guanin-Quartett-Strukturen (siehe Kapitel 3.1.2) wesentlich von der Konzentration von Natrium und Kalium (oder anderer Alkalisalze) abhängt [26]. Mittels Gelelektrophoreseexperimenten zeigten sie, dass bei einer Gesamtkationenkonzentration von  $[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 1 \text{ M}$  im Puffer die Quartettbildung beim Erhöhen des  $\text{K}^+$ -Anteils von 0 M bis auf 100 mM kontinuierlich zunimmt. Bei höheren  $\text{K}^+$ -Konzentrationen wird die Quartettbildung blockiert. In diesem Zusammenhang sprechen die Autoren von einem Natrium-Kalium-Schalter für die G-Quartett-Bildung. Mergny et al. untersuchten das Schmelzverhalten von G-Quartett-Strukturen mittels UV-Absorption [27]. In Abhängigkeit von der Sequenz und den im Puffer enthaltenen Kationen fanden sie Schmelztemperaturen im Bereich von 20 – 84°C. Entsprechend stellt die Temperatur ebenfalls einen entscheidenden äußeren Einfluss auf die Struktur von DNA-Konstrukten dar.

Eine weitere DNA Struktur, die auf nicht-Watson-Crick-Basenpaarung beruht und deren Bildung von der Konzentration bestimmter Ionen abhängt, wurde 1993 von Gehring et al. beschrieben [28]: das sogenannte i-Motiv. Es handelt sich dabei um eine viersträngige DNA-Struktur, die sich durch nicht-Watson-Crick-Basenpaarung zwischen protonierten und unprotonierten Cytosin-Basen ( $\text{C} \cdot \text{C}^+$ ) bildet. Die Protonierung von Cytosin tritt nur bei niedrigen pH-Werten auf. Bei höheren pH-Werten sind dagegen die Cytosine unprotoniert und die viersträngige Struktur wird instabil. Ahmed et al. untersuchten einen Einzelstrang, in dessen Sequenz sich die i-Motiv-bildende Sequenz viermal wiederholt [29]. Sie fanden heraus, dass auch dieser Einzelstrang bei niedrigen pH-Werten in eine intramolekulare monomere i-Motiv-Struktur faltet.

### 2.1.2 DNA als Treibstoff

Die im Jahr 2000 von Yurke, Turberfield und Mitarbeitern entwickelten „DNA Tweezers“ stellen die erste DNA-Maschine dar, bei der DNA nicht nur als Baumaterial, sondern auch als „Treibstoff“ dient [30]. Die Tweezers bestehen aus drei DNA-Einzelsträngen und haben die Form einer Pinzette (siehe Abb. 3.6). Diese kann durch Zugabe von zusätzlichen „Treibstoff“-DNA-Strängen geschlossen und geöffnet werden. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei das Ausnutzen der „Kreuzungspunktwanderung“ (siehe Kapitel 3.1.3 und 4.1.3) zum Austausch eines Einzelstranges durch einen anderen. Jeder Zyklus produziert eine Duplex-DNA als Abfallprodukt. Diese DNA-Tweezers werden im Rahmen dieser Arbeit in Einzelmolekülfluoreszenzexperimenten untersucht (siehe Kapitel 5.1.3).

In der Folge wurde auf diesem Prinzip basierend von Simmel et al. ein ringförmiger Nanoaktuator [31] und ein DNA-Konstrukt entwickelt, das zwischen drei unterschiedlichen mechanischen Zuständen schaltbar ist [32]. Yan et al. konstruierten einen DNA-Aktuator, der zwischen zwei Zuständen durch eine Drehung wechselt, wenn entsprechende Treibstoffstränge

zugegeben werden. Durch die Rotation wird eine Winkeländerung von  $180^\circ$  zwischen den beiden Strangenden erreicht [33]. Zwei Gruppen entwickelten unabhängig voneinander ein DNA-Konstrukt, welches auf einer G-Quartett-Struktur basiert, die durch Zugabe von Treibstoffsträngen in eine DNA-Duplex-Form und anschließend wieder in die G-Quadruplex-Form umgeschaltet werden kann [34, 35]. Turberfield et al. entwickelten schließlich ein Konzept zur „Hybridisierungskatalyse“, um frei laufende Nanomaschinen ohne externes Zugeben von Treibstoff-DNA zu bestimmten Zeiten antreiben zu können [36].

### 2.1.3 Aptamere und Nukleozyme

Im Gegensatz zu den bereits aufgezählten DNA-Konstrukten, die aufgrund von Änderungen ihrer Konfiguration Bewegungen ausführen können, handelt es sich bei Aptameren und Ribozymen um Nukleinsäuren, die eine bestimmte Funktion ausüben. Aptamere sind kurze einsträngige DNA- oder RNA-Sequenzen, welche aufgrund einer von ihnen angenommenen Sekundär- und Tertiärstruktur an bestimmte Liganden wie z.B. Ionen, kleine Moleküle oder Makromoleküle (z.B. Proteine) binden. Nukleozyme sind DNA- oder RNA-Sequenzen, die wie ein Enzym eine katalytische Wirkung auf eine bestimmte Reaktion haben („Nukleinsäure-Enzyme“). Nukleozyme aus DNA werden als Desoxyribozyme (auch DNAzyme) bezeichnet, der Begriff Ribozym wird für ein Nukleozym aus RNA verwendet.

Die natürliche Evolution mit ihren Schritten der Mutation, Vermehrung und Auslese bietet geradezu ein Programm für die künstliche Entwicklung dieser funktionalen Nukleinsäuren.

#### Herstellung von Aptameren und Ribozymen

In diesem Abschnitt wird eine wichtige Methode zur in-vitro Selektion erläutert: SELEX (englisch: systematic evolution of ligands by exponential enrichment, auf deutsch etwa: systematische Entwicklung von Liganden durch exponentielle Verstärkung). Diese Technik wurde 1990 von drei Gruppen unabhängig voneinander entwickelt [37, 38, 39]. Bei dieser Methode wird zunächst in einem DNA-Oligonukleotid-Synthesizer eine Bibliothek von  $10^{15}$  unterschiedlichen Nukleinsäuresequenzen durch chemische Synthese erzeugt. Die Sequenzen sind so aufgebaut, dass sie an den Enden spezifische Primersequenzen haben, dazwischen jedoch völlig zufällige Sequenzen besitzen. Die extrem hohe Anzahl an unterschiedlichen Sequenzen rechtfertigt die Annahme, dass auch eine Sequenz mit der gewünschten Eigenschaft (z. B. Bindung eines Liganden oder mit einer Tertiärstruktur, die eine bestimmte katalytische Aktivität zeigt) in der Bibliothek enthalten ist. Diese müssen nun ausgewählt werden, z. B. im Fall eines Aptamers durch Binden an den Liganden. Anschließend werden diese Nukleinsäuren von den restlichen Sequenzen der Bibliothek isoliert. Man hat also nun eine oder mehrere Sequenzen mit der gewünschten Eigenschaft, allerdings nur eine extrem geringe Menge. Den Schritt der Vermehrung erledigt nun eleganterweise die PCR, bei der die verbleibenden Sequenzen sehr schnell nahezu beliebig oft vervielfältigt werden.

Hierbei kann man sogar eine Art künstliche Mutation einfügen, indem man die bei der PCR namensgebende Polymerase stört. Beckman et al. konnten 1985 nachweisen, dass die Fehler-rate der Polymerase I stark von der Konzentration an Mangan-Ionen abhängt [40].

Nach 5–10 Selektionsrunden ist der Pool hochangereichert mit Sequenzen, die mit hoher Affinität und Spezifität an den gewünschten Liganden binden oder die gewünschte enzymatische Funktion erfüllen [41].

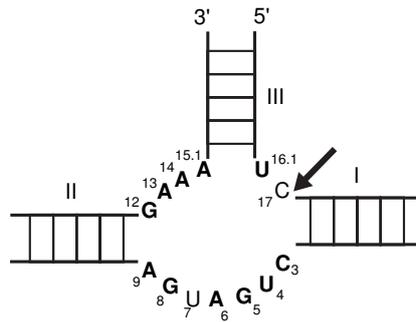


Abbildung 2.1: Die Sekundärstruktur des zentralen „Hammerhead“-Motivs besteht aus einer dreiarmligen RNA-Kreuzung. Die sogenannten erhaltenen Nukleotide (fette Buchstaben) sind entsprechend der üblichen Konvention durchnummeriert. Der Pfeil zeigt die Stelle, an der der RNA-Strang durchtrennt wird.

### DNA-Thrombin-Aptamer

Bock et al. entwickelten 1992 durch SELEX ein DNA-Aptamer, das als eines der ersten mit einer möglichen therapeutischen Verwendung gilt: die 15 Basen lange Sequenz 5'-GGT TGG TGT GGT TGG-3', die stark (mit einer Dissoziationskonstanten im Bereich von 25–200 nM) an menschliches  $\alpha$ -Thrombin bindet: das Thrombin-Aptamer [42].

Thrombin ist ein Protein, das als Enzym eine Schlüsselrolle in der Blutgerinnungskaskade spielt. Es ist eine Serin-Protease, d. h. es enthält die Aminosäure Serin im aktiven Zentrum und katalysiert die Spaltung (Hydrolyse) von Peptidbindungen. Schon Morawitz stellte 1904 das folgende Gerinnungsschema auf [43]: Thrombin wird aus Prothrombin durch Thrombokinase und Kalziumionen hergestellt. Die „Hauptaufgabe“ von Thrombin besteht in der Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin. Anschließend polymerisiert Fibrin und bildet ein Netzwerk, das Blutgerinnsel, welches die Wunde schließt.

Zurück zu unserem 15 Basen langen Thrombin-Aptamer: dadurch, dass es den Blutgerinnungsfaktor Thrombin bindet, erhöht es die Gerinnungszeit in gereinigtem Fibrinogen von 25 auf 169 s (2 mg/ml Fibrinogen, 13 nM Thrombin, 100 nM DNA-Aptamer) und in menschlichem Blutplasma von 25 auf 43 s (Verhältnis Thrombin zu Aptamer wie oben) [42].

Unter Verwendung von Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (siehe Kapitel 4.2) wurden bereits einige Sensoren auf der Grundlage von Aptameren konstruiert [44, 45, 46, 47].

### Nukleozyme

Nukleozyme sind DNA- oder RNA-Sequenzen, die wie ein Enzym eine katalytische Wirkung auf eine bestimmte Reaktion haben [48, 49]. Unter den katalysierten Reaktionen findet man z.B. die Spaltung [39] und die Herstellung [50] von Phosphatester-Bindungen sowie die Bildung von Peptidbindungen [51]. Ein Beispiel stellt das „Hammerhead“-Ribozym dar, dessen katalytische Wirkung bei RNA-Selbstteilungsreaktionen von Forster et al. beschrieben wurde [52]. Obwohl die Sekundärstruktur des zentralen Hammerhead-Motivs (siehe Abb. 2.1) seit fast 20 Jahren bekannt ist [53] und die ersten Strukturen gut fünf Jahre später aufgeklärt werden konnten, gab es bis vor kurzem keine umfassende Erklärung für die molekulare Funkti-

onsweise des Hammerhead-Ribozyms. Letztes Jahr gelang Martick und Scott ein Durchbruch, indem sie eine Struktur des vollständigen *Schistosoma mansoni*-Hammerhead-Ribozyms nahe des Übergangszustandes aufklären konnten. Die vollständige Hammerhead-Struktur zeigt, wie tertiäre Wechselwirkungen, die entfernt von der enzymatisch aktiven Region stattfinden, die katalytische Funktion dieses Ribozyms „ankurbeln“ [54].

Als erstes Desoxyribozym wurde 1994 von Breaker und Joyce eine Sequenz durch in-vitro-Selektion ermittelt, die ebenfalls ein Oligonukleotid teilen kann [55]. In diesem Fall besteht das „Substrat“-Oligonukleotid aus DNA und nur an der Stelle, an der die Teilung erfolgt, ist ein Ribonukleotid (Adenosinmonophosphat) eingebaut. Damit die Teilung erfolgt, ist die Anwesenheit von  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$  erforderlich. Zur Funktion in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  konnte das bestehende Desoxyribozym erfolgreich weiterentwickelt werden [56]. Wenig später wurden weitere RNA-teilende Desoxyribozyme entwickelt [57]. Neben dem Trennen von Oligonukleotiden gibt es auch Desoxyribozyme, die geeignete DNA-Einzelstränge aneinanderhängen können [58].

### Riboswitches und allosterische Nukleozyme

Neben den in-vitro entwickelten Aptameren existieren auch natürliche Aptamere als Bestandteil so genannter „riboswitches“ (RNA-Schalter). Ein Riboswitch ist ein strukturierter Teil eines mRNA-Moleküls, der sich typischerweise in der unübersetzten 5'-Region befindet, wo er die Genexpression über das Binden an ein kleines Zielmolekül (Metaboliten) reguliert. Die meisten RNA-Schalter bestehen aus zwei Strukturdomänen: der Aptamerdomäne und einer Expressionsplattform, in der durch die Konformationsänderung beim Binden an den Metaboliten eine Änderung der Genexpression bewirkt wird. Die Regulierung der Genexpression kann sowohl auf der Ebene der Transkription erfolgen wie auch auf der Ebene der Translation. Im Falle eines RNA-Schalters, der die Transkription inhibiert, bildet die mRNA in Abwesenheit des Metaboliten eine „Anti-Terminator“-Struktur (Hairpin Loop, Haarnadel-Schleufe). Wenn der Metabolit bindet, bildet sich eine konkurrierende Hairpin-Struktur, die als intrinsischer Transkriptions-„Terminator“ dient [59]. Im Falle eines Riboswitches, der die Aufnahme der Translation kontrolliert wird durch das gebundene Aptamer die Translation verhindert, indem die Ribosom-Bindungsstelle unzugänglich gemacht wird. Somit ist eine mRNA, die einen RNA-Schalter enthält, direkt an der Regulierung ihrer eigenen Aktivität beteiligt – in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit des Zielmoleküls [60].

Als allosterisches Nukleozym (oder auch Aptazym) bezeichnet man bei Nukleinsäuren die Kombination der Fähigkeiten, Liganden zu binden und katalytisch zu wirken [61]. Allosterische Kontrolle bedeutet in der Biochemie die Regulierung eines Proteins mit Enzymfunktion durch die Bindung an ein bestimmtes Zielmolekül an die allosterische Region des Proteins, die nicht mit der Region zusammenfällt, in der die Reaktion katalysiert wird („active site“). Genau wie bei diesem allosterischen Protein bewirken bei einem allosterischen Nukleozym Konformationsänderungen in der Liganden-bindenden-Region Änderungen in der katalytischen Region, was zu einer Änderung der enzymatischen Aktivität führt. Die Zielmoleküle können im einfachsten Fall Oligonukleotide sein, aber natürlich auch Ionen, kleine Moleküle, Makromoleküle, alles, wofür es bereits ein Aptamer gibt, oder man eines entwickeln kann. Das erste Aptazym wurde 1995 von Porta et al. entwickelt. Es besteht aus RNA und enthält das bereits vorgestellte Hammerhead-Ribozym. Die Kontrolle erfolgt durch die An- oder Ab-

wesenheit eines spezifischen DNA-Oligonukleotids, das zu einer einsträngigen Schleife (Loop) in dem RNA-Enzymmolekül komplementär ist. Nur bei Anwesenheit dieses DNA-Moleküls befindet sich das Ribozym in seinem aktiven Zustand und spaltet einen geeigneten RNA-Substratstrang in zwei definierte Teilstränge [62].

Basierend auf diesem allosterischen Funktionsprinzip und dem von Breaker entwickelten Desoxyribozym (siehe oben) haben Stojanovic et al. zunächst ein allosterisches Desoxyribozym entwickelt und in der Folge logische Schalter, die in Abhängigkeit von einem Eingangssignal in Form eines bestimmten DNA-Einzelstranges gemäß ihres Designs eine logische Antwort geben [63, 64, 65].

### 2.1.4 Nanopartikel-DNA-Konstrukte

Metallische Nanokristalle und Halbleiter-Nanocluster (Quantenpunkte) sind aufgrund der Vielseitigkeit ihrer Anwendbarkeit in der aktuellen Forschung von herausragendem Interesse. 1996 wurde von Mirkin et al. [66] und Alivisatos et al. [67] eindrucksvoll demonstriert, dass man Gold-Nanopartikel gezielt anordnen kann, wenn man diese an DNA-Einzelstränge bindet, die an einem Ende eine Thiol-Gruppe haben. Die Organisation der Goldpartikel erfolgt über die DNA-Selbstassemblierung mittels sticky ends. In der Folge wurde untersucht, welchen Einfluss die Länge der DNA-Verbindungsstücke zwischen zwei Nanopartikeln auf die optische Absorption der gesamten Aggregate hat [68]. Außerdem wurde auch die Anbindung von Streptavidin-beschichteten Metall-Nanopartikeln an DNA-Stränge mit einem Biotin an einem Ende ihrer Sequenz vorgeschlagen [69]. Beide Anbindungsmöglichkeiten kommen in dieser Arbeit zum Einsatz (siehe Kapitel 3.2.2). Kann man die Anzahl der an ein Nanopartikel gebundenen Oligonukleotide nicht bei der Anbindung kontrollieren, so kann man diese anschließend durch Gelelektrophorese auftrennen und isolieren [70].

## 2.2 Motivation dieser Arbeit

Von der Grundlagenseite her ist es erstrebenswert, mehr über die Operationsweise molekularer Maschinen herauszufinden. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit die ersten Fluoreszenz-korrelationspektroskopie-Experimente an einer funktionalen DNA-Maschine und Einzelmolekülexperimente an den DNA-Tweezers durchgeführt (siehe Kapitel 5.3.4 und 5.1.3).

Die früheren Prototypen von „DNA-Maschinen“ erfüllen alle keine eigentliche Funktion, außer der, durch eine Konfigurationsänderung eine Bewegung auszuführen. Eine Ausnahme bilden die logischen Schalter von Stojanovic et al., die auf einem Desoxyribozym basierend angewiesen werden können, einen DNA/RNA-Chimärenstrang in zwei Teile zu spalten (vgl. allosterisches Nukleozym, Kapitel 2.1).

In dieser Arbeit besteht der Ansatz deshalb in der Einbindung von Aptameren in DNA-Nanomaschinen, um diesen die kontrollierbare Funktion des Bindens und Freisetzens von Stoffen zu geben. Dies stellt einen eminent wichtigen Schritt für die Weiterentwicklung von DNA-basierten Nanomaschinen dar, denn diese können nun mit einem molekularen Greifer ausgestattet werden. Anwendungsgebiete sind der Transport von Stoffen durch DNA-Nanomaschinen, Drug release, Sensoren und viele weitere.

Eine weitere vielversprechende Forschungsrichtung ist die Kombination von DNA-Maschinen

---

mit Nanopartikeln, was letzteren zu mehr Biokompatibilität verhelfen kann, aber auch für das Biomaterial DNA eine Anbindung an die Welt der Quantendots darstellt. Während bisher im Wesentlichen statische DNA-Nanopartikel-Konstrukte untersucht wurden, konzentriert sich diese Arbeit auf die Kombination von Gold-Nanopartikeln mit dynamischen DNA-Aktuatoren. In der Zukunft ist eine Verwendung in schaltbaren Materialien vorstellbar. Zudem können DNA-Nanopartikel-Maschinen als „Tools“ zur Beantwortung materialwissenschaftlicher / physikalischer Fragestellungen dienen, z. B. kann unter Umständen die Wechselwirkung eines Exzitons (Fluoreszenzfarbstoff oder halbleitender Quantendot) mit einem Plasmon (Gold-Nanopartikel) unter Variation kontrollierbarer Parameter (Abstand oder Winkel) gezielt untersucht werden.



# 3 Material und Methoden

## 3.1 Desoxyribonukleinsäuren

### 3.1.1 Grundlegende Eigenschaften

#### Struktur

Einzelsträngige DNA besteht aus den Nukleosiden (dem Zucker Desoxyribose plus einer Base), die über die Phosphate verbunden sind. Die Kohlenstoffatome des Zuckers werden durchnummeriert; am 1' C-Atom hängt die Base (Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin), am 5' C-Atom beginnt die DNA mit einer Phosphatgruppe, am 3' C-Atom endet sie mit einer Hydroxylgruppe. Üblicherweise werden DNA-Sequenzen vom 5' zum 3'-Ende angegeben. Die Richtung des DNA-Moleküls spielt auch für viele Enzyme eine Rolle, sie arbeiten nur in einer bestimmten Richtung. Zwei Einzelstränge können aneinander binden (hybridisieren) und bilden unter physiologischen Bedingungen eine rechtshändige Doppelhelix, wenn sie komplementär sind. Komplementarität bedeutet, dass jede Base eine geeignete Partnerbase zur Bildung eines Watson-Crick-Basenpaares findet (A–T, C–G). Grundlage dieser Basenpaare sind Wasserstoffbrücken: Adenin und Thymin bilden zwei, Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrücken, weshalb die G–C-Bindung stabiler ist. In der hybridisierten Form liegt immer ein Strang in 5'–3' und der komplementäre in 3'–5'-Richtung vor (antiparallel). Unter physiologischen Pufferbedingungen ( $\text{pH} \approx 7$ ,  $\sim 100 \text{ mM}$  einwertiges Salz) existiert die Doppelhelix in der B-Form. Dabei ist der Durchmesser der rechtshändigen Helix 2 nm, die Entfernung zwischen zwei benachbarten Basenpaaren beträgt 0.34 nm und eine vollständige Umdrehung der Doppelhelix umfasst 3.4 nm (10 Basenpaare). Unter speziellen Pufferbedingungen oder in Hydratationsbedingungen kann DNA die A-Form (rechtshändig, Durchmesser 2.6 nm, 11 Basenpaare/Umdrehung) oder die Z-Form (linkshändig, 1.8 nm, 12 Basenpaare/Umdrehung) annehmen (vgl. [71, Kapitel 3]).

#### Mechanische Stabilität

Einsträngige und doppelsträngige DNA unterscheidet sich deutlich hinsichtlich ihrer mechanischen Stabilität. Im Mittelpunkt des Interesses steht die Biegesteifigkeit der jeweiligen Polymerkette. Es gibt mehrere theoretische Modelle zur Beschreibung von Polymerketten (random walk, Gaußsche Kette, starrer Stab), hier wird nur kurz auf das Modell des halbsteifen (im Englischen: semiflexible, auch worm-like chain) Polymers eingegangen, da dieses die Eigenschaften von doppelsträngiger DNA am besten beschreibt. Das Polymer wird als langer, elastischer Stab aufgefasst. Untersucht wird in diesem Modell der Einfluss von thermischen Fluktuationen auf die lokale Krümmung des Stabes. Die Orientierung des Polymers wird dabei durch den Tangentenvektor  $\vec{t}$  beschrieben (siehe Abb. 3.3). Als Ergebnis erhält man für

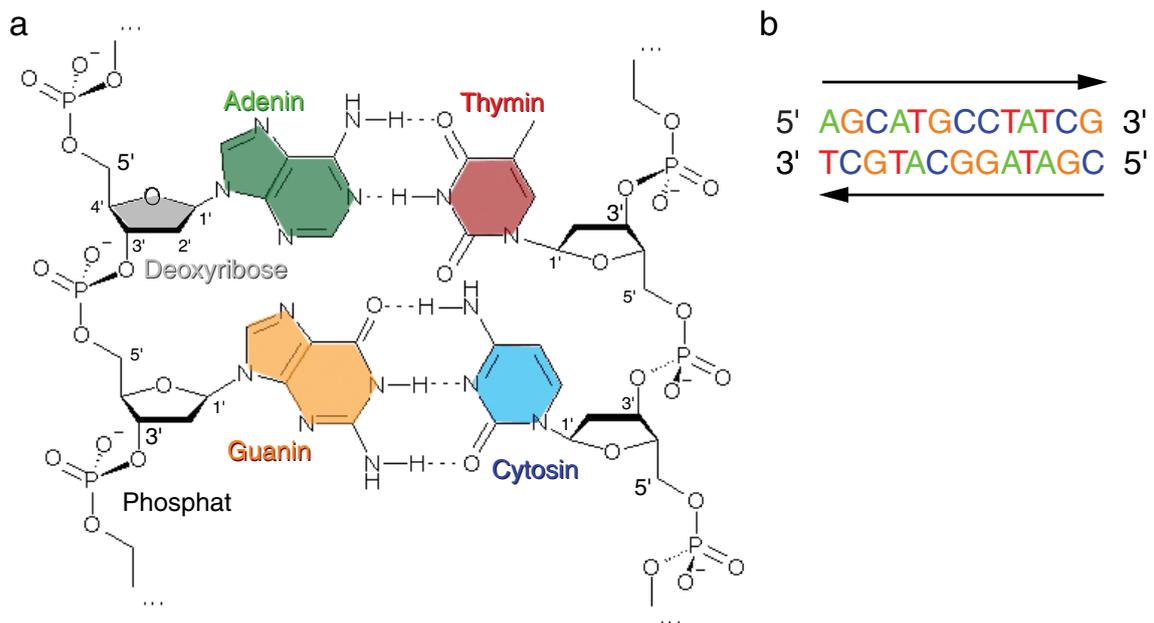


Abbildung 3.1: a) Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus einer DNA-Doppelhelix aus dem Phosphatrückgrat, dem Zucker Desoxyribose (grau) und den vier Basen Adenin (grün), Thymin (rot), Guanin (orange) und Cytosin (blau). In überarbeiteter Form übernommen von: <http://de.wikipedia.org/wiki/DNA> b) Schematische Darstellung eines hybridisierten DNA-Duplexes unter Angabe der Basensequenz. Die Hybridisierung erfordert zwei Einzelstränge die zueinander invers komplementär sind.

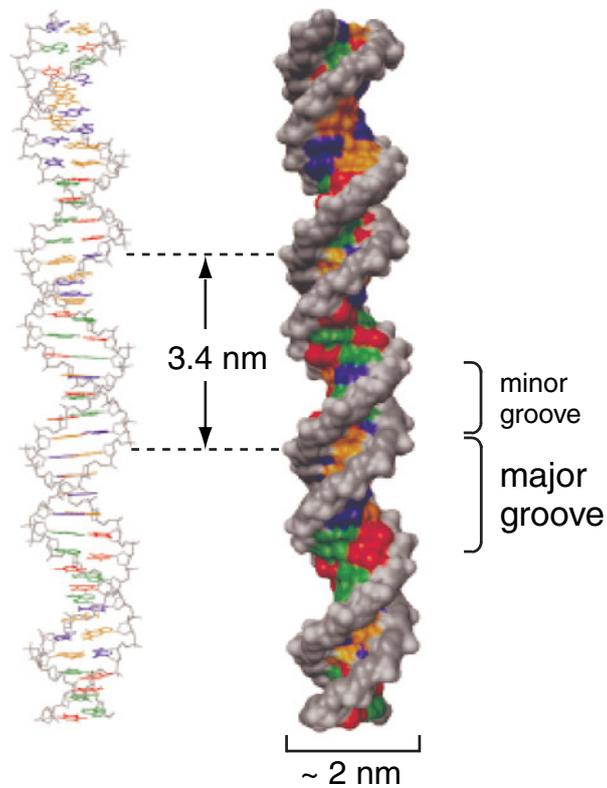


Abbildung 3.2: Zwei Ansichten einer B-Form-DNA-Doppelhelix.

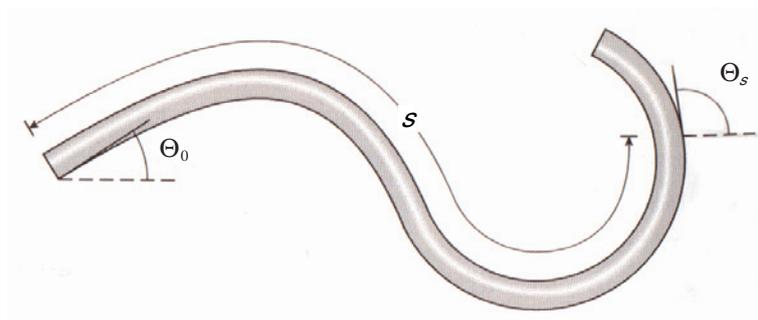


Abbildung 3.3: Zur Veranschaulichung des Polymermodells des langen elastischen Stabes. Die Persistenzlänge  $L_P$  ist die charakteristische Länge über die die beiden Tangentenvektoren am Ort 0 und am Ort  $s$  miteinander korreliert sind (aus [72]).

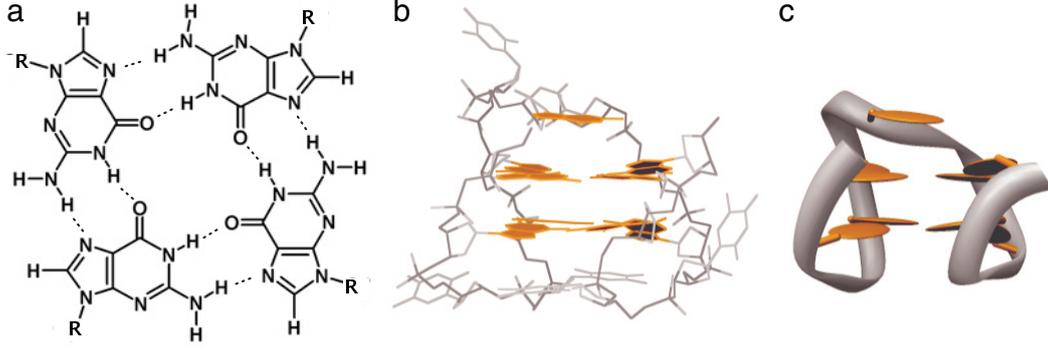


Abbildung 3.4: a) Darstellung des G-Quartetts. Bei dieser DNA-Struktur binden vier Guanin-Basen eine Ringstruktur, bei der zwei benachbarte Guanine jeweils über zwei Wasserstoffbrückenbindungen (gepunktete Linien) verbunden sind. Alle vier Basen liegen bei diesem Motiv in einer Ebene. b) und c) Zwei molekulare Darstellungen der G-Quartetts-Struktur des DNA-Thrombin-Aptamers nach [73]. Man erkennt die zwei aufeinander gestapelten G4-Ebenen.

die Korrelation der beiden Tangentenvektoren am Ort 0 und am Ort  $s$ :

$$\langle \vec{t}(s) \cdot \vec{t}(0) \rangle = \langle \cos(\Theta_s - \Theta_0) \rangle = e^{-s/L_P} \quad (3.1)$$

Die Korrelation der beiden Tangentenvektoren bzw. des Kosinus des Winkels zwischen ihnen fällt also exponentiell ab. Die charakteristische Längenskala  $L_P$  wird als Persistenzlänge bezeichnet. Sie ist mit dem Biegemodul  $\kappa$  verknüpft über:

$$L_P = \frac{\kappa}{k_B T} \quad (3.2)$$

Der mittlere quadratische End-zu-End-Abstand ist in diesem Modell gegeben durch:

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = \left\langle \left( \vec{R}(L) - \vec{R}(0) \right)^2 \right\rangle = 2L \cdot L_P \left( 1 - \frac{L_P}{L} \left( 1 - e^{-L/L_P} \right) \right) \quad (3.3)$$

mit der Kontourlänge  $L$  und dem End-zu-End-Vektor  $\vec{R} = \int_0^L \vec{t}(s) ds$ . Für  $L \gg L_P$  gilt also näherungsweise:

$$\langle \vec{R}^2 \rangle \approx 2L \cdot L_P \quad (3.4)$$

Unter normalen Bedingung ( $\sim 100$  mM einwertiges Salz, Raumtemperatur) beträgt die Persistenzlänge von doppelsträngiger DNA 50 nm, was etwa 150 Basen entspricht, und die von einsträngiger DNA etwa 1 nm (ca. 3 Basen), letztere ist aber sehr stark von der genauen Sequenz abhängig.

### 3.1.2 Nicht-Watson-Crick-Basenpaarung: Das G-Quartett

Henderson et al. berichteten 1987 von einer nicht-Watson-Crick-Basenpaarung in der DNA-Sequenz der Telomere, den Enden der Chromosomen [74]. Aus ihren NMR-Messungen konnten

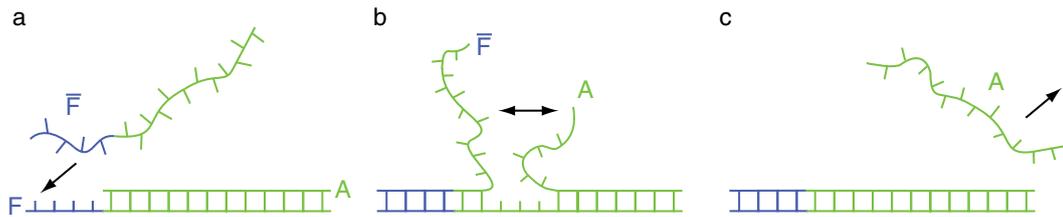


Abbildung 3.5: Darstellung der Kreuzungspunktwanderung bei Verwendung einer „Haltepunktsequenz“. Mit dieser Methode kann ein Strang A, der zunächst über seine ganze Länge mit dem längeren Strang F hybridisiert ist und als Doppelhelix vorliegt, durch Zugabe des Stranges  $\bar{F}$ , der exakt komplementär zu F ist, wieder als Einzelstrang frei verfügbar gemacht werden.

sie schließen, dass zwei Guanin-Basen eine Bindung eingehen, die durch zwei Wasserstoffbrücken ermöglicht wird. Zwei Jahre später stellten Williamson et al. das G-Quartett-Modell für telomerische Oligonukleotide auf [75]. In diesem Modell binden vier Guanine über Wasserstoffbrücken in einer ebenen, symmetrischen und ringförmigen Anordnung (siehe Abb. 3.4). Räumlich stabilisiert wird eine solche Verbindung erst dadurch, dass zwei oder mehrere G-Quartett-Ebenen direkt aufeinander zu liegen kommen, weshalb nur DNA-Stränge diese Struktur bilden können, die viele Guanine enthalten. Aus vier einzelnen, zwei Strängen, die jeweils zwei Abschnitte, oder aus einem einzelnen Strang, der vier Abschnitte mit jeweils mindestens zwei Guaninen in Folge hat, kann sich eine solche DNA-Quadruplex-Struktur bilden (bestehend aus vier Strängen oder Strangabschnitten). Zusätzlich ist für die Stabilität einer G-Quartett-Struktur die Anwesenheit von Kationen essentiell. Dies konnte Williamson aus durchgeführten Gelelektrophoreseexperimenten schließen und folgerte, dass das Kation genau zwischen den vier Basen einer Ebene sitzt. Heute weiss man aus Röntgenstrukturaufklärungen, dass das Kation nicht immer in derselben Ebene eines G-Quartetts, sondern meistens zwischen zwei G-Quartett-Ebenen sitzt [76]. Dadurch kann es Kation-Dipol-Wechselwirkungen mit 8 Guaninen ausüben und kann so die Abstoßung der 8 zentralen Sauerstoffatome verringern. Dadurch wird die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen verstärkt und das Aufeinander-schichten der G-Quartette stabilisiert.

Die in Abb. 3.1.2b und c gezeigte G-Quartett-Struktur aus einem einzelnen Strang (nämlich die des Thrombin-Aptamers) wird in Kapitel 3.2.4 eingesetzt und erläutert.

### 3.1.3 Kreuzungspunktwanderung

In der Natur kommt es im Rahmen der genetischen Rekombination dazu, dass DNA-Stränge zwischen zwei DNA-Duplexen homologer Sequenz im Prozess der „Kreuzungspunktwanderung“ (engl.: branch migration) ausgetauscht werden. Die Kreuzungspunktwanderung wird in einer Vielzahl von maschinenähnlichen DNA-Schaltern zum Austausch von DNA-Strängen verwendet. Die branch migration bei drei Strängen ist in Abb. 3.5 schematisch dargestellt. Zudem wird hier der Begriff „Haltepunktsequenz“ (engl. toehold section) veranschaulicht. Dies ist der kurze einsträngige Abschnitt (in blau) des unteren Stranges F in Abb. 3.5a. Dieser einsträngige Überhang („sticky end“) dient dem freien Einzelstrang  $\bar{F}$  als „Angriffspunkt“. Zunächst bildet jedoch Strang F mit dem für seine Länge komplementären mittleren Strang A eine stabile Doppelhelix (grüner Doppelstrang).  $\bar{F}$  wird sich an der Haltepunktsequenz

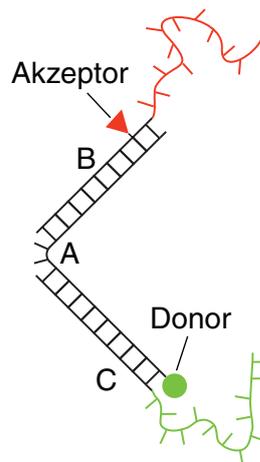


Abbildung 3.6: Aufbau der DNA-Tweezers aus drei Einzelsträngen. Die beiden Arme, die jeweils aus einer 18-Basenpaar-Doppelhelix bestehen, sind mit einem Donor- und einem Akzeptorfarbstoff markiert (siehe Text).

von F anlagern und so weit er kann mit F hybridisieren. Wenn nun ein Basenpaar am linken Ende des Doppelstranges AF durch thermische Fluktuationen aufgebrochen wird, kann sich die vorübergehend freie Base von F auch mit der entsprechenden Base von  $\bar{F}$  paaren. Dadurch wandert der Kreuzungspunkt nach rechts. Dieser Vorgang an sich ist jedoch reversibel: Der Kreuzungspunkt kann im nächsten Schritt genauso wieder nach links zurück wandern (Abb. 3.5b). Ein theoretisches Modell zur Beschreibung dieser „Zufallswanderung“ (engl. random walk) und eine Abschätzung der hierbei relevanten kinetischen Parameter finden sich in Kapitel 4.1.3. Ist die Haltepunktsequenz gut gewählt worden und damit die Doppelhelix in diesem Bereich stabil, gelingt es dem kürzeren Strang allerdings nicht mehr, den längeren Konkurrenten zu „vertreiben“. Kommt der Kreuzungspunkt dagegen einmal an das rechte Ende des unteren Stranges, wird der kürzere Strang vollständig abgelöst und die beiden verbleibenden Stränge bilden nun eine stabile Doppelhelix (Abb. 3.5c).

## 3.2 Untersuchte DNA-basierte Aktuatoren und Maschinen

### 3.2.1 DNA-Tweezers

#### Aufbau und Funktion der DNA-Tweezers

Die DNA-Tweezers bestehen aus drei Einzelsträngen A, B und C. A ist der 40 Basen lange zentrale Strang, dessen beide Enden jeweils mit B und C über einen Abschnitt von 18 Basen hybridisieren. Dadurch bilden sich die beiden stabilen Arme (Doppelhelix!) und die verbliebenen vier mittleren ungepaarten Basen von A sind das flexible Scharnier der „Pinzette“. Durch stöchiometrische Zugabe des Treibstoffstranges F können die Tweezers folgendermaßen geschlossen werden: Der 56 Basen lange Schließstrang F besteht aus zwei aufeinander folgenden 24 Basen langen Abschnitten, die zu den losen Enden von B und C komplementär sind, und einem zusätzlichen Abschnitt von 8 Basen. Abbildung 3.7 zeigt, wie der Schließstrang F mit den freien Enden der Stränge B und C hybridisiert und dadurch die Enden der

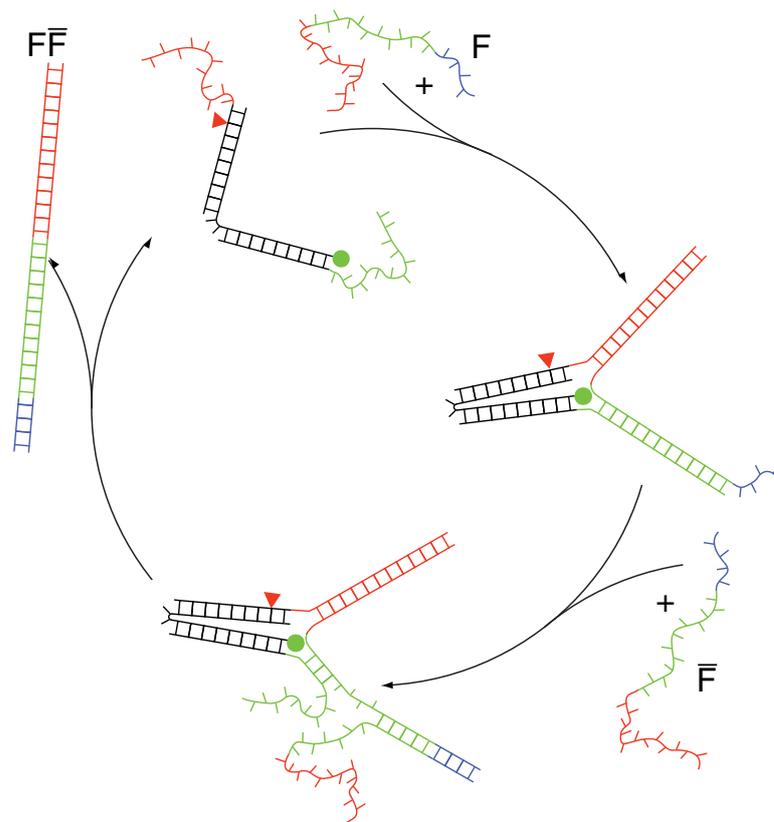


Abbildung 3.7: Operationszyklus der DNA-Tweezers: Oben links befinden sich die Tweezers im „offenen“ Zustand (siehe Abb.3.6). Wird der Treibstoffstrang F zugegeben, hybridisiert dieser mit den freien Enden der Stränge B und C (rot und grün dargestellt) und zieht dadurch die Tweezers in den „geschlossenen“ Zustand (rechts). Durch Hybridisierung mit der überstehenden „Haltepunktsequenz“ von F (blau dargestellt), gelingt es dem zweiten Treibstoffstrang  $\bar{F}$  den ersten (F) von den Tweezers abzulösen. Es entsteht das doppelsträngige Abfallprodukt  $F\bar{F}$  und die Tweezers liegen wieder geöffnet vor. Die komplementären Abschnitte der Sequenzen von B, C, F, und  $\bar{F}$  sind so wie in Tabelle 3.1 gefärbt.

Strang	5'	Sequenz	3'
A	Atto 532	TGCCTTGTAAGAGCGACCATCAACCTGGAATGCTTCGGAT	-
B	-	GGAGTCCTACTGTCTGAACTAACGAtCCGAAGCATTCCAGGT	-
C	-	GGTCGCTCTTACAAGGCACTGGTAACAATCACGGTCTATGCG	-
F	-	CGCATAGACCGTGATTGTTACCAGCGTTAGTTCAGACAGTAGGACTCCTGCTACGA	-
$\bar{F}$	-	TCGTAGCAGGAGTCCTACTGTCTGAACTAACGCTGGTAACAATCACGGTCTATGCG	-

Tabelle 3.1: Basensequenzen der DNA-Tweezers-Stränge. Der Strang B ist intern an der 26. Base (Thymidin, t) mit dem Farbstoff Atto 647-N markiert.

Tweezers zusammenzieht. Um die Tweezers wieder zu öffnen, wird die zweite Sorte „Treibstoff“ verwendet: der Strang  $\bar{F}$ , der das Komplement von F ist. Nach Zugabe von  $\bar{F}$  zu den geschlossenen Tweezers beginnt der Öffnungsstrang  $\bar{F}$  an das freie Ende des Schließstranges zu hybridisieren. Anschließend kommt es zur „Kreuzungspunktwanderung“: einem Random Walk der Verbindungsstelle zwischen dem Bereich, in dem F bereits neu an  $\bar{F}$  hybridisiert ist und dem Bereich, in dem F noch an die Tweezers-Komponenten B und C hybridisiert ist. Die Branch migration dauert so lange, bis B und C vollständig verdrängt sind und das Abfallprodukt  $F\bar{F}$  wegdiffundiert.

### Präparation der DNA-Tweezers

Für die Ensemblemessungen in Kapitel 5.1.1 wurden die DNA-Tweezers bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in TE- (Tris-EDTA, pH 8.0)-Puffer bei 1 M NaCl aus einer äquimolaren Lösung der Stränge A, B und C hergestellt und für die Messung mit TE + 1 M NaCl auf eine Konzentration von 50 nM verdünnt. Die Treibstoffstränge F und  $\bar{F}$  wurden äquimolar zugegeben. Für die Gelelektrophoreseexperimenten in Kapitel 5.1.2 wurden die Tweezers analog hergestellt: Bei dem Gel in Abb. 5.2 enthielt der Hybridisierungspuffer stets 1 M NaCl, bei dem Gel in Abb. 5.3 ist in der Bildunterschrift angegeben, wieviel Salz im Hybridisierungspuffer enthalten war. Die geschlossenen Tweezers werden durch stöchiometrische Zugabe von Strang F zu den bereits hybridisierten offenen Tweezers (A+B+C) hergestellt. Für die spFRET-Messungen in Kapitel 5.1.3 wurden die entsprechenden Proben im jeweiligen Puffer (TE + NaCl) auf Endkonzentrationen von etwa 20 pM verdünnt.

### 3.2.2 Gold-Nanopartikel–DNA-Tweezers

So wie es Energietransfer von einem Donor-Farbstoff auf einen Akzeptor-Farbstoff gibt, gibt es auch strahlungslosen Energietransfer von einem Farbstoff auf ein metallisches Nanoteilchen. Dieser Transfer birgt interessante Anwendungsmöglichkeiten, da der Transfer über weitere Distanzen stattfindet als dies beim Förster-Transfer zwischen zwei Farbstoffen der Fall ist. DNA-Aktuatoren bieten die Möglichkeit, den Abstand zwischen Farbstoff und Nanopartikel und in Zukunft eventuell auch weitere Parameter gezielt zu variieren.

### Die Plasmon-Bande bei Gold-Nanopartikeln

Die Plasmon-Bande (engl: plasmon band) bei Gold-Nanopartikeln ist eine breite Absorptionsbande im sichtbaren Bereich bei etwa 520 nm. Frei bewegliche Elektronen zeigen eine charakteristische kollektive Oszillationsfrequenz: die Plasmafrequenz. Diese Oszillation führt zur Plasmonresonanz-Bande. In diesem Abschnitt wird kurz auf den physikalischen Hintergrund

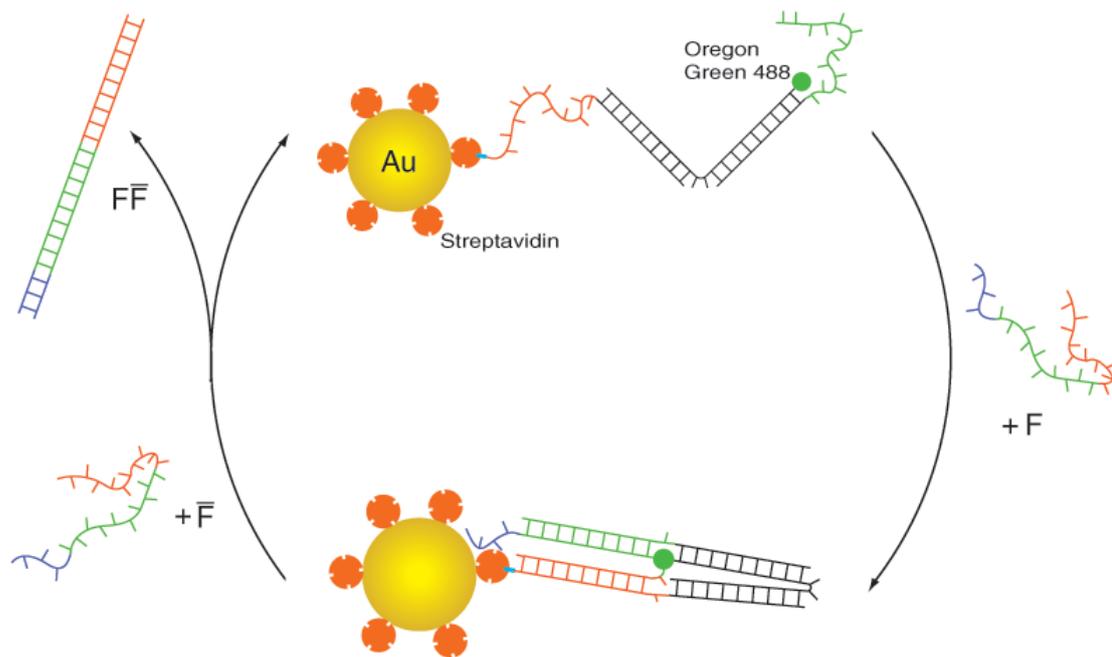


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des Operationszyklus und des Aufbaus der Au-Nanopartikel-DNA-Tweezers. Das 5 nm große Goldpartikel ist mit ca. 5-6 Streptavidin-Proteinen beschichtet. Jedes Streptavidin hat vier Bindungsstellen für das Vitamin Biotin. Über die starke nichtkovalente Streptavidin-Biotin-Bindung werden DNA-Tweezers mit einer Biotin-Gruppe an einem Ende an die Gold-Nanopartikel angebunden. Durch Zugabe der Treibstoffstränge F und  $\bar{F}$  können diese Tweezers geschlossen und wieder geöffnet werden.

dieses Absorptionsmaximums eingegangen und die Frage erläutert, unter welchen Bedingungen es auftritt.

Die Absorption eines Metallnanopartikels lässt sich aus seiner dielektrischen Funktion  $\epsilon(\omega)$  bestimmen. Eine wesentliche Rolle spielen kollektive Anregungen von Leitungsbandelektronen durch Licht in einem bestimmten Bereich des sichtbaren Spektrums. Ein Quant dieser kollektiven Anregung wird als Plasmon bezeichnet. Nach dem Drude-Sommerfeld-Modell [77] lässt sich die dielektrische Funktion ausdrücken durch:

$$\epsilon(\omega) = 1 - \frac{ne^2/(\epsilon_0 m_e)}{\omega(\omega + i\Gamma)} = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\Gamma)} \quad (3.5)$$

$\omega$  ist die Kreisfrequenz,  $n$  die Anzahl der Leitungsbandelektronen,  $e$  die Elementarladung,  $m_e$  die effektive Masse eines Elektrons,  $\epsilon_0$  die Dielektrizitätskonstante des Vakuums,  $\Gamma$  ist die Dämpfungskonstante, die Streuprozessen Rechnung trägt, und  $\omega_p = \sqrt{ne^2/(\epsilon_0 m_e)}$  ist die Plasmafrequenz. Nach Aizpurua et al. liegt ein typischer Wert für die Energie der Plasmafrequenz von Gold bei etwa  $\hbar\omega_p \approx 8$  eV [78].

Experimentell wird der Extinktionsquerschnitt  $\sigma_{\text{abs}}(\omega)$  (beschreibt die Dipolabsorption) in einem Medium mit der Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon_m$  bestimmt. Nach der Mie-Theorie gilt in der Nähe der ungedämpften „Mie-Resonanz“ ( $\omega \approx \omega_1 = \omega_p/\sqrt{1 + 2\epsilon_m}$ ) für den Extinktionsquerschnitt:

$$\sigma_{\text{abs}}(\omega) = \sigma_0 \frac{1}{(\omega - \omega_1)^2 + (\Gamma/2)^2} \quad (3.6)$$

Dieses Modell beschreibt metallische Nanopartikel gut, die einen Radius größer 1.1 nm haben, nur kleinere Nanopartikel können nicht mehr wie ein metallischer Festkörper behandelt werden [79]. Bei kleineren Nanopartikeln kommen dagegen Oberflächeneffekte zum Tragen, wodurch die Dämpfungskonstante  $\Gamma$  erweitert werden muss, damit Gleichung 3.5 weiterhin verwendet werden kann. Der zusätzliche Dämpfungsterm  $\Gamma_{\text{surf}}$  zeigt eine inverse Proportionalität zum Radius  $R$  des Nanopartikels, da er dem Verhältnis von Oberflächenstreuungswahrscheinlichkeit ( $\propto 4\pi R^2$ ) zur Gesamtzahl der vorhandenen Streupartner ( $\propto (4/3)\pi R^3$ ) Rechnung trägt. Eine detaillierte Betrachtung führt zu [80]:

$$\Gamma_{\text{surf}}(R) = \frac{v_F}{l_\infty} + \frac{Av_F}{R} \quad (3.7)$$

$l_\infty$  ist die mittlere freie Weglänge im Festkörper,  $v_F$  die Fermi-Geschwindigkeit und  $A$  ist ein Faktor von etwa 1, der Details des Streuprozesses Rechnung trägt. Somit ist für sehr kleine metallische Nanopartikel aufgrund der Oberflächendämpfung die dielektrische Funktion abhängig vom Radius des Teilchens und die Dämpfung steigt, je kleiner das Teilchen wird (siehe Gleichung 3.7). Experimentell findet man einen scharfen Abfall der Plasmon-Bande für Au-Nanopartikel mit Radien im Bereich von 0.95-1.6 nm [81], der durch das Einsetzen von Quanteneffekten erklärt wird, die bei Partikeln mit einem Radius  $< 1.5$  nm relevant werden und eine leichte Blauverschiebung bewirken. Neben der Abnahme der Intensität der Plasmon-Bande tritt gleichzeitig eine Verbreiterung der Plasmon-Bandbreite auf [82].

Neben den kollektiven Anregungen von Elektronen, die für das Auftreten der Plasmon-Bande im Absorptionsspektrum verantwortlich sind, spielen auch Anregungen einzelner Elektronen eine Rolle für die optischen Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln. Ursache dieser Einzelanregungen sind Übergänge einzelner Elektronen von der Obergrenze des 5d-Bandes in die

untersten unbesetzten Niveaus des 6sp-Leitungsbandes. In Absorptionsmessungen zeigen sich diese sogenannten „Interbandanregungen“ als stetig ansteigender Hintergrund unterhalb einer Wellenlänge von etwa 776 nm (entspricht der Energie der „Interbandübergangskante“ von 1.6 eV) [83]. Interbandanregungen finden in Nanopartikeln mit mehr als zwanzig Goldatomen genauso statt wie in massivem Gold.

### Energietransfer zwischen Farbstoff und Goldpartikeln

Eine metallische Oberfläche wirkt auf das elektrische Dipolmoment eines Farbstoffs wie ein Spiegel. Die Wechselwirkung des Dipols mit dem Metall hängt neben anderen Faktoren wesentlich vom Abstand  $d$  des Dipols zur Oberfläche ab. Ist der Abstand groß ( $d > 50$  nm), überwiegt die Interferenz der Dipolstrahlung mit der durch den Spiegel reflektierten Strahlung. Energietransfer wurde bereits Anfang der 70er Jahre als zusätzlicher effektiver Zerfallskanal für angeregte Moleküle nahe eines Metallspiegels diskutiert. Chance, Prock und Silbey entwickelten ein Modell für die Wechselwirkung des Dipols mit Oberflächenplasmonen, nach dem die Abstandsabhängigkeit der Transferrate von der Dicke der Metallschicht abhängt [84]. Der Dipol liefert einen Wechselwirkungsbeitrag  $\beta \propto 1/d^3$  (siehe auch Kapitel 4.2.2). Eine dicke Metallschicht liefert einen konstanten Beitrag  $\beta$ , eine dünne einen Beitrag  $\beta \propto 1/d$ , so dass die Transferrate im ersten Fall  $k_T \propto 1/d^3$  und im zweiten Fall  $k_T \propto 1/d^4$  ist. Persson und Lang bezeichnen in ihrem erweiterten Modell den ersten Fall als Wechselwirkung des Dipols mit dem Volumen und den zweiten als Wechselwirkung mit der Oberfläche [85]. Energietransfer tritt bei Abständen im Bereich von etwa 2 – 30 nm auf [84, 85].

Inwieweit die zuvor beschriebenen Modelle den Energietransfer von Farbstoffen auf Metallnanopartikel zutreffend beschreiben wurde u. a. von Yun et al. untersucht [86]. Sie verwendeten Fluorescein als Farbstoff, ein 1.4 nm Goldpartikel und DNA-Doppelstränge zwischen 15 und 60bp Länge als Spacer, die zusätzlich durch eine DNA-Methyltransferase um einen Winkel von 128° geknickt werden konnte. Ihre Messergebnisse konnten durch das Persson&Lang-Modell der Wechselwirkung eines Dipols mit einer Metalloberfläche erklärt werden, sie fanden eine  $1/d^4$ -Abhängigkeit der strahlungslosen Transferrate.

Dulkeith et al. haben die „strahlenden“ und die strahlungslosen Ratenkonstanten für den Farbstoff Lissamin, der sich im Abstand von 1 nm zu einem Goldnanopartikel befindet gemessen [87]. Bei den einzelnen Messungen werden Goldpartikel zwischen 1–30 nm Radius untersucht. Die gemessene strahlende Ratenkonstante ist für den Farbstoff hat als Funktion des Partikelradius etwa folgenden Verlauf: in Abwesenheit eines Goldpartikels ( $R = 0$ ) ist sie am größten, für sehr kleine Radien (1–5 nm) nimmt sie stark ab, anschließend steigt sie erst stärker (bis etwa  $R = 10$  nm), anschließend deutlich langsamer oder gar nicht mehr (zu wenig Messdaten). Die strahlungslosen Ratenkonstanten sind in Abwesenheit eines Goldpartikels ( $R = 0$ ) am niedrigsten und steigen danach stark an (1–3 nm), anschließend steigen sie weniger stark an.

Diese Beobachtungen konnten teilweise mit dem Modell von Gersten und Nitzan erklärt werden [88]. In späteren Messungen wurde die Abstandsabhängigkeit der Ratenkonstanten für Cy5 und Goldnanopartikel mit 6 nm Radius untersucht [89]. Die Länge der DNA-Doppelstrang-Spacer wurde zwischen 2.2 und 16.2 nm variiert. Je größer der Abstand, desto höher die strahlende Rate und desto niedriger die strahlungslose Rate. In der Nähe des Nanopartikels wird die Fluoreszenzemission des Farbstoffs also stärker gedämpft (engl.: „quen-

ched“), was dadurch erklärt wird, dass die Emissionswellenlänge von Cy5 im Vergleich zur Plasmonresonanz des Goldnanopartikels rotverschoben ist und durch eine Phasendifferenz zwischen dem Dipol und dem Au-Nanopartikel-Plasmon die strahlende Rate unterdrückt wird [89].

Gueroui und Libchaber haben den Energietransfer zwischen einem Halbleiter-Nanokristall (CdSe/ZnS) und einem 1.4 nm Gold-Nanopartikel in Einzelmolekülmessungen untersucht [90]. Als Spacer diente dsDNA von 5.9–10.7 nm Länge. Der Halbleiter-Nanokristall entspricht einem Quantenpunkt (engl. quantum dot) und emittiert im Bereich von 522 nm. Halbleiter-Nanokristalle werden bereits vielfach anstelle von organischen Fluoreszenzfarbstoffen eingesetzt, da sie sehr photostabil sind und sich ihre Wellenlänge maßschneidern lässt. Die Messungen zeigen, dass die Emission des Quantendots bei einer Entfernung von 5.9 nm zum Goldpartikel um 83% „gequencht“ wird, bei weiteren Entfernungen entsprechend weniger. Den Verlauf dieser Quenching-Effizienz kann man sehr gut durch das Förster-Abstandsverhalten der Transfereffizienz ( $f_E = 1/1 + (R/R_0)^6$ , siehe Kapitel 4.2.2) mit einem Förster-Radius  $R_0 = 7.5$  nm beschreiben. Als Erklärung wird in dieser Arbeit vorgeschlagen, dass der kurzzeitige Dipol des Quantendots einen Dipol in Goldpartikel induziert. Dies steht allerdings im Widerspruch zu der Argumentation von Yun et al. , die für gleiche Goldnanopartikel eine andere Abstandsabhängigkeit finden und diese anders erklären (siehe oben).

Somit kann man sagen, dass die wesentlichen Eigenschaften beim Energietransfer zwischen Dipolen (Farbstoffen oder Quantendots) und Goldnanopartikeln verstanden sind, aber im Einzelfall unterschiedliche Modelle zur Erklärung zu Rate gezogen werden. Deshalb ist weitere Forschung in diesem Bereich erforderlich.

### Präparation der Hybridtweezers

Als Anbindungsform wurde der Nanopartikel an die DNA-Tweezers wurde von uns die Streptavidin-Biotin-Bindung gewählt, wobei die Goldpartikel bereits vom Hersteller mit Streptavidin beschichtet wurden. Streptavidin wurde anfangs aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert und ist ein Protein von 52.8 kDa Molekulargewicht, das aus vier gleichen Untereinheiten aufgebaut ist. Jede dieser Untereinheiten bindet mit einer Dissoziationskonstante (siehe Kapitel 4.1.1) von ca.  $10^{-14} - 10^{-15}$  mol/l an ein Biotin (Vitamin B<sub>7</sub>). Diese Bindung ist eine der stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen und findet vielfältige Anwendungen in der Forschung wie in der Biotechnologie.

Das erste von uns untersuchte Hybridsystem enthielt Goldpartikel von 5 nm Durchmesser, die mit Streptavidin beschichtet sind (S4188, Sigma). Die Streptavidin-Goldpartikel liegen als klare, rote, kolloidale Suspension in 0.01 M Phosphat Buffered Saline (PBS), pH 7.4 vor und enthalten 0.02% Polyethylenglykol, 20% Glycerin und 15 mM Natriumazid. Die Partikelgröße variiert zwischen 3 – 6 nm, bei einem Variationskoeffizienten (Standardabweichung/Mittelwert) von weniger als 15%, die mittlere Partikelgröße beträgt 5 nm. Zur Bestimmung des Absorptionsspektrums dieser Streptavidin-Goldpartikel (Abb. 5.7 in Kapitel 5.2.1) wurde der Puffer als Referenzprobe neu aus den einzelnen Bestandteilen angesetzt.

Aus der vom Hersteller angegebenen und von uns experimentell bestätigten maximalen Absorption bei 520 nm,  $A_{520} = 2.5$  OD kann nach Gleichung 3.16 (siehe Kapitel 3.3.3) die Konzentration  $c$  bestimmt werden, wenn man den molaren Extinktionskoeffizienten für die

Streptavidin-Goldpartikel bei dieser Wellenlänge  $\epsilon_{520}$  kennt. Dies war bei der Durchführung unserer Experimente nicht der Fall. Erst kurz darauf haben wir 2005 eine Publikation von Fan et al. [91] gefunden, in der für Absorptionsmessungen an Streptavidin-beschichteten Goldpartikeln von 10 nm Durchmesser der von Jin et al. für 13 nm große Goldpartikel ermittelte molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{520} = 2.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  verwendet wurde. Für eine Abschätzung unserer Partikelkonzentration berücksichtigen wir die unterschiedliche Anzahl der Goldatome bei den unterschiedlich großen Partikeln ( $n \propto V \propto R^3$ ) und erhalten:  $\epsilon_{520} = 1.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .  $c = A_{520}/(\epsilon_{520}d) \approx 0.17 \mu\text{M}$  für eine optische Weglänge von  $d = 1 \text{ cm}$ .

Zum Anbinden dieser Nanopartikel an die Tweezers wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers verfahren. Die Nanopartikel-Suspension wurde mit dem dort angegebenen Puffer auf 1:5 verdünnt, unserer vorhergehenden Abschätzung zufolge beträgt die Konzentration an Goldpartikeln etwa 34 nM. Die Tweezers wurden wie an anderer Stelle beschrieben hybridisiert und lagen vor der Anbindung in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  vor. Dadurch haben wir also etwa 150 DNA-Tweezers pro Streptavidin-Goldpartikel, was zu einigen ungewollten Effekten führt, uns aber zum Zeitpunkt der Experimente nicht bewusst war.

Den Operationszyklus der Goldpartikel-DNA-Hybridtweezers zeigt Abb. 3.8. Die Gold-Nanopartikel sind von Streptavidin bedeckt (orange), an welches der Biotin-terminierte Strang B-bt binden kann. Aufgrund der Größenverhältnisse kann man abschätzen, dass sich auf einem Goldpartikel dieser Größe etwa 5 – 6 Streptavidine befinden. Also können an ein Goldpartikel maximal etwa 20-24 Tweezers binden. Bei diesen Tweezers fehlt der Akzeptorfarbstoff. Zwischen den zwei Zuständen wird durch stöchiometrisches Zugeben der bekannten Treibstoffstränge F und  $\bar{F}$  umgeschaltet.

### 3.2.3 Gold-Nanopartikel–DNA-Stepper

Eine andere hybride DNA-Nanomaschine ist der 3-Schrittweiten-Aktuator, bei dem zuverlässig maximal ein DNA-„Stepper“ an ein 1.4 nm Gold-Nanopartikel gebunden ist. Der Aufbau und die Funktionsweise des Steppers sind in Abb. 3.9 gezeigt: Der zentrale 56 Basen lange Devicestrang ist an einem Ende mit dem Farbstoff Rhodamin Green markiert und am anderen Ende wird das Gold-Nanopartikel angehängt (Details siehe unten). Mittels dreier unterschiedlicher, teilweise oder vollständig komplementärer Stränge (24C, 38C und 56C), die an den freien Devicestrang hybridisieren, nimmt dieser unterschiedliche Konformationen ein. Die Struktur wurde dabei so entworfen, dass an dem Kreuzungspunkt der drei Doppelhelizes jeweils für die obere Helix zwei ungepaarte Basen aufeinander folgen (siehe Abb. 3.9, die mechanische Spannungen der Dreipunkt Kreuzung ausgleichen sollen, damit die beiden unteren Doppelhelizes wie eine einzelne geradlinig verlaufen („Stacking“). In den drei Konformationen des Devicestrangs sind Farbstoff und Nanopartikel durch 24, 38 oder 56 Basenpaare voneinander getrennt, was Entfernungen von ca. 8.2 nm, 12.9 nm bzw. 19 nm entspricht. Die Komplementstränge verfügen zudem über eine 8 Basen lange Haltepunktsequenz. So können sie durch die „Entfernungsstränge“ (removal strands) 24R, 38R und 56R, die exakt komplementär zu den jeweiligen Komplementsträngen sind, mittels Branch migration entfernt werden. Umschalten zwischen zwei Schrittlängen geht also nur über den Zwischenschritt, in dem der Devicestrang frei vorliegt und es somit keinen definierten Abstand zwischen Farbstoff und Au-Nanopartikel gibt.

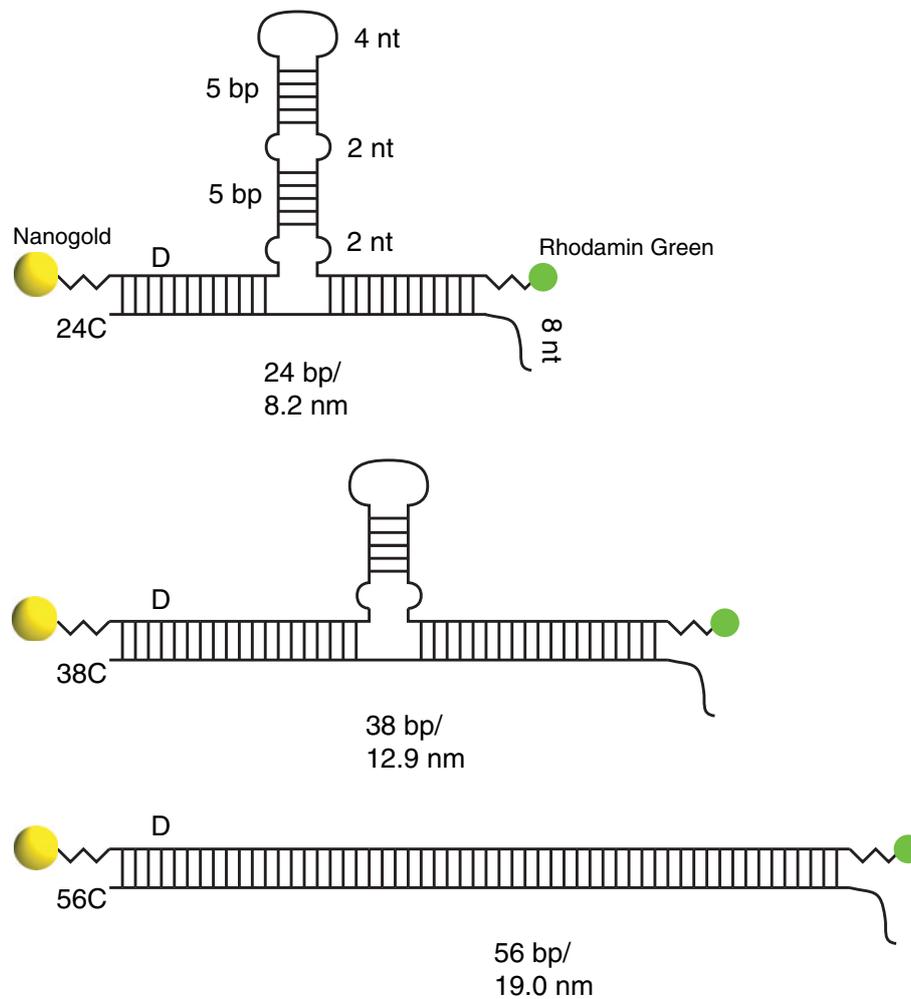


Abbildung 3.9: Aufbau der schaltbaren DNA-3-Wege-Kreuzung aus einem Devicestrang D, an dessen Enden sich ein Nanogold-Partikel und ein Rhodamin Green Farbstoff befindet und unterschiedlichen Komplementsträngen 24C, 38C und 56C, die jeweils 24, 38 und 56 Basenpaare mit D bilden.

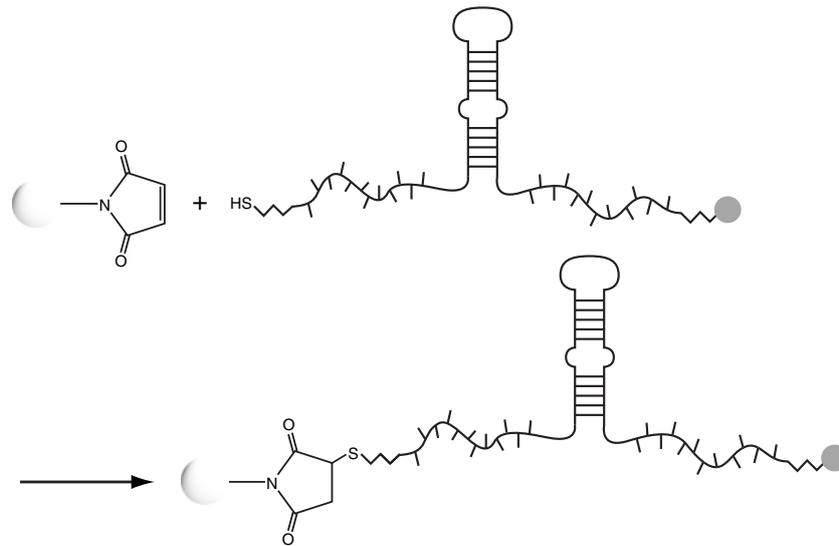


Abbildung 3.10: Bindungsreaktion des Monomaleimido-Nanogold an das Thiol-Ende des Devicestrangs.

### Präparation des Au-Nanopartikel-Steppers

Monomaleimido-Nanogold (Nanoprobes, Yaphank, NY, USA) als aus Puffer lyophilisiertes Pulver wurde gemäß Anleitung mit  $160 \mu\text{l}$  deionisiertem Wasser ( $\text{dH}_2\text{O}$ ),  $20 \mu\text{l}$  Devicestrang ( $100 \mu\text{M}$ ) und  $20 \mu\text{l}$  Isopropanol aufgelöst. Man erhält so eine Lösung von  $30 \mu\text{M}$  Nanogold und  $10 \mu\text{M}$  Devicestrang in Natriumphosphatpuffer ( $20 \text{mM}$ ) bei pH 6.5 mit  $150 \text{mM}$  NaCl. Durch das Zusammengeben von Devicestrang und Monomaleimido-Nanogold findet die in Abb. 3.10 dargestellte Reaktion der Maleimidgruppe mit der Thiolgruppe an der DNA statt. Diese Lösung wurde für die Dauer der Experimente (ca. 3 Monate) im Kühlschrank aufbewahrt.

Laut Hersteller beträgt der mittlere Durchmesser der Goldpartikel  $1.4 \text{nm}$ , der molare Extinktionskoeffizient bei  $420 \text{nm}$   $\epsilon_{420\text{nm}} = 1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , und die Absorptionsverhältnisse  $A_{260\text{nm}}/A_{420\text{nm}} = 4.09$  und  $A_{280\text{nm}}/A_{420\text{nm}} = 2.96$ . Mit diesen Angaben konnte aus den gemessenen Spektren (Abb. 5.11) des Gold-Nanopartikels und des Farbstoffs Rhodamin Green der Försterradius  $R_0$  berechnet werden.

### 3.2.4 Schaltbares Thrombin-Aptamer

Idee und Aufgabenstellung dieses Projektes war die Konstruktion einer proteinbindenden molekularen Maschine, die auf einem DNA-Aptamer basiert. Sie soll mittels DNA-Steuersequenzen angewiesen werden können, den menschlichen Blutgerinnungsfaktor  $\alpha$ -Thrombin zu greifen oder wieder loszulassen. Beim Betrieb dieser DNA-Nanomaschine wird das Thrombinbindende DNA-Aptamer mechanisch zwischen einer bindenden und einer nichtbindenden Form umgeschaltet.

Die Funktion dieses „selektiven Greifers“ wird in Gelelektrophorese-Experimenten (Kapitel 5.3.1) sowie mit Fluoreszenzresonanz-Energietransfer- (FRET-) und Fluoreszenzanisotropiemessungen demonstriert (Kapitel 5.3.3). Die Bindungskinetik wird in Kapitel 5.3.4 genauer

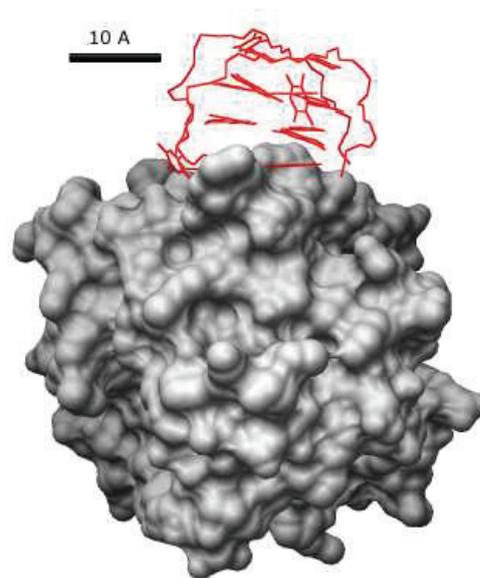


Abbildung 3.11: Molekulare Darstellung des 15-Basen-DNA-Aptamers (rot), das an das Protein Thrombin (grau) bindet. Diese Struktur wurde von Padmanabhan und Tulinsky 1996 publiziert und ist als 1HAP in der PDB (Protein Data Base) hinterlegt [92].

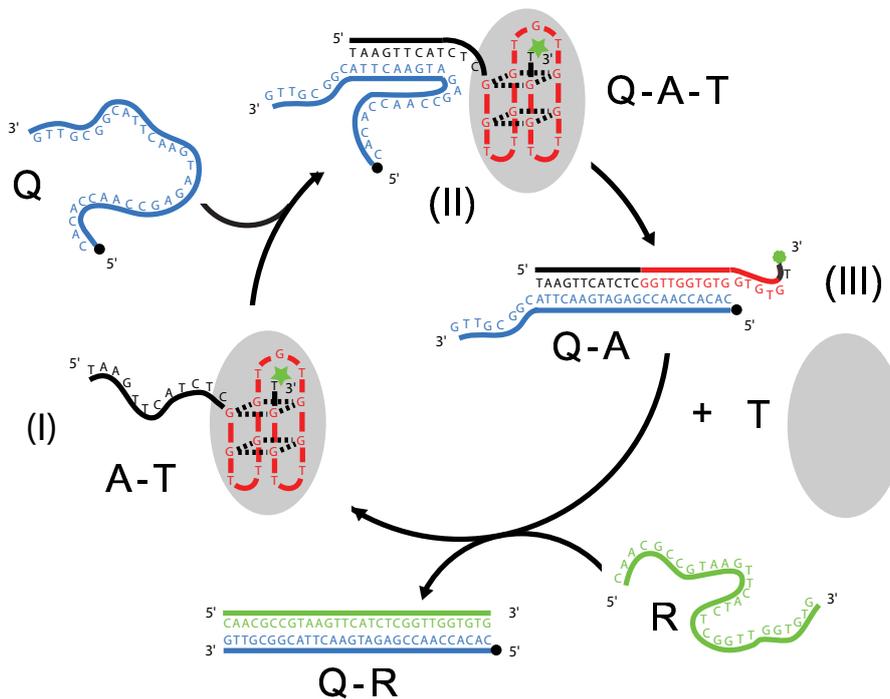


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des Operationszyklus der aptamerbasierten molekularen Maschine in Gegenwart von Thrombin (Erklärung siehe Text). Die Sequenzen der Stränge A, Q und R sind angegeben.

untersucht: durch FRET-Experimente mit variiertem DNA-Aptamer- und Thrombinkonzentration, anschließend bei unterschiedlichen Temperaturen sowie in Fluoreszenzkorrelationspektroskopie-Messungen. Zur Analyse der Messergebnisse wird in Kapitel 4.1.4 ein Modell der möglichen Teilschritte der Reaktion aufgestellt, durch dessen numerische Simulation in Kapitel 5.3.4 typische experimentelle Fluoreszenzverläufe reproduziert werden.

Die Maschine basiert auf der 15 Basen langen DNA-Sequenz 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3', die mit einer Dissoziationskonstante von 3-450 nM [46] stark an  $\alpha$ -Thrombin bindet (siehe Kapitel 2.1.3). In der Gegenwart von Kalium-Ionen nimmt dieses Aptamer eine Konformation an, die durch zwei aufeinandergestapelte Guanin-Quadruplex-Strukturen charakterisiert ist. Eine Röntgenstruktur des Aptamer-Thrombin-Komplexes zeigt Abb. 3.11.

### Funktionsprinzip

Um die Maschine zu konstruieren, wurde dem Aptamer am 5'-Ende eine zwölf Basen lange „Haltepunkt“-Sektion hinzugefügt, mit der die Maschine angesteuert werden kann. Das 5'-Ende wurde gewählt, um nicht mit Thrombin-Bindungsstellen in Konflikt zu geraten [93]. Durch Schmelzkurvenexperimente, in denen der Temperaturverlauf der Absorption gemessen wurde, wurde überprüft, dass die Aptamermaschine (A) in der Gegenwart von  $K^+$ -Ionen tatsächlich ihre G-Quartettstruktur annimmt [27]. Der Arbeitszyklus der Maschine ist in

Abbildung 3.12 dargestellt. Nach Zugabe von Thrombin (T) bindet Strang A an das Protein ((I) in Abb. 3.12). Durch Zugabe eines „öffnenden“ Stranges Q streckt sich die DNA-Maschine zu einer Duplex-Struktur A-Q aus, die T nicht mehr binden kann (III). Q ist komplementär zur Haltepunkt-Sektion sowie den ersten 10 Basen der Aptamersequenz und hat zusätzlich eine 8 Basen lange Sequenz am 3'-Ende, die als Angriffspunkt für den vollständig komplementären „Entfernungsstrang“ R dient. Q wurde nicht vollständig komplementär zu A gewählt, da R sonst die gesamte Aptamersequenz enthalten würde und selbst Thrombin binden könnte. Die Ablösung von Q durch R versetzt die Maschine in ihre Ausgangskonformation zurück (I), in der sie erneut T bindet.

### Präparation der Aptamermaschine

Die DNA-Sequenzen für A, Q und R sind in Abb. 3.12 gezeigt: Die Farbstoffmarkierung am 3'-Ende von A ist Oregon Green 488 (Molecular Probes, Oregon, USA). Die Farbstoffmarkierung am 5'-Ende von Q ist TAMRA (5(6)-Carboxytetramethylrhodamin). Alle Oligonukleotide wurden von biomers.net, Ulm synthetisiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von Sigma-Aldrich, Deutschland bezogen und unverändert verwendet. Der in allen Experimenten (soweit nicht anders angegeben) verwendete Puffer war ein modifizierter physiologischer Puffer bestehend aus 20 mM Tris HCl, 140 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM KCl bei pH 8.5.

## 3.3 Gelelektrophorese und Absorptionsspektroskopie an DNA

Die Elektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Stücken entsprechend ihrer unterschiedlichen Länge. Die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgt innerhalb eines festen Trägermaterials, des Gels. Agarose und Polyacrylamid sind die beiden hauptsächlich verwendeten Materialien. Die Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats der Nukleinsäuren sind negativ geladen, daher wandert die DNA in Richtung Anode. Bei DNA ist die Ladungsdichte konstant, das Verhältnis von Molekulargewicht zu Ladung bleibt bei unterschiedlicher langen DNA-Fragmenten gleich.

### 3.3.1 Physikalische Grundlagen der Gelelektrophorese

Ein geladenes Objekt stört die Verteilung der in der Lösung enthaltenen Ionen. Dies kann man so beschreiben, dass eine Wolke von Gegenionen auf dem geladenen Objekt kondensiert. Die Gleichgewichtsverteilung der mobilen Ionen kann mit Hilfe der Poisson-Boltzmann-Gleichung ermittelt werden. Die Debye-Hückel-Theorie ist eine linearisierte Form dieser Gleichung und ist für unsere Betrachtungen ausreichend. Nach der Debye-Hückel-Theorie werden externe Felder durch die Gegenionen im Elektrolyten abgeschirmt. Die Abschirmung wird durch ein Potential  $V_s(x)$  beschrieben:

$$V_s(x) = V_0 e^{-x/l_D} \quad (3.8)$$

hierbei ist  $V_0$  das maximale Abschirmpotential und  $l_D$  die Debye-Abschirmlänge:

$$l_D = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T}{2 \cdot 10^3 e^2 N_A c}} \quad (3.9)$$

und  $c$  die Konzentration der einwertigen Ionen in mol/l.

Wenn nun ein externes elektrisches Feld angelegt wird, wird dadurch eine Kraft auf das geladene Objekt ausgeübt, aber auch auf die Ionen, die es umgeben. Die Gegenionenwolke von der Dicke einer Debye-Länge wird genau in die entgegengesetzte Richtung wie das Objekt gezogen und beeinflusst dessen Bewegung hydrodynamisch. Im Fall, dass  $l_D$  viel größer als das Objekt ist, ist im Gleichgewicht die elektrische Kraft gleich der Stokes'schen Reibung und ein kugelförmiges Objekt bewegt sich mit der „Driftgeschwindigkeit“:

$$v = \frac{q \cdot E}{6\pi\eta r} \quad (3.10)$$

$q$  und  $r$  sind Ladung und Radius des Objekts,  $E$  die Stärke des elektrischen Feldes und  $\eta$  ist die Viskosität des Mediums. Die elektrophoretische Mobilität  $u$  ist in diesem Fall:

$$u = v/E = q/6\pi\eta r \quad (3.11)$$

Im Fall, dass  $l_D$  viel kleiner als das Objekt ist, muss man die Navier-Stokes-Gleichung lösen. Die Geschwindigkeit wird nach Smoluchowski unabhängig von Größe und Gestalt des Objekts und es gilt für die sogenannte elektroosmotische Mobilität [94]:

$$u = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (3.12)$$

mit dem Zeta-Potential  $\zeta$ , das das Potential an der Abschergrenze darstellt, von wo einzelne Gegenionen aus der Wolke durch Reibung abgeschert werden. Im Debye-Hückel-Grenzfall, kann die elektroosmotische Mobilität als Funktion der Oberflächenladungsdichte  $\sigma$  ausgedrückt werden:

$$u = \frac{l_D \sigma}{4\pi\eta} \quad (3.13)$$

Die bereits angesprochene Unabhängigkeit von Größe und Form der Mobilität eines geladenen Objekts in der Smoluchowski-Theorie hat wesentliche Konsequenzen für die elektrophoretische Auftrennung. Die Smoluchowski-Gleichung beschreibt die relative Bewegung der geladenen Oberfläche des Objekts und der sie umgebenden Flüssigkeit unter Berücksichtigung der Gegenionen. Sie gilt ebenso für die Bewegung des Elektrolyten in der Nähe einer unbeweglichen, geladenen Oberfläche unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes, dieser Effekt wird als Elektroosmose bezeichnet. Gleichung 3.12 beschreibt auch die Mobilität eines geladenen Polymers wie DNA in Lösung, so dass eine Elektrophorese in freier Lösung nicht geeignet ist, um DNA-Fragmente nach unterschiedlicher Länge aufzutrennen.

Durch welchen „Trick“ kann man nun Oligonukleotide doch elektrophoretisch auftrennen? Indem man die Elektrophorese in einem Gel ablaufen lässt. Dadurch wird die freie Bewegung des geladenen Polymers eingeschränkt. Diese kann nun durch das Modell der gerichteten Reptation (englisch: biased reptation, Reptation = schlangenartige Bewegung) beschrieben werden. Das biased-reptation-Modell (BRM) liefert folgendes Verhalten für die Mobilität:

$$u/u_0 \approx \frac{1}{3} \left( \frac{1}{N} + \frac{\epsilon^2}{3} \right) \quad (3.14)$$

hierbei ist  $u_0$  die Mobilität in freier Lösung,  $N$  ist die Kettenlänge des Polymers und  $\epsilon$  entspricht einem reduzierten elektrischen Feld und hängt u. a. von der Porengröße des verwendeten Gels ab [95]. Für kleine  $N$  dominiert der erste Term in Gleichung 3.14 und die Mobilität

ist proportional zu  $N^{-1}$ , während für große  $N$  der zweite Term ( $\propto \frac{e^2}{9}$ ) dominiert, der von der Feldstärke (und der Porengröße) abhängt. Den ersten Bereich bezeichnet man als „unorientierte“ Reptation, weil die Brownsche Bewegung überwiegt, welche von der Polymerlänge abhängt, und den zweiten als orientierte Reptation (durch das externe Feld orientiert). Durch geeignete Wahl der Porengröße des Gels und der angelegten Feldstärke ist es dem Experimentator also möglich, den Bereich der unorientierten Reptation für seinen Polymerlängenbereich einzustellen, so dass er Polymere konstanter Ladungsdichte nach ihrer Länge auftrennen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Gele aus dem hochvernetzten Polymer Polyacrylamid verwendet, da diese zur Untersuchung der verwendeten kurzen Oligonukleotide und Devices am besten geeignet sind. Zur Sichtbarmachung werden die Moleküle anschließend angefärbt. Wie wir gesehen haben, kann von der Laufweite eines Oligonukleotids direkt auf seine relative Masse geschlossen werden. Außerdem kann man Aussagen darüber machen, ob zwei Einzelstränge miteinander hybridisieren, unter Umständen sogar, in welchem Umfang, oder nicht. Berücksichtigen muss man, dass die Geometrie eines Oligonukleotids eine Rolle spielt: Zwei Stränge mit gleicher Masse können eine unterschiedliche Struktur einnehmen (z.B. Hairpin oder Faden) und somit unterschiedlich weit laufen.

### 3.3.2 Durchgeführte Gelelektrophoresen

#### DNA-Tweezers

Die nicht denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese in Abb. 5.2 wurde in einem 10% nativen Gel in  $1\times$ TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA, pH 8.5,  $5\times$ Konzentrat von Eppendorf) über eine Stunde bei einem Feld von 10 V/cm bei 20° C durchgeführt. Als DNA Leiter wurde die „Low Molecular Weight DNA Ladder“ (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA) verwendet. Das Gel wurde mit dem nukleinsäurefärbenden Farbstoff SYBR gold (Molecular Probes/Invitrogen) gefärbt.

Die Gelelektrophorese in Abb. 5.3 wurde in 9% Polyacrylamidgel unter Verwendung von TBE als Laufpuffer bei 10 V/cm über 2 Stunden durchgeführt.

#### Nanogold-DNA-Stepper

Die Gelelektrophoresen in Abb. 5.9 und Abb. 5.10 wurde jeweils in 12% Polyacrylamidgel unter Verwendung von TBE als Laufpuffer bei 10 V/cm über 80 bzw. 60 Minuten durchgeführt. Gefärbt wurden die Gele mittels SYBR gold.

#### Schaltbares Thrombin-Aptamer

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde in einem 15% nativen Gel in Tris-Borat (TB)-Puffer (89 mM Tris HCl, 89 mM Borsäure) mit 10 mM KCl durchgeführt und lief 1.5 h bei einem Feld von 10 V/cm bei 20°C. Die Gele wurden mit SYBR gold gefärbt. Thrombin selbst fluoresziert nicht und wird vom Farbstoff nicht gefärbt.

### 3.3.3 Absorptionsspektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Bereich

#### Konzentrationsbestimmung

Die Purine und Pyrimidine in Nukleinsäuren absorbieren UV-Licht. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Energie, die bei einer bestimmten Wellenlänge absorbiert wird, abhängig von der Konzentration des absorbierenden Materials:

$$I_{\text{tr}} = I_0 \cdot 10^{-\epsilon dc} \quad (3.15)$$

$I_{\text{tr}}$  ist die Intensität des transmittierten Lichts,  $I_0$  die des einfallenden Lichts,  $\epsilon$  der molare Extinktionskoeffizient (in  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $d$  die optische Weglänge durch die Probe in Zentimetern und  $c$  die Konzentration (in mol/l). Die von einem UV Spektrometer gemessene Absorption  $A$  einer Probe ist definiert als Zehnerlogarithmus der einfallenden durch die transmittierte Intensität:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon dc \quad (3.16)$$

sowohl  $A$  als auch  $\epsilon$  sind Funktionen der Wellenlänge  $\lambda$ . Mit dieser Definition der Absorption ist deren Einheit OD (optical density).

Nukleinsäuren haben bei 260 nm ein Absorptionsmaximum, welches aus einer Superposition von Intra-Ebenen-Übergängen ( $\pi - \pi^*$ ) zwischen  $\pi$ -Elektronen der Basen resultiert. Die Gesamtabsorption eines Oligonukleotids hängt von der Summe der Absorptionen einzelner Nukleotide sowie dem Effekt der Wechselwirkungen zwischen den Nukleotiden ab. Aufgrund dieser Wechselwirkungen absorbiert ein Einzelstrang weniger stark als die Summe seiner Nukleotide und ein Doppelstrang weniger stark als die zwei Einzelstränge. Dieser Effekt wird als Hypochromizität (auch Hypochromie) bezeichnet.

Verwendet man eine Quarzküvette von 1 cm Innendurchmesser, und misst eine Absorption von 1 OD, so kann man abschätzen, dass die Lösung etwa  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  doppelsträngiger DNA bzw.  $33 \mu\text{g}/\text{ml}$  einzelsträngiger Oligonukleotide enthält [96]. Es ist außerdem zu beachten, dass die Extinktionskoeffizienten von der Ionenkonzentration und dem pH der Lösung abhängen. Erstere sollte gering sein und der pH sorgfältig kontrolliert werden, um optimale Ergebnisse zu erhalten. Kennt man das Molekulargewicht  $M_{\text{W}}$  in g/mol eines Einzelstrangs, so kann nun dessen Konzentration berechnet werden:

$$c = \frac{A_{\text{meas}} \cdot 33}{M_{\text{W}}} \times 10^3 \frac{\text{mol}}{\text{l}} \quad (3.17)$$

Die Absorptionmessungen im UV- (DNA-Konzentration) und sichtbaren (zur Bestimmung der Absorptionsspektren von Farbstoffen) Bereich wurden mit dem UV-Vis Spectrophotometer V-550 (Jasco, Groß-Umstadt) durchgeführt. Alle in dieser Arbeit gezeigten Absorptionsspektren wurden hiermit gemessen.

#### UV-Schmelzkurven

Da sich beim Aufbrechen einer Doppelhelix oder beim Aufbrechen einer G-Quartettstruktur die Absorption ändert (Hypochromizität), kann in UV-Absorptionsexperimenten auch die Schmelztemperatur  $T_{\text{m}}$  von den genannten DNA Strukturen bestimmt werden. Dazu wird die Absorption an einer bestimmten Wellenlänge während einer gleichmäßigen Variation der Temperatur aufgezeichnet. Die in Abb. 5.3.2 gemessene UV-Schmelzkurve wurden auf dem Absorptionsspektrometer V-550 aufgenommen, das für diesen Zweck zusätzlich mit einem Peltier-Thermostat-Probenhalter ausgestattet wurde.

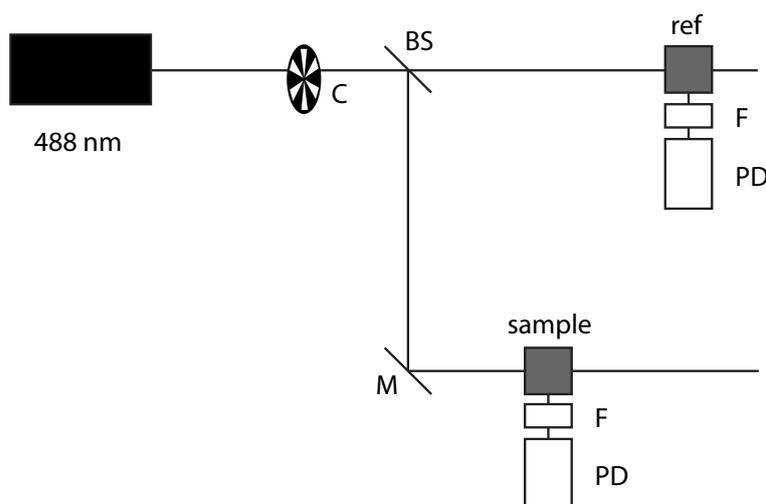


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des Messaufbaus, mit dem FRET-Experimente am Thrombin-Aptamer durchgeführt wurden. Das Licht des Ar-Ion-Lasers wird durch einen Chopper (C) moduliert und in einem Strahlteiler (BS) auf die Probe und eine Referenzprobe (ref) geleitet. Von dort wird das emittierte Licht jeweils durch einen Bandpassfilter (F) geleitet und von einer Si-Photodiode (PD) detektiert. Anschließend werden diese Signale vorverstärkt und in einem Lock-In-Verstärker weiterverstärkt (nicht gezeigt).

## 3.4 Optische Experimente an fluoreszenzmarkierter DNA

### 3.4.1 Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-Messungen am optischen Tisch

Als Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) bezeichnet man die Übertragung der Energie des angeregten Zustands eines Donors (D) auf einen Akzeptor (A). Das Donor-Molekül emittiert typischerweise bei kürzeren Wellenlängen (als der Akzeptor), die mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Der Energietransfer geschieht ohne Auftreten eines Photons und ist das Ergebnis einer coulombschen Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Die Energietransferrate hängt vom spektralen Überlapp, der Orientierung von Donor und Akzeptor zueinander und dem Abstand der beiden ab. Auf den theoretischen Hintergrund von FRET wird in Kapitel 4.2 eingegangen. Die Abstandsabhängigkeit von FRET begründet seine weitverbreitete Anwendung, um Abstände zwischen Donor- und Akzeptor-Paaren zu messen [97]. Um den Operationszyklus der Aptamermaschine in Echtzeit zu verfolgen, wurden FRET-Experimente am optischen Tisch durchgeführt (Abb. 5.20 und 5.21 in Kapitel 5.3.3).

Der verwendete Messaufbau ist schematisch in Abb. 3.13 dargestellt. Die Fluoreszenz wurde mit einem Argon-Ionen-Laser ( $\lambda=488$  nm, 25 mW, Laser Physics, Milton Green, UK) angeregt, dessen Intensität anschließend durch einen Chopper (HMS Light Beam Chopper 220) mit 213 Hz moduliert wurde, und mit einer Si-Photodiode durch einen 10 nm Bandpassfilter mit Zentrumswellenlänge 514.5 nm detektiert. Zur Kontrolle der Laserstabilität wurde eine Referenzprobe über einen Strahlteiler ebenfalls durch das Laserlicht angeregt und das Fluoreszenzsignal durch eine entsprechende Bandpassfilter-Photodiode-Anordnung detektiert. Die Signale der Photodioden wurde über jeweils einen Vorverstärker (DLPCA-200, Femto, Berlin

und SR 570, Stanford Research Systems, Sunnyvale, CA, USA) an einen Lock-In-Verstärker geleitet (SR 530, Stanford Research Systems). Durch den Einsatz der Lock-In-Technik wird ein besseres Signal-zu-Rausch Verhältnis erzielt als es ohne Modulation des konstanten Anregungslichts möglich wäre. Die Signale aus dem Lock-In-Verstärker wurden über eine A/D-Wandler-PCI-Karte (National Instruments, Austin, TX, USA) digitalisiert und auf einem handelsüblichen PC mittels LabVIEW (National Instruments) aufgezeichnet.

Die Temperatur wurde mit einem Thermostat konstant bei 25°C gehalten. Die Konzentration von Strang A war in allen Fällen 1µM, andere Stränge wurden stöchiometrisch hinzugefügt. Thrombin wurde in fünffachem Überschuss zu A zugegeben.

### 3.4.2 Fluoreszenzanisotropie-Messungen

Wird eine Probe mit polarisiertem Licht angeregt, beobachtet man häufig, dass die Emission ebenfalls polarisiert erfolgt. Das Maß der Polarisation der Emission wird als Anisotropie  $r$  angegeben [98, Kapitel 10]. Die Ursache der polarisierten Emission basiert auf der Existenz von Übergangsmomenten für Absorption und Emission, die entlang spezifischer Richtungen innerhalb der Fluorophorstruktur liegen. In homogenen Lösungen sind die Fluorophore, die sich im Grundzustand befinden, alle zufällig orientiert. Beim Einfall des polarisierten Lichts werden nun die Farbstoffe bevorzugt angeregt, deren Absorptions-Übergangsmomente entlang dem elektrischen Vektor des einfallenden Lichts orientiert sind. Entsprechend ist die Population der Fluorophore im angeregten Zustand nicht zufällig orientiert. Depolarisierung der Emission kann nun aufgrund mehrerer Phänomene auftreten, deren relative Bedeutung von der Probe abhängt, die untersucht wird. Ein Hauptgrund für Depolarisierung liegt in der Rotations-Diffusion der Farbstoffe. Anisotropiemessungen ermitteln die durchschnittliche Winkelbewegung des Fluorophors, die zwischen Absorption und anschließender Emission eines Photons auftritt. Die Anisotropie ist definiert als

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (3.18)$$

Da die Anisotropie gleich der Differenz der beiden unterschiedlich polarisierten Komponenten normiert durch die Gesamtintensität  $I_{\text{total}} = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$  ist, hängt sie nicht von der Gesamtintensität der Probe ab und ist eine dimensionslose Größe. Die Gesamtintensität ist nicht  $I_{\parallel} + I_{\perp}$ , wie man vielleicht denken könnte, da wir drei Raumrichtungen zu berücksichtigen haben, von denen eine parallel gelegt werden kann, und die beiden anderen folglich senkrecht dazu liegen. Die Hauptursache der Fluoreszenzdepolarisierung ist wie bereits gesagt die Brownsche Bewegung der fluoreszierenden Objekte.

#### Brownsche-Rotationsbewegung

Da sich die fluoreszierenden Moleküle frei in der Lösung bewegen können, unterliegen sie der Brownschen Bewegung und drehen sich im Laufe der Zeit um einen Winkel  $\beta$  um eine beliebige Molekülachse. Für den Winkel  $\beta$  gilt dabei:  $\langle \beta^2 \rangle = 2D_{\text{R}}t$ ,  $D_{\text{R}}$  ist der Rotationsdiffusionskoeffizient. Man kann zeigen, dass der zeitliche Verlauf der Anisotropie  $r(t)$  unter Erfüllung der Rotationsdiffusionsgleichung durch einen exponentiellen Abfall gegeben ist [99, Kapitel II-4]:

$$r(t) = r_0 e^{-6D_{\text{R}}t} \quad (3.19)$$

mit der grundlegenden Anisotropie  $r_0 = (3 \cos^2 \alpha - 1)/5$ , die bei einem festen Winkel  $\alpha$  zwischen Absorptions- und Emissionsdipolen vorliegt. Wenn man Gleichung 3.18 umschreibt:

$$r = \frac{\int_0^\infty I(t)r(t)dt}{\int_0^\infty I(t)dt} \quad (3.20)$$

und einen exponentiellen Abfall der Intensität  $I(t)$  mit Lebensdauer  $\tau$  annimmt, kann man durch Einsetzen von Gleichung 3.19 in Gleichung 3.20 leicht die Perrin-Gleichung herleiten:

$$r = r_0 \frac{1}{1 + 6D_R\tau} \quad (3.21)$$

$\tau$  ist hierbei die Fluoreszenzlebensdauer und  $D_R$  der Rotationsdiffusionskoeffizient. Durch diese Gleichung wird die Fluoreszenzdepolarisation aufgrund von Rotationsdiffusion für den Fall kugelförmiger Objekte beschrieben. Falls die Rotationskorrelationszeit  $\tau_{\text{rot}} = (6D_R)^{-1}$  viel größer als die Fluoreszenzlebensdauer ist ( $\tau_{\text{rot}} \gg \tau$ ), ist die gemessene Anisotropie  $r$  gleich der grundlegenden Anisotropie  $r_0$ . Falls die Rotationskorrelationszeit viel kürzer als die Lebenszeit ist ( $\tau \ll \tau_{\text{rot}}$ ) ist die gemessene Anisotropie gleich Null. Die Rotationskorrelationszeit und damit auch der Rotationsdiffusionskoeffizient sind abhängig von der Viskosität des Lösungsmittels  $\eta$ , dem Molekularvolumen  $V_r$ , der Gaskonstanten  $R$  und der Temperatur  $T$ :

$$\tau_{\text{rot}} = \frac{\eta V_r}{RT} \quad (3.22)$$

Wir können  $\tau_{\text{rot}}$  für Thrombin näherungsweise berechnen, wenn wir das Kugelvolumen durch  $V_r = M_r/\bar{\rho}$  (Molekulargewicht von Thrombin  $\sim 36000$  g/mol geteilt durch die mittlere Dichte von Proteinen  $\sim 1.33$  g/ml) ersetzen und  $T = 293\text{K}$ ,  $\eta \approx 1\text{mPa}\cdot\text{s}$  sowie  $R = 8.3 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$  verwenden. Mit diesen Werten erhalten wir eine Rotationskorrelationszeit von etwa 11 ns und einen Rotationsdiffusionskoeffizienten von  $D_R \approx 1.5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ . Häufig findet man, dass die gemessenen Werte für  $\tau_{\text{rot}}$  etwa das Doppelte der berechneten betragen. Dies kann zumindest teilweise dadurch erklärt werden, dass die Proteine hydratisiert sind. Ausserdem erfüllt praktisch kein Protein die Annahme der Kugelförmigkeit exakt. Die Lebensdauern typischer Fluoreszenzfarbstoffe liegen im Bereich weniger Nanosekunden, so dass zeitliche Änderungen der Anisotropie tatsächlich gemessen werden können.

Vergleichen wir die Rotationskorrelationszeit von Thrombin mit der des Thrombin-Aptamers, welches inklusive Haltepunktsequenz aus 28 Basen besteht und laut Hersteller ein Molekulargewicht von  $M_r = 8940\text{g/mol}$  hat, so können wir davon ausgehen, dass dieses ein deutlich kleineres Volumen einnimmt. (Diese Annahme wird spätestens durch die experimentelle Bestimmung der hydrodynamischen Radien in Kapitel 5.3.4 gerechtfertigt und behält ihre Gültigkeit auch in dem Fall, dass das Aptamer teilweise mit dem öffnenden Strang Q hybridisiert ist.) Somit ist nach Gleichung 3.22 die Rotationskorrelationszeit für das Thrombin-Aptamer kleiner als die von Thrombin und nach Gleichung 3.19 die Anisotropie  $r$  im ersten Fall ebenfalls kleiner als im zweiten. Deshalb sind Messungen der Fluoreszenzanisotropie  $r$  für uns die Methode der Wahl, um das Binden und Freigeben von Thrombin durch die Aptamermaschine direkt zu beobachten. Die Messung der Fluoreszenzanisotropie ist schematisch in Abb. 3.14 dargestellt. Der verwendete Messaufbau ist in Abb. 3.15 gezeigt. Das von einem Ar-Ion Laser kommende Licht der Wellenlänge von 488 nm wird durch einen Glan-Thompson-Polarisator (GT) linear polarisiert und regt im Probenvolumen Fluoreszenz an. Die parallel

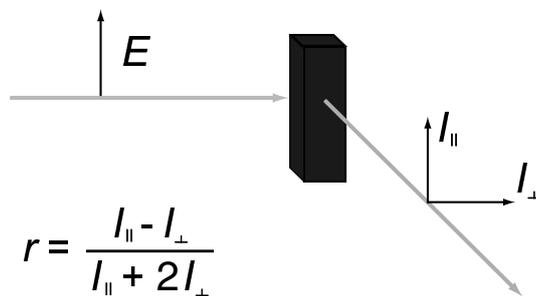


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der Messung der Fluoreszenzanisotropie

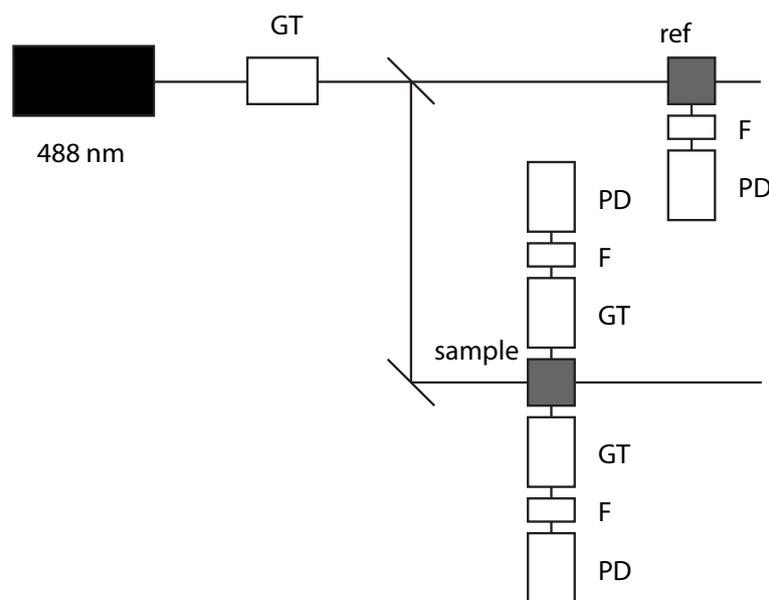


Abbildung 3.15: Verwendeter Messaufbau zur Bestimmung der Fluoreszenzanisotropie  $r$ . Von einem Ar-Ion Laser emittiertes Licht mit  $\lambda = 488 \text{ nm}$  wird durch einen Glan-Thompson-Polarisator (GT) linear polarisiert und trifft über einen Strahlteiler auf eine Referenzprobe (ref) und auf die Messprobe (sample). Die parallel und die senkrecht polarisierte Komponente  $I_{||}$ ,  $I_{\perp}$  der dort emittierten Fluoreszenzintensität werden durch zwei Glan-Thompson-Analysatoren getrennt und anschließend jeweils durch einen Bandpassfilter (F) mittels einer Photodiode (P) detektiert.

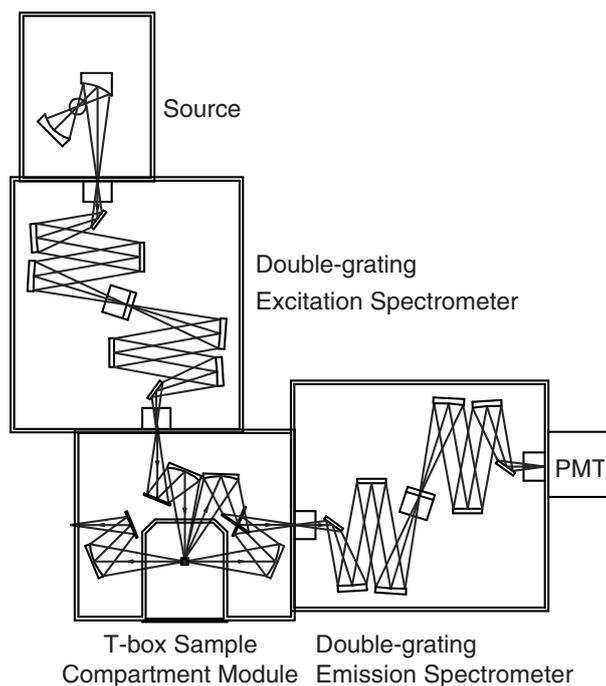


Abbildung 3.16: Aufbau des Fluorolog<sup>®</sup> 3 Modell FL3-22 Spektrofluorometers

und die senkrecht polarisierte Komponente  $I_{\parallel}$ ,  $I_{\perp}$  der Fluoreszenzintensität werden durch zwei Glan-Thompson-Analysatoren im T-Format getrennt. Die Intensitäten der beiden Komponenten werden schließlich durch einen Bandpassfilter (F) mittels einer Si-Photodiode (P) bestimmt. Um Schwankungen der Laserintensität korrigieren zu können, wird gleichzeitig die Fluoreszenzemission einer Referenzprobe auf dieselbe Weise bestimmt. Um das Signal-zu-Rausch Verhältnis zu optimieren, wurde wieder die Lock-in-Messtechnik verwendet (siehe Abschnitt 3.4.1).

### 3.4.3 Hochauflösendes Fluoreszenzspektrometer

#### Transfereffizienzmessungen am Tweezersensemble

Die Messung in Abb. 5.1 (Kapitel 5.1.1) wurde an einem hochauflösenden Fluoreszenzspektrometer Fluorolog<sup>®</sup> 3 Modell FL3-22 (Horiba Jobin-Yvon, Longjumeau, Frankreich) durchgeführt (siehe Abb. 3.16). Als Messprozedur wurde ein „Multigroup“-Experiment gewählt. Dabei wird bei jeder Messrunde zunächst der Farbstoff Atto-532 durch eine 450 W Xenon Lampe angeregt, deren Emission durch einen Gittermonochromator auf  $\lambda = 488$  nm gefiltert wurde. Die Fluoreszenz-Emission von Atto-532 wurde durch einen zweiten Monochromator bei  $\lambda = 552$  nm gefiltert und von einem Photomultiplier detektiert. Die optischen Schlitze der Anregungs- und der Emissionsfilter wurden auf 1 nm bzw. 5 nm Bandbreite eingestellt, d. h. die Wellenlängen  $488 \pm 0.5$  nm bzw.  $552 \pm 2.5$  nm werden durchgelassen. Beim zweiten Schritt jeder Messrunde wird wiederum der Donor angeregt, diesmal aber die Emission des Akzeptors bei 666 nm gemessen. Die Fluoreszenzintensität wurde für jeden Datenpunkt über 0.1 s integriert. Während der gesamten Messzeit wurde der Inhalt der Probenküvette mittels

einem Minimagnetrührer konstant gemischt und die Temperatur wurde durch das Peltier-element F3004 auf 25° C geregelt. Die Konzentration der DNA-Stränge betrug 50 nM und der Puffer enthielt 1 M NaCl. Die Treibstoffstränge  $F$  und  $\bar{F}$  wurden äquimolar als kleines Volumen (ca. 0.5% des Probenvolumens) zugegeben. Die Daten wurden mittels der DataMax Software aufgezeichnet, die vom Hersteller des Fluorometers mitgeliefert wird. Zur weiteren Analyse der Daten wurde Igor Pro verwendet (Wave Metrics, Portland, OR, USA).

#### Fluoreszenzmessungen an den Gold-Nanopartikel–DNA-Tweezers

Bei dieser Messung (siehe Abb. 5.8, Kapitel 5.2.1) wurde der Farbstoff Oregon Green bei 488 nm angeregt und bei 520 nm detektiert, jeweils mit 5 nm Bandbreite. Die Fluoreszenzintensität wurde für jeden Datenpunkt über 1 s integriert. Die Temperatur war konstant auf 25°C eingestellt. Die Konzentration der DNA Stränge betrug 200 nM, Schaltstränge wurden äquimolar zugegeben und das Probenvolumen wurde konstant durchmischt.

#### Fluoreszenzmessungen am Gold-Nanopartikel–DNA-Stepper

Die Messungen (Abb. 5.12 und 5.13 in Kapitel 5.2.2) wurden jeweils bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (1 nm Bandbreite) und einer Emissionsdetektion bei 530 nm (5 nm Bandbreite) für den Farbstoff Rhodamin Green durchgeführt. Die Integrationszeit betrug für jeden Messpunkt 1 s, Die Temperatur wurde durch das Peltierelement konstant geregelt. Die Konzentration lag bei  $c_{\text{DNA}} = 500$  nM für den Stepper und die zugegebenen Stränge. Bereits zuvor waren Nanogold-Partikel in dreifachem Überschuss mit dem Devicestrang zur Reaktion gebracht worden. Der verwendete TE-Puffer enthielt 1 M NaCl. Die Nanogold Partikel lagen zunächst nur in einer relativ geringen Gesamtmenge vor. Um nicht bei extrem niedrigen Konzentrationen zu messen, wurde in einer Küvette mit geringem Volumen ( $V \sim 200 \mu\text{l}$ ) gearbeitet, wodurch kein konstantes Durchmischen der Probe mehr möglich war. Stattdessen wurden Schaltstränge nach dem Zugeben mit Hilfe der Pipette mit dem Probeninhalt vermischt.

Für die Messungen mit und ohne CTAB (Abb. 5.1) wurde ebenfalls bei kleinen Volumina gearbeitet, es wurden nur zu den angegebenen Zeitpunkten Emissionsspektren (485-650 nm) aufgenommen. Zu diesem Zweck wurde bei 468 nm angeregt. In dem Diagramm aufgetragen ist der Wert des Emissionsmaximums bei 532 nm. Die Bandbreite betrug bei Anregung und Detektion jeweils 5 nm. Um eine bessere Durchmischung zu erhalten, wurde die Küvette nach dem Zugeben eines DNA-Strangs kurz „gevortext“. Die Temperatur wurde die ganze Zeit bei 20°C gehalten. Der Puffer enthielt 1 M NaCl und die Konzentration an DNA betrug 250 nM für alle Stränge, Nanogold war wiederum im dreifachen Überschuss vorhanden.

#### Kinetik der Aptamermaschine

Die FRET-Experimente zur detaillierten Untersuchung der Kinetik der Aptamermaschine (Kapitel 5.3.4, Abb. 5.25a, 5.26a, 5.27 und 5.29) wurden hauptsächlich auf dem Fluorolog-322 durchgeführt. Oregon Green 488 wurde bei 488 nm angeregt und die Emission bei 518 nm detektiert bei einer Bandbreite von jeweils 5 nm. Die Temperatur wurde auf den bei den Experimenten angegebenen Wert eingestellt und der Inhalt der Probenküvetten konstant gemischt. Die Konzentration der Aptamermaschine betrug 1  $\mu\text{M}$  in der ersten und 50 nM in der zweiten Versuchsreihe. Thrombin wurde im angegebenen Verhältnis (kein Thrombin, im

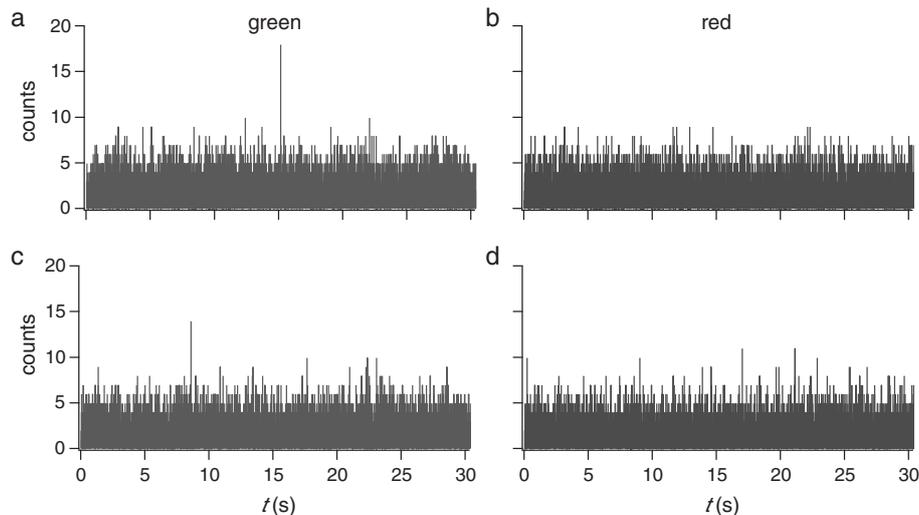


Abbildung 3.17: Fluoreszenzmessungen an den DNA-Tweezers im RAW-Modus des ConfoCor 2: a) detektierte Counts im grünen Kanal (offene Tweezers), b) Counts im roten Detektionskanal (offene Tweezers), c) und d) zeigen die Counts in den entsprechenden Kanälen bei den Tweezers in der geschlossenen Konfiguration. Die Counts wurden jeweils über 5 ms gesammelt.

Verhältnis 1:5, 1:1 und 5:1) zur Aptamermaschine zugegeben und eine Stunde lang inkubiert, bevor die Experimente gestartet wurden. Der Treibstoffstrang  $F$  wurde dann in Stöchiometrie zum Aptamer zugegeben. Die Fluoreszenzintensität wurde für jeden Datenpunkt über eine Sekunde integriert.

## 3.5 Konfokale Fluoreszenzmessungen

### 3.5.1 Fluoreszenzmessungen an einzelnen Molekülen bzw. Farbstoffpaaren

#### Versuch von Einzelmolekülmessungen mit dem Zeiss ConfoCor 2

Da mit dem kommerziellen LSM 510 / ConfoCor 2-Aufbau (siehe Kapitel 3.5.2) ein sensitiver Messaufbau mit Zweikanal-Anregung und -Detektion zur Verfügung stand, wurde der Versuch unternommen, mit diesem Aufbau Einzelmolekülfloreszenzmessungen an den DNA-Tweezers durchzuführen. Die verwendeten Tweezers entsprechen den in Referenz [30] verwendeten, nur dass als FRET-Donor der Farbstoff TAMRA und als Akzeptor der Farbstoff Cy5 (Amersham / GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) verwendet wurde. Da der ConfoCor 2-Aufbau mit zwei Avalanche-Photodioden (APD) ausgestattet ist, können einzelne Photonen detektiert werden. Die Dunkelzählrate kann allerdings eine kritische Größe darstellen, laut Hersteller ist sie kleiner als 250 Hz. Das „Standardmessverfahren“ ist zur Detektion einzelner „Photonenbursts“ nicht geeignet, da die einzelnen Messwerte gleich korreliert werden. Es besteht aber die Möglichkeit, die Messdaten in einem RAW-Format zu speichern, so lange nicht zu viele Photonen detektiert werden. Diese wurden anschließend in einem einfachen selbstgeschriebenen IGOR-Skript ausgewertet (siehe Anhang). Es wurden folgende Filter verwendet: Der Hauptfarbteiler 514 (Dichroischer Spiegel), um die Laseranregung einzukoppeln, aber in

die Detektionskanäle nur Licht mit Wellenlängen  $> 514$  nm durchzulassen, der Nebenfarbteiler 635, um das emittierte Licht auf die beiden Detektoren aufzuteilen, im „Tamra-Kanal“ ( $< 635$  nm) wurde vor der APD ein Bandpassfilter 530-600 verwendet, im „Cy5-Kanal“ ein Langpass 650, der Wellenlängen größer 650 nm passieren lässt. Somit ist die Optik gut auf die verwendeten Farbstoffe abgestimmt, deren Emissionsmaxima bei etwa 580 nm (Tamra) bzw. 667 nm (Cy5) liegen. Die Konzentration der DNA-Einzelstränge betrug 50 pM.

Abb. 3.17 zeigt mit dem ConfoCor 2 im RAW-Modus aufgenommene Fluoreszenzmessungen in den beiden Detektionkanälen jeweils für die offene und die geschlossene Konfiguration der Tweezers. Für diese Messungen wurde jeweils 30 Sekunden lang gemessen und anschließend die Daten aus dem RAW-Format ausgelesen. Die Counts wurden für einen Messpunkt jeweils 5 ms gesammelt. Man erkennt bei allen Messungen die Schwierigkeit, einzelne Photonen-„Bursts“ zu identifizieren. Beschränkt man sich auf die Bursts, die sich von deutlich vom Hintergrundsignal abheben, kommt man in allen vier Messungen zusammen auf weniger als eine Handvoll an Events, die über 10 counts liefern. Somit ist es nicht möglich, die Messwerte sinnvoll weiter auszuwerten, weil insgesamt zu wenige Events gemessen wurden, bzw. die hohe Dunkelzählrate verhindert, dass mehr Events eindeutig identifiziert werden können. Da mit dem kommerziellen ConfoCor 2-Aufbau also nicht die notwendige Sensitivität für echte Einzelmolekülmessungen erreicht werden konnte, wurden Einzelmolekül-FRET-Experimente in Zusammenarbeit mit Barbara K. Müller und Dr. Don. C. Lamb (Physikalische Chemie, LMU) durchgeführt.

### SpFRET/PIE-Messaufbau

Die SpFRET/PIE-Experimente wurden wie in Referenz [100] beschrieben durchgeführt. Der Aufbau ist schematisch in Abb. 3.18a dargestellt. Die Probe wird durch zwei Laser-Lichtquellen beleuchtet: einen cw-Argon-Krypton-Ionen-Laser (531 nm, Stabilate 2018, Spectra Physics, Darmstadt), der durch einen akusto-optischen Modulator (AOM) (N23080-2-LTD, NEOS Technologies, Melbourne, USA) gepulst wird, und eine gepulste Laserdiode (635 nm, Sepia LDH635 PicoQuant, Berlin). Die Anstiegs- und Abfallzeit des AOM-Pulses beträgt 20 ns, was eine Pulsbreite von 50 ns ergibt. Um ein gutes Strahlprofil zu gewährleisten, werden beide Anregungsquellen durch Einzelmodenglasfasern geleitet (QPMJ-A3A,3AF-488-3.5/125-3-5-1 und PMJ-3AF3AF-633-4/125-3-5-1, OZ Optics, Carp, Kanada) bevor sie in das Mikroskop eintreten (Zeiss Axiovert 200, Göttingen). Nach dem Austritt aus der Faser wird die grüne Anregungsquelle auf einen kleineren Durchmesser (4 mm) als der rote Anregungsstrahl (5 mm) kollimiert, um beugungsbegrenzte Spots von ähnlicher Größe zu erzeugen ( $r_{\text{Spot}} \propto \lambda/d$ ). Das Licht wird über ein Wasserimmersionsobjektiv (C-Apochromat,  $63 \times \text{NA } 1.2$ , Zeiss) auf die Probe fokussiert. Die Laserintensität in der Probe beträgt für beide Anregungen (531 nm und 635 nm)  $80 \mu\text{W}$ . Die Fluoreszenz wird durch dasselbe Objektiv gesammelt und vom Laserlicht durch einen dichroitischen Spiegel getrennt (DM2) (DC532/633xr, AHF Analysetechnik, Tübingen). Im verwendeten System werden der grüne und der rote Detektionskanal durch einen weiteren dichroitischen Spiegel voneinander getrennt (DM3, 650DCRX, AHF Analysetechnik) und durch passende Emissionsfilter geschickt (HQ580/80 (EM1), HQ700/75 (EM2)), AHF Analysetechnik), bevor sie auf die konfokalen Blenden ( $40 \mu\text{m}$  (PH1),  $50 \mu\text{m}$  (PH2), Owis, Staufen) fokussiert werden. Hierbei wurden wiederum die Blenden für die verschiedenen Wellenlängen so eingestellt, dass die Detektionsvolumen möglichst gleich sind. Die Anregungspulse wurden über einen Haupttaktgeber (Oszillator SOM808, PicoQuant) mit einer Frequenz von 10 MHz synchronisiert und ein Puls erfolgt zeitverzögert im Vergleich zum

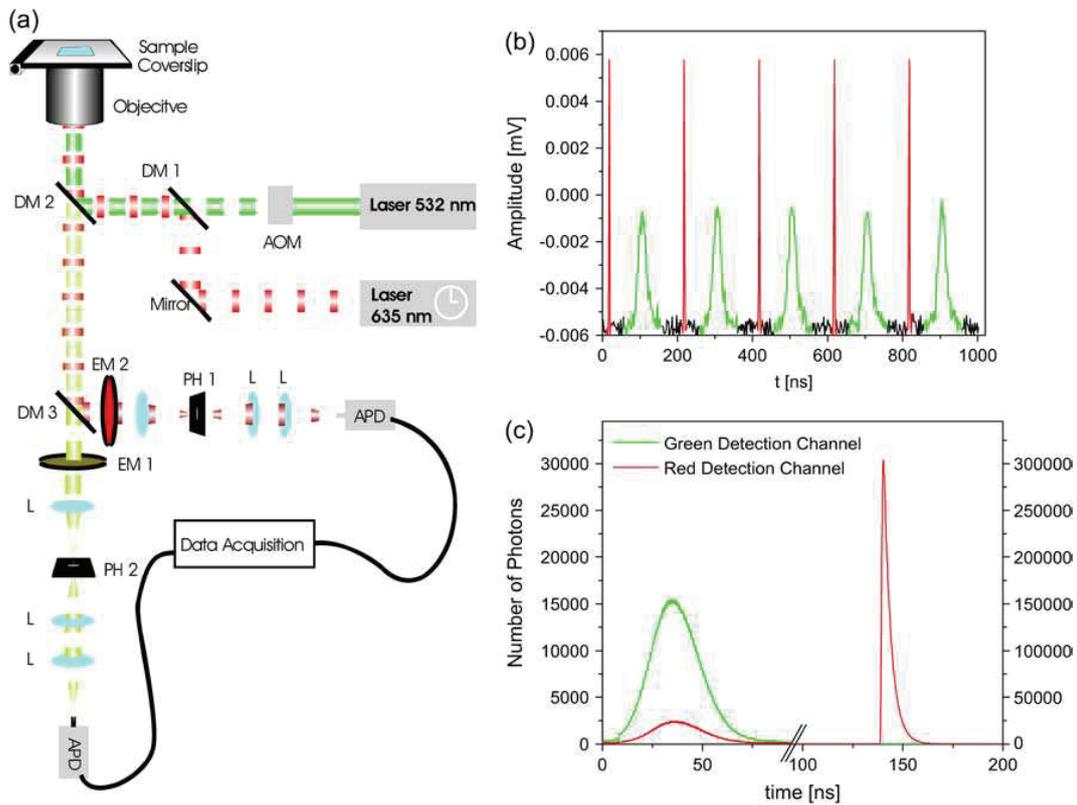


Abbildung 3.18: a) „Pulsed Interleaved Excitation“-Messaufbau (aus [100]). Schema des konfokalen Mikroskops mit Zweifarben-PIE-Quellen und -Detektoren. Im Diagramm bezeichnet AOM den akusto-optischen Modulator, DM die dichroitischen Spiegel, EM die Emissionsfilter, PH die Blenden (engl. pinholes), L die Linsen und APD die Avalanche-Photodioden. b) Zeitliche Abfolge der Anregungspulse gemessen von der Photodiode. Die Wiederholungsfrequenz der Laserpulse war 5 MHz. Die grünen und roten Anregungspulse sind entsprechend farbig markiert. c) Die Histogramme der Photonenankeftszeiten in Bezug auf den Haupttaktgeber sind in grün und rot für die jeweiligen Detektionskanäle dargestellt. Photonen, die in den ersten  $\sim 100$  ns eintreffen, wurden vom grünen Laser generiert, während die Photonen, die zwischen 130 und 180 ns eintreffen, von den roten Anregungspulsen generiert wurden.

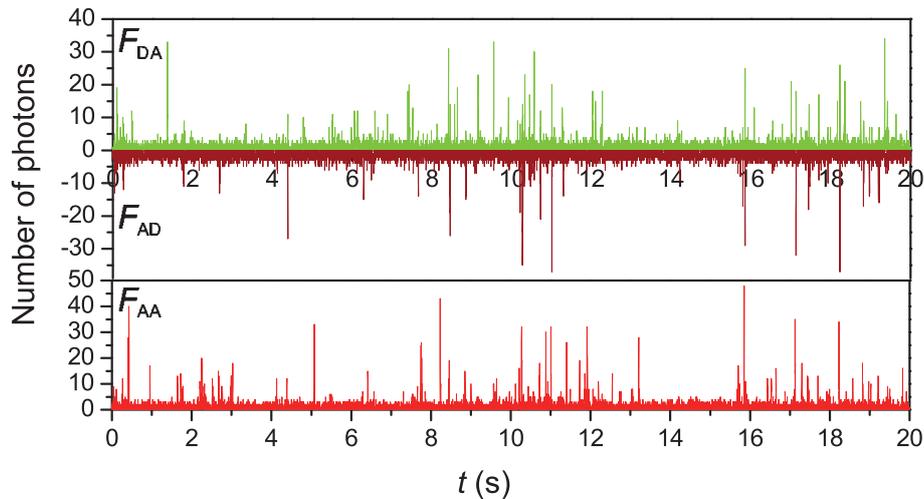


Abbildung 3.19: FRET Analyse an einzelnen Farbstoffpaaren mittels PIE. Gezeigt sind drei Zeitverläufe der Fluoreszenzintensität einer DNA Eichprobe, die mit den Farbstoffen Atto 532 und Atto 647 fluoreszenzmarkiert ist. Die Counts wurden über jeweils 2ms gesammelt.  $F_{DA}$  in grün zeigt im grünen Kanal detektierte Counts nach grüner Anregung,  $F_{AD}$  in dunkelrot zeigt im roten Kanal detektierte Counts nach grüner Anregung und  $F_{AA}$  in hellrot zeigt im roten Kanal detektierte Counts nach roter Anregung. Die einzelnen Fluoreszenzbursts sind klar vom Hintergrund zu unterscheiden.

anderen (daher der englische Name dieser Methode: „Pulsed interleaved excitation“). Dadurch wird die Probe alternierend mit grünen und roten Laserpulsen angeregt. Die Photonen werden mit zwei Avalanche-Photodioden detektiert (SPCM-AQR-14, EG&G Optoelectronics, Vaudreuil, Kanada), die über eine zeitkorrelierte Einzelphotonen-Zählkarte (TimeHarp 200, PicoQuant) ausgelesen wurden, welche ebenfalls auf die 10 MHz Haupttaktfrequenz synchronisiert wurde. Aus der Ankunftszeit des Photons im Verhältnis zum Haupttaktgeber ist es möglich, die Anregungsquelle zu ermitteln, die verantwortlich ist für die Entstehung des detektierten Photons.

Die für die Einzelmolekülmessungen verwendeten DNA-Tweezers sind mit den Farbstoffen Atto 532 (Donor) und Atto 647-N (Akzeptor) markiert, die spektral gut getrennt sind (3.7% Crosstalk vom grünen Kanal in den roten). Ein Anregungspuls bei 635 nm regt ausschließlich Atto 647-N Farbstoffe an und führt zur Fluoreszenzemission roter Photonen. Ein Anregungspuls bei 531 nm regt grüne Farbstoffe (Atto 532) an, was zur Emission von grünen Photonen des Donors oder, durch FRET, von roten Photonen des Akzeptors führt (siehe Abb. 3.19). Während des Experiments durchqueren einzelne DNA-Tweezers das Probenvolumen, was jeweils zu einem „Burst“ von Photonen führt. Mittels PIE ist es möglich innerhalb eines Bursts die Photonen, die aus grüner Anregung kommen, von denen aus roter Anregung zu trennen. Der nach grüner Anregung im grünen und/oder roten Detektorkanal detektierte Photonenburst tritt auf, wenn ein DNA Tweezer mit einem Donormolekül im Probenvolumen ist. Ein simultaner Photonenburst im roten Detektionskanal bei roter Anregung stellt sicher, dass ein fluoreszenzaktiver Akzeptorfarbstoff im Probenvolumen ist. Dadurch ist es möglich,

doppeltgelabelte DNA Tweezers von einfachgelabelten zu unterscheiden, selbst wenn nur wenig oder kein FRET auftritt. Somit können „Fehlsignale“ von unvollständig gelabelten Molekülen in PIE-basierten spFRET-Experimenten effektiv aussortiert werden. In der Analyse wurde ein Schwellenwert verwendet, um Bursts für die Analyse auszuwählen. Bei verwendeten Detektionsintervallen von 2 ms wurden Signale gewertet, wenn nach grüner Anregung mindestens 17 Photonen im grünen Kanal oder im roten Detektionskanal bzw. 12 Photonen im roten Detektionskanal nach roter Anregung detektiert wurden.

### 3.5.2 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) ist eine statistische Methode zur Bestimmung physikalisch wichtiger Parameter von fluoreszenzmarkierten Teilchen in Lösung wie insbesondere der Diffusionskonstanten [101, 102, 103, 104, 105, 106, 107]. Entwickelt wurde die Methode in den 70er Jahren von Magde et al. [101]. Verstärkt eingesetzt wurde sie seit Mitte der 90er Jahre bedingt durch starke technische Verbesserungen bei der konfokalen Mikroskopie.

Die FCS Experiments wurden mit einem kommerziellen FCS Aufbau LSM 510 (Carl Zeiss, Jena, Germany) durchgeführt, welches aus dem Modul ConfoCor 2 und einem Axiovert 200 Mikroskop besteht, das mit einem Zeiss C-Apochromat 403, 40x, NA 1.2 Wasserimmersionsobjektiv ausgestattet ist. Abbildung 3.20 zeigt schematisch den Aufbau des verwendeten Mikroskops. Die 488 nm Linie eines Argon-Ionen-Lasers (Lasos/Zeiss) wurde als Lichtquelle zur Anregung von Oregon Green 488 verwendet. Der Laser wurde mit dem empfohlenen Röhrenstrom von 6.1 A betrieben und die Intensität wurde auf 1 % beschränkt, um Sättigungseffekte zu vermeiden. Diese Intensität entspricht einer Laserleistung im Probenvolumen von 29.1  $\mu\text{W}$  [108]. Die emittierte Fluoreszenz im Wellenlängenbereich oberhalb von 505 nm wurde, nach Passieren der 70  $\mu\text{m}$  Blenden von zwei Avalanche Photodioden detektiert. Ein Kreuzkorrelations-Messverfahren wurde für alle Experimente gewählt, um den Einfluss von Detektor-Afterpulsing zu unterdrücken.

### Kalibrierung

Das System wurde mit einer 10 nM Lösung des Farbstoffs Alexa488 (Molecular Probes, Invitrogen) in Wasser kalibriert. Das Fluoreszenzsignal dieser Probe wurde zehn Mal 20 s lang gemessen. Abb. 3.21 zeigt den zeitlichen Verlauf des Fluoreszenzsignals für eine Messung von 20 s. Die Fluktuationen um den Mittelwert von etwa 87 kHz, d. h. 87000 counts pro Sekunde (cps), sind deutlich zu sehen. Diese Messreihen können nun analysiert werden, z. B. in Form von Histogrammen wie sie Abb. 3.22 zeigt. Beim Zählratenhistogramm ist aufgetragen, wie häufig eine bestimmte Zählrate auftritt. Dagegen ist beim Pulsdistanzhistogramm aufgetragen, wie häufig eine bestimmte Pulsdistanz (Pause zwischen zwei aufeinanderfolgenden Pulsen) auftritt. Oder die gemessenen Fluktuationen werden in Form einer Autokorrelationsanalyse ausgewertet. Die Autokorrelationsfunktion wird für jede Messung berechnet und nach Gleichung 4.76 angepasst (gefittet) mit  $g(t)$  aus Gleichung 4.72 und  $g_{\text{Tr}}(t)$  aus Gleichung 4.77 (siehe Abb. 3.23). Die Parameter  $\tau_{\text{D,Alexa488}} = 23.5 \pm 0.3 \mu\text{s}$ ,  $S = 5.3 \pm 0.2$ ,  $N = 1.65 \pm 0.02$ ,  $\Theta = 18.0 \pm 0.6\%$  und  $\tau_{\text{Tr}} = 2.7 \pm 0.2 \mu\text{s}$  werden durch den Fit ermittelt, der ermittelte Strukturparameter  $S$  wurde anschließend für alle weiteren Messungen verwendet. Da die Diffusionskonstante von Alexa488 von Liedl, Keller et al. gemessen wurde ( $D = 316 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) [108] wobei Rhodamin 6G als Referenz verwendet wurde ( $D = 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$  [109]), kann mittels

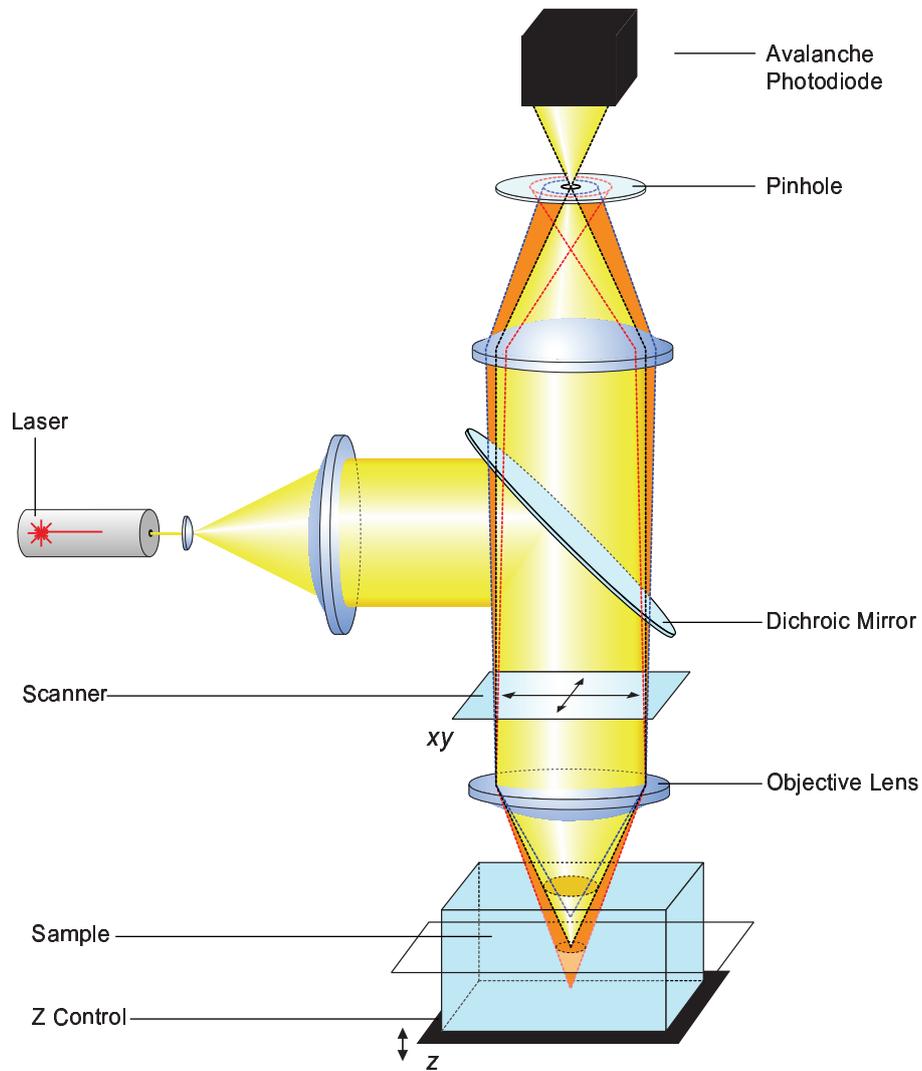


Abbildung 3.20: Schematische Darstellung des konfokalen Mikroskops, mit dem die FCS Experimente durchgeführt wurden (Quelle: ZEISS)

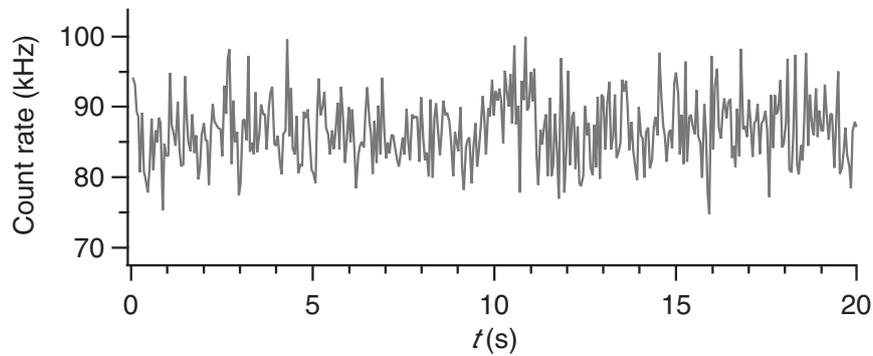


Abbildung 3.21: Fluoreszenzsignal der Messung zur Kalibrierung mit Alexa488.

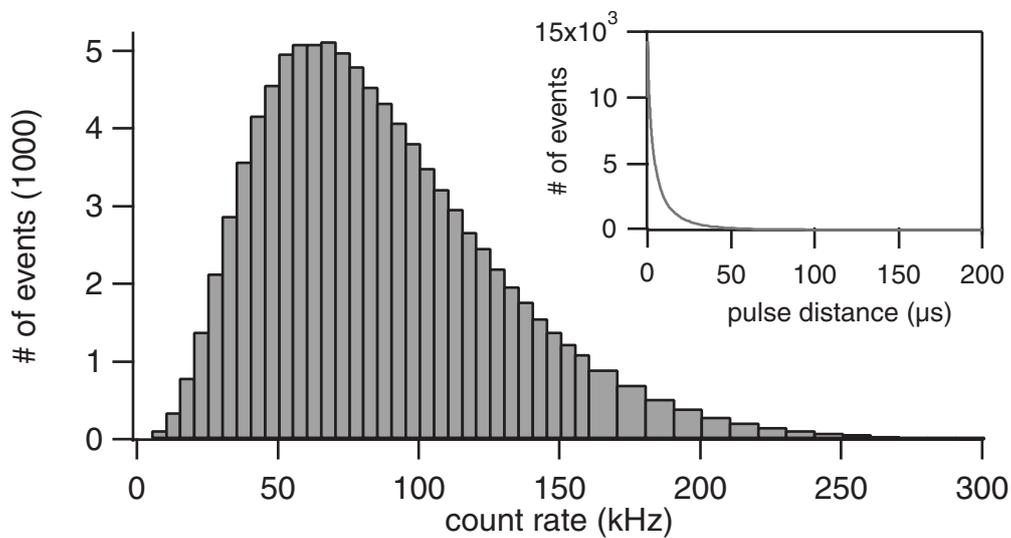


Abbildung 3.22: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Zählraten (Histogramm) zu der Messung in Abb. 3.21. Bei dieser Darstellung entspricht die Häufigkeit der Fläche einer Säule im Diagramm. Der eingerückte Graph zeigt die Häufigkeitsverteilung der Pulsabstände (= Zeit zwischen zwei eintreffenden Photonen).

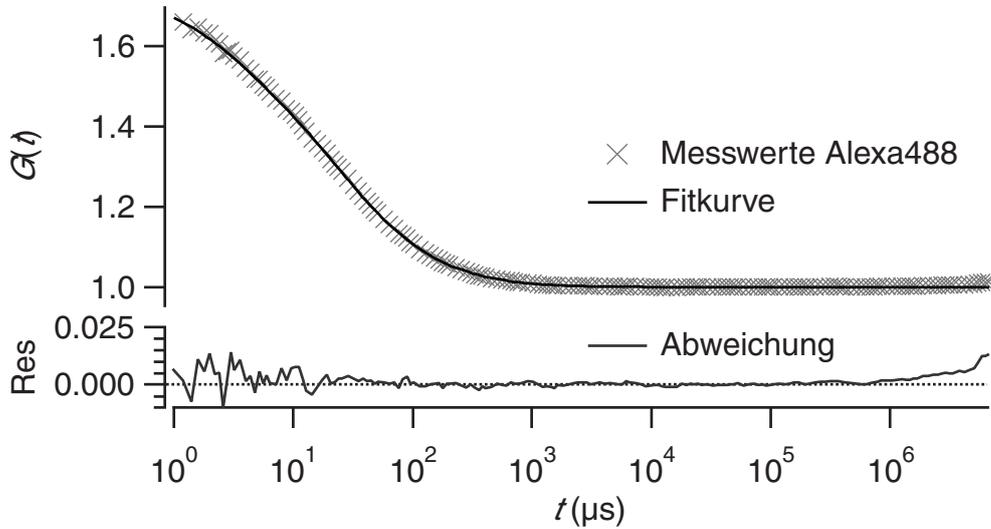


Abbildung 3.23: Eichmessung, Fitkurve und Abweichung für Alexa488. Die grünen Datenpunkte entsprechen der gemessenen Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensitäten. Die schwarze durchgezogene Kurve entspricht der ermittelten Fitkurve und die untere blaue Kurve zeigt die Abweichung des Fits von den Messwerten. Fitparameter:  $\tau_{D, \text{Alexa488}} = 23.5 \pm 0.3 \mu\text{s}$ ,  $S = 5.3 \pm 0.2$ ,  $N = 1.65 \pm 0.02$ ,  $\Theta = 18.0 \pm 0.6\%$  und  $\tau_{\text{Tr}} = 2.7 \pm 0.2 \mu\text{s}$ .

Gleichung 4.73 der xy-Radius des Fokalvolumens  $\omega_{xy} = 0.173 \pm 0.002 \mu\text{m}$  bestimmt werden. Das Fokalvolumen beträgt  $0.15 \pm 0.01$  Femtoliter ( $10^{-15}$  l).

### FCS-Titration der Thrombin-Aptamermaschine

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante (siehe Kapitel 4.1.1) wurde die in Abb. 5.24 (Kapitel 5.3.4) gezeigte FCS-Titration durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Mengen menschlichen  $\alpha$ -Thrombins (Fluka, Buchs, Schweiz) zu 25 nM Lösungen des Aptamers zugegeben, so dass die Thrombinkonzentrationen zwischen 2.5 nM und 2.5  $\mu\text{M}$  lagen. Als Puffer wurde der Aptamerpuffer verwendet (siehe Abschnitt 3.4.1). Bei jeder Probe wurde das Fluoreszenzsignal zehn Mal 30 Sekunden lang gemessen. Die Daten wurden mit der ConfoCor 2 Software analysiert, hiermit wurden auch die Fits durchgeführt. Für die detaillierte Fehlerberechnung und den Fit der Titrationskurve, aus dem sich die Dissoziationskonstante ergibt, wurde Igor Pro verwendet. Die weiteren Parameter wurden folgendermaßen bestimmt: Die charakteristische Diffusionszeit der Aptamermaschine  $\tau_{D1}$  wurde mit einer Probe ohne Thrombin bestimmt. Es wurde ein Einkomponentenfit nach Gleichung 4.76 mit  $G_{\text{Diff}}$  aus Gleichung 4.72 durchgeführt. Dieselbe Vorgehensweise wurde an einer Probe mit 100-fachem Thrombinüberschuss verwendet, um die charakteristische Diffusionszeit des Aptamer-Thrombin-Komplexes  $\tau_{D2}$  zu bestimmen. Bei allen weiteren Experimenten wurden  $Y$ ,  $\tau_{\text{Tr}}$ ,  $\Theta$  und  $N$  aus den jeweiligen Fits für jede Probe bestimmt, indem Gleichung 4.76 mit  $G_{\text{Diff}}$  aus Gleichung 4.75 verwendet wurde, wobei als  $\tau_{D1}$  und  $\tau_{D2}$  die zuvor ermittelten Werte für das Aptamer und den Aptamer-Thrombin-Komplex verwendet wurden. Dieser Ansatz

ist vergleichbar mit dem von Schürer et al. verwendeten, die FCS eingesetzt haben, um die Dissoziationskonstante eines Moenomycin bindenden Aptamers zu bestimmen [110].

# 4 Theoretischer Hintergrund

## 4.1 Reaktionskinetik bei DNA-Reaktionen

### 4.1.1 Reaktionskinetik allgemein

Im Fall der monomolekularen Reaktion



gilt für die Änderung der Konzentration von A mit der Zeit:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_+[A] + k_-[B] \quad (4.2)$$

Diese Differentialgleichung kann gelöst werden, wenn die Anfangskonzentrationen  $[A]_0$  und  $[B]_0$  bekannt sind, da der Umsatz  $x$  beider Stoffe miteinander verknüpft ist:

$$x(t) = [A] - [A]_0 = [B]_0 - [B] \quad (4.3)$$

Im Gleichgewicht ändert sich die Konzentration von A nicht mehr:

$$\frac{d[A]}{dt} = 0 \Rightarrow \frac{k_+}{k_-} = \frac{[B]}{[A]} = K \quad (4.4)$$

Diese Gleichungen stellen das Massenwirkungsgesetz für die Gleichgewichtskonzentrationen bzw. Reaktionsraten dar. Die Gleichgewichtskonstante  $K$  kann nach der van't Hoff-Gleichung

$$-\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (4.5)$$

auch thermodynamisch aus der Änderung der Freien Enthalpie (Gibbs-Energie) unter Standardbedingungen  $\Delta G^0$  ermittelt werden:

$$K = e^{-\Delta G^0/RT} \quad (4.6)$$

Kann dagegen die Rückreaktion vernachlässigt werden ( $[B]/[A] \ll k_+/k_- = K$ ), so kann die Lösung direkt formuliert werden:

$$[A] = [A]_0 e^{-k_+ t} \quad (4.7)$$

Da die Änderung der Konzentration proportional zur ersten Potenz der Konzentration ist, spricht man von einer Reaktion 1. Ordnung. Die charakteristische Zerfallsdauer ist  $\tau = 1/k_+$ .

Im Fall der bimolekularen Reaktion



gilt allgemein:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_+[A][B] + k_-[C] \quad (4.9)$$

Die Rückreaktion bezeichnet man hierbei als Dissoziation und die Gleichgewichtskonstante der Rückreaktion als Dissoziationskonstante  $K_d$ . Es gilt  $K_d = k_-/k_+ = K^{-1}$ .

Unter den Annahmen, dass A und B stöchiometrisch vorliegen und dass das Produkt C hinreichend stabil ist, so dass die Rückreaktion vernachlässigt werden kann, findet man folgenden Ausdruck für die Konzentrationsänderung mit der Zeit:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_+[A]^2 \quad (4.10)$$

In diesem Fall handelt es sich um eine Reaktion 2. Ordnung. Diese Differentialgleichung kann durch Separation der Variablen und Integration gelöst werden:

$$[A] = \frac{[A]_0}{1 + k_+[A]_0 t} \quad (4.11)$$

Somit ist die Halbwertszeit dieser Reaktion 2. Ordnung:

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_+[A]_0} \quad (4.12)$$

Bei einer zweistufigen Reaktion, die über ein Zwischengleichgewicht eines Stoffes B abläuft:



werden im allgemeinen Fall drei gekoppelte Differentialgleichungen für die Konzentrationen der drei Reaktanden A, B und C betrachtet:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_+[A] + k_-[B] \quad (4.14)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = k_+[A] - (k_- + k_f)[B] \quad (4.15)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_f[B] \quad (4.16)$$

dabei gelten die Anfangsbedingungen  $[A]_0 \neq 0$ ,  $[B]_0 = [C]_0 = 0$  sowie

$$[A]_0 = [A] + [B] + [C] \quad (4.17)$$

Da wir also die Konzentration  $[B]$  durch die von A und C ausdrücken können, ist das Problem auf die Lösung der zwei gekoppelten Differentialgleichungen 4.14 und 4.16 reduziert.

Für den Fall, dass die Konzentration des Zwischenprodukts B sehr viel kleiner als die der beiden anderen Reaktanden ist (z.B.  $k_-$  und / oder  $k_f$  groß gegenüber  $k_+$ ), ist auch die Konzentrationsänderung über weite Zeiten  $d[B]/dt \approx 0$ . Somit folgt aus Gleichung 4.15

$$[B] = \frac{k_+}{k_- + k_f} [A] \quad (4.18)$$

$[B]$  ist nicht genau konstant, da es von der zeitabhängigen Konzentration von A abhängt, aber nahezu. Man bezeichnet dies als „quasi-stationär“ und meint, dass die Änderung von  $[B]$  vergleichsweise wenig zeitabhängig ist. Unter Verwendung der Näherung 4.18 folgt aus Gleichung 4.14:

$$\frac{d[A]}{dt} = \frac{-k_+k_f}{k_- + k_f} [A] =: -k'[A] \quad (4.19)$$

Bei Annahme eines quasi-stationären Bereichs verhält sich die zweistufige Reaktion wie eine monomolekulare Reaktion. Die Differentialgleichungen sind nun vollständig entkoppelt. Wenn wir also die neue Ratenkonstante  $k'$  für  $k_+$  einführen:

$$k' = \frac{k_+k_f}{k_- + k_f} \quad (4.20)$$

sehen wir aus Gleichung 4.14 und 4.15, dass wir anschließend  $k_- = 0$  und  $k_f = 0$  setzen können.

#### 4.1.2 Kinetik von DNA-Hybridisierungsreaktionen

Als Hybridisierung bezeichnet man die Reaktion eines DNA-Einzelstranges E mit seinem Komplement  $\bar{E}$  zu einem Doppelstrang (und damit zu einer Doppelhelix) D:



Für die Doppelstrangbildung gilt in diesem „Alles oder nichts“-Modell (andere Modelle betrachten die Einzelschritte der Hybridisierung, also die Bildung einzelner Basenpaare) folgende Ratengleichung:

$$\frac{d[D]}{dt} = -k_- [D] + k_+ [E][\bar{E}] \quad (4.22)$$

Die Bildung des Doppelstrangs ist also eine Reaktion 2. Ordnung, der Zerfall dagegen eine Reaktion 1. Ordnung. Diese Betrachtungsweise ist stark vereinfachend, denn kinetisch handelt es sich nicht um Elementarprozesse, sondern die Hybridisierung läuft über viele Zwischenzustände ab. Die Vorwärtsraten  $k_+$  liegen typischerweise im Bereich von  $10^5 - 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [71, Seite 288f]. Im Detail hängen sie natürlich von der vorliegenden Sequenz der DNA und der Salzkonzentration ab. Die Rückwärtsraten kann man über  $k_- = k_+/K$  abschätzen.  $K$  kann hierzu aus  $\Delta G_0$  berechnet werden, welches für eine gegebene Basensequenz ermittelt werden kann.

Ein Beispiel: Für die Hybridisierung der Sequenz 5'-TAAGTTCATCTC-3' mit ihrem Komplement wurde die Gleichgewichtskonstante  $K_{298\text{K}} = 2.46 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  aus der Freien Enthalpie  $\Delta G_{298\text{K}} = -53.5 \text{ kJ/mol}$  berechnet, welche für diese Sequenz mit Hilfe des Programmes

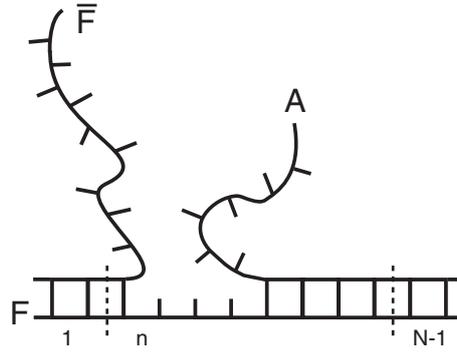


Abbildung 4.1: Darstellung der dreisträngigen Kreuzungspunktwanderung als random walk. Dieser branch migration Komplex bildet sich, wenn  $n$  Nukleotide von  $\bar{F}$  an das offene Ende des Duplexes AF hybridisieren. Der Kreuzungspunkt wandert stochastisch von der Position  $n$  bis er die Position  $n-1$  oder  $N-n+1$  erreicht (gestrichelte Linie), wo der Komplex entweder in den ursprünglichen Duplex AF oder den neuen  $\bar{F}\bar{F}$  zerfällt. Die möglichen Positionen des Kreuzungspunktes sind von 1 bis  $N-1$  durchnummeriert.

HYTHER<sup>TM</sup> berechnet wurde [111]. Mit dem mittleren Wert  $k_+ = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für die Duplexbildungsrate erhalten wir  $k_- = k_+/K_{298\text{K}} \approx 4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  für die Dissoziationsrate. Die Halbwertszeit dieser Dissoziation ist gegeben durch  $t_{1/2} = \ln 2/k_-$  und liegt folglich bei etwa 1733 s.

Die Halbwertszeit längerer Doppelstränge (größer als 12 Basenpaare) ist bei Raumtemperatur in der Regel wesentlich größer als die Zeit, während der experimentiert wurde. Daher können diese Doppelstränge als stabil angesehen werden. Eine sehr wichtige Möglichkeit diese Stabilität kontrolliert zu überwinden, bildet die „branch migration“ (siehe Kapitel 3.1.3).

### 4.1.3 Kinetik der Kreuzungspunktwanderung

Die dreisträngige Kreuzungspunktwanderung, bei der zwei DNA-Stränge  $\bar{F}$  und A mit identischer Sequenz um den komplementären Strang F konkurrieren ist in Abb. 4.1 dargestellt. Wir interessieren uns für die Ratenkonstante  $k_{\text{bm}}$  der Reaktion



Diese Ratenkonstante, mit der der anfangs vollständig hybridisierte Strang A durch den (in diesem Fall identischen) Strang  $\bar{F}$  ersetzt wird, können wir ausdrücken durch [112]:

$$k_{\text{bm}} = k_+ P_1 P_2 \quad (4.24)$$

$k_+$  ist die Ratenkonstante der Duplexbildung (siehe vorheriger Abschnitt),  $P_1$  ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich an einem Ende des ursprünglichen Duplexes so viele Basenpaare öffnen, dass der neue Strang  $\bar{F}$  dort binden kann und  $P_2$  ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Wanderung des Kreuzungspunktes am Ende zum Ersetzen von A durch  $\bar{F}$  führt. In Abb. 4.1 haben alle Stränge  $N$  Basen, die möglichen Kreuzungspunkte reichen von 1 bis  $N-1$ , wobei

$n$  die minimale Länge für einen stabilen Duplex(abschnitt) bedeutet. Die Wahrscheinlichkeit  $P_1$  entspricht dem Anteil der teilweise dissoziierten Duplexe, die  $n$  geöffnete Basenpaare an einem der beiden Enden der Doppelhelix haben. Nach Zimm ist dieser Anteil durch  $2K^{-n}/(1 + 2K^{-n}) \approx 2K^{-n}$  gegeben [113]. Hierbei ist  $K$  die Gleichgewichtskonstante für die Bildung eines Basenpaars an der Grenze zwischen geschlossener Helix und aufgeschmolzenen Bereichen.  $K$  liegt typischerweise im Bereich von  $1 - 5 \text{ M}^{-1}$  [71, Kapitel 2.3]. Die Wahrscheinlichkeit  $P_2$  kann durch das „random walk“-Modell der Kreuzungspunktwanderung aufgrund von thermischen Fluktuationen beschrieben werden. Wie in Abb. 4.1 dargestellt, kann sich der Kreuzungspunkt zwischen den Duplexen  $\overline{\text{FF}}$  und  $\text{AF}$  in beide Richtungen bewegen durch Aufbrechen eines Basenpaars auf einer Seite und Neubildung der anderen Seite. Da sich dadurch die Freie Energie des Komplexes nicht ändert, können wir den Vorgang als Random-Walk beschreiben mit gleichen Wahrscheinlichkeiten für einen Schritt in jede Richtung an jedem Kreuzungspunkt. Der random walk wird so lange fort dauern, bis eine der beiden Helizes kürzer als die minimale stabile Länge  $n$  wird. Um nun  $P_2$  abzuschätzen müssen wir also die Wahrscheinlichkeit finden, mit der ein random walk, der am Punkt  $n$  des Segments  $(n - 1, N - n + 1)$  beginnt, am rechten Ende ankommt und den neuen Komplex  $\overline{\text{FF}}$  bildet. Dieses Problem ist in der Spieltheorie bekannt als der „Ruin des Spielers“ (engl. gambler’s ruin) und für unseren Fall ist die Lösung  $P_2 = 1/(N - 2n + 2)$ . Damit kann  $k_{\text{bm}}$  abgeschätzt werden durch

$$k_{\text{bm}} = \frac{2k_+}{N - 2n + 2} K^{-n} \quad (4.25)$$

was auch formuliert werden kann als:

$$k_{\text{bm}} = \frac{2k_+}{N - 2n + 2} \exp -\Delta G_n/RT \quad (4.26)$$

mit der Freien Enthalpie  $\Delta G_n$ , die benötigt wird, um  $n$  Basen an einem Ende des Duplexes  $\text{AF}$  zu öffnen.

Mittels dieses Modells und unter Berücksichtigung der Möglichkeit, dass ein Duplex vollständig dissoziiert und sich der neue Strang erst anschließend anlagert (dissoziative Ersetzung) ermittelten Reynaldo et al. [112] eine Ratenkonstante von  $k_{\text{bm}} = 12.8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für eine 12 Basen lange Probe bei  $T=37.5^\circ\text{C}$ . Sie konnten damit ermitteln, dass  $n$  etwa 3 – 4 ist. Aus ihren Messungen ermitteln sie ausserdem einen Wert von  $k_+ = 1.5 \pm 0.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für die Duplexbildungsrate und eine Halbwertszeit von etwa zwei Stunden für die 12-Basen branch migration bei einer Konzentration von  $[\overline{\text{F}}] = 10 \mu\text{M}$  bei physiologischer Temperatur. Damit ist die Ersetzung eines Stranges über Kreuzungspunktwanderung wesentlich schneller, als die durch vollständige Dissoziation der ursprünglichen Helix, welche bei diesen Temperaturen eine Halbwertszeit von über 1000 Stunden hat.

Zur Interpretation unserer Experimente lassen sich aus diesem Modell folgende Aussagen festhalten:

1. Die Ratenkonstante  $k_{\text{bm}}$  ist eine Ratenkonstante 2. Ordnung und es gilt für die Halbwertszeit, wenn alle Stränge in gleicher Konzentration  $c$  vorliegen und die Rückreaktion vernachlässigt werden kann nach Gleichung 4.12:

$$t_{1/2} = \ln 2 \frac{1}{k_{\text{bm}}c} \quad (4.27)$$

2. Die Ratenkonstante ist nach Gleichung 4.26 etwa invers proportional zur Stranglänge:  $k_{\text{bm}} \sim 1/N$ .

3. Die Temperaturabhängigkeit ist ebenfalls durch Gleichung 4.26 gegeben.

4. Die Duplexbildungsrate ist für das Beispiel des 12-Basen-Stranges etwa  $10^5$ -mal höher als die Branch-migration-Rate.

Bei den von uns entwickelten DNA-Nanomaschinen und -aktuatoren verwenden wir die drei-strängige Kreuzungspunktwanderung, um Einzelstränge reversibel austauschen zu können. Um den Prozess insgesamt zu beschleunigen, verwenden wir sogenannte „Haltepunktsequenzen“ (siehe Kapitel 3.1.3). Dadurch wird bewirkt, dass die Kreuzungspunktwanderung (Gleichung 4.23) praktisch nur in eine Richtung abläuft und  $k_{\text{rbm}} = 0$  angenommen werden kann. Auch das vorgestellte theoretische Modell ist hierdurch nicht mehr in allen Teilen zutreffend, es kann aber dennoch zur groben Abschätzung herangezogen werden.

#### 4.1.4 Kinetisches Modell für das Thrombin-Aptamer

Zur Untersuchung des Öffnungsschrittes, bei dem das Protein Thrombin von der Thrombin-Aptamermaschine freigesetzt wird (von I über II nach III in Abb. 3.12, Kapitel 3.2.4) müssen wir die in Abb. 4.2a gezeigten Reaktionen berücksichtigen. In der Gegenwart von Thrombin wird eine Probe von Aptamermaschinen generell aus freien Aptamern und an Protein gebundenen Aptamern bestehen (Reaktion (5)). Das Aptamer selbst kann zusätzlich in einer gefalteten G-Quartett-Struktur oder in einer Zufallskonformation vorliegen. Das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Formen ist in Reaktion (1) gezeigt. „Fuel“-Stränge, die zur Probe zugegeben werden, können an jede der beiden Arten binden: (2) zeigt die Reaktion mit einem ungefalteten Aptamerstrang, (3,4) ist die Reaktion mit einem gefalteten Strang und (6,7) ist die Reaktion des Fuel-Stranges mit einem Aptamer, das an Protein gebunden ist. Letztere Reaktionen sind in zwei Reaktionsschritte unterteilt, wobei angenommen wird, dass der Fuel-Strang zuerst an den strukturlosen „Toehold“-Abschnitt bindet und anschließend den Rest der Struktur aufbricht. Im Folgenden verwenden wir die Abkürzungen  $x_1 - x_8$  für die Konzentrationen der Moleküle, wie in Abb. 4.2b definiert. Als Ratengleichungen ergeben sich:

$$\begin{aligned}
 \dot{x}_1 &= -k_1x_1 + k_2x_2 - k_3x_1x_3 \\
 \dot{x}_2 &= +k_1x_1 - k_2x_2 - k_5x_2x_3 + k_6x_5 - k_9x_2x_6 + k_{10}x_7 \\
 \dot{x}_3 &= -k_3x_1x_3 - k_5x_2x_3 + k_6x_5 - k_{11}x_3x_7 + k_{12}x_8 \\
 \dot{x}_4 &= +k_3x_1x_3 + k_7x_5 + k_{13}x_8 \\
 \dot{x}_5 &= +k_5x_2x_3 - k_6x_5 - k_7x_5 \\
 \dot{x}_6 &= -k_9x_2x_6 + k_{10}x_7 + k_{13}x_8 \\
 \dot{x}_7 &= +k_9x_2x_6 - k_{10}x_7 - k_{11}x_3x_7 + k_{12}x_8 \\
 \dot{x}_8 &= +k_{11}x_3x_7 - k_{12}x_8 - k_{13}x_8
 \end{aligned}$$

Die Rückwärtsraten  $k_4 = k_8 = k_{14}$  wurden bereits 0 gesetzt, da wir annehmen, dass der Komplex  $x_4$  sehr stabil ist.

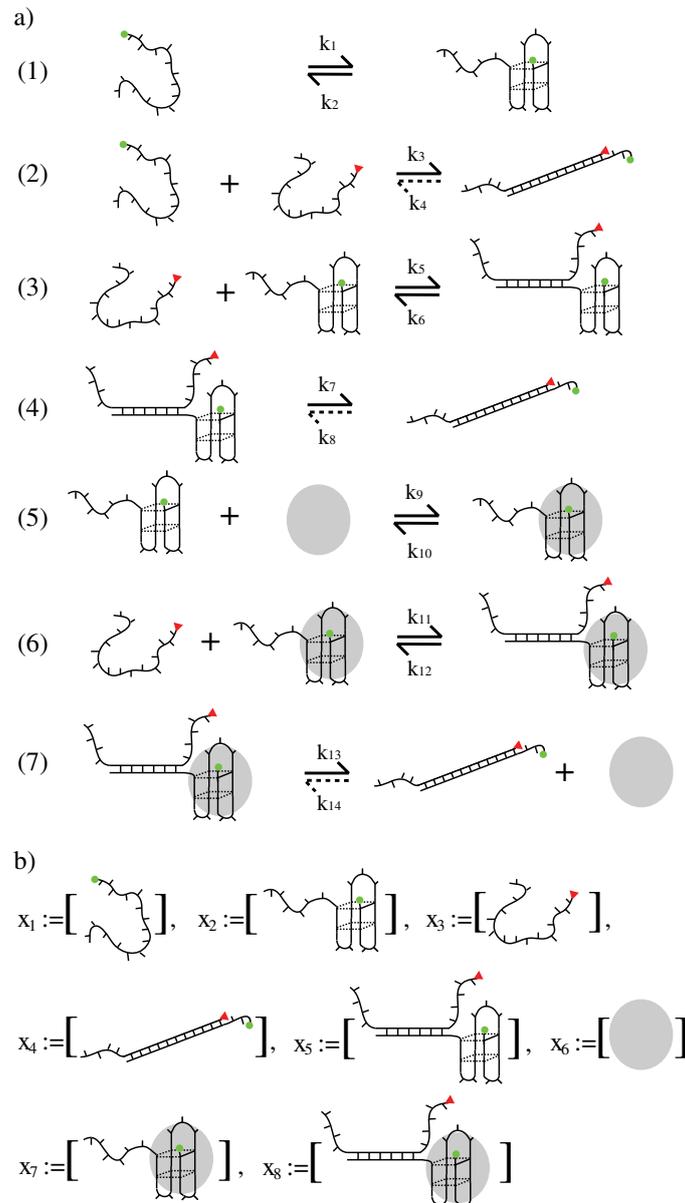


Abbildung 4.2: a) Schematische Darstellung der Reaktionsschritte, die an dem Protein-Freisetzungsprozess beteiligt sind: in Abwesenheit des Proteins kann die Aptamermaschine in einer gefalteten oder einer ungefalteten Form vorliegen (1). Zugegebene „Fuel“-Stränge können an die ungefaltete (2) oder die gefaltete (3) Maschine binden. Das Binden an die gefaltete Maschine kann zuerst an der strukturlosen „Toehold“-Sektion beginnen (3), von wo aus die vollständige Hybridisierung erfolgen kann (4). In Gegenwart des Proteins kann die Aptamermaschine an dieses gemäß seiner Dissoziationskonstante  $K_d = k_{10}/k_9$  binden (5). Nach Zugabe des „fuel“ Stranges kann nun in einem Zwischenschritt ein Komplex aus Aptamermaschine, Protein und Fuel-Strang gebildet werden (6). Schlussendlich führt die Entfernung des Proteins und die vollständige Hybridisierung vom Fuel-Strang an die Aptamermaschine zur Freigabe des Proteins (7). b) Definition der Konzentrationen  $x_1, x_2, \dots, x_8$  für das kinetische Modell.

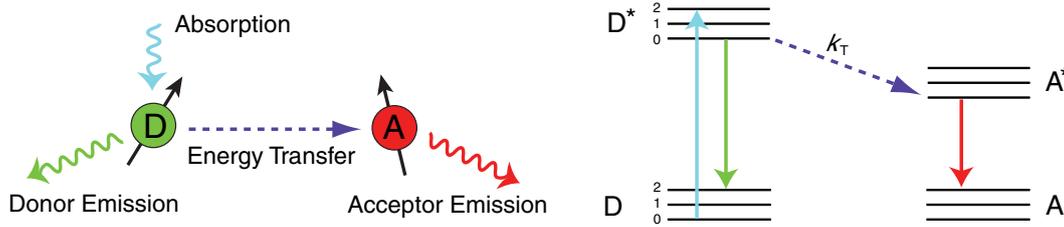


Abbildung 4.3: Darstellung des strahlungslosen Energietransfers von einem angeregten Donor-Dipol auf einen Akzeptor-Dipol im Grundzustand (links). Zugehöriges Jablonski-Diagramm (rechts).

## 4.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

Im Folgenden wird auf die Theorie des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) eingegangen.

### 4.2.1 Fluoreszenz

Fluoreszenz ist die Emission von Licht innerhalb weniger Nanosekunden nach der Absorption von Licht einer kürzeren Wellenlänge durch ein Molekül. Der Unterschied zwischen den anregenden und den emittierten Wellenlängen bezeichnet man als Stokes-Shift (Verschiebung). Moleküle, die fluoreszieren, bezeichnet man als Fluorophore. Die Effizienz eines Fluorophors sowie seine Absorptions- und Emissionswellenlängen werden durch sein äußeres Elektronenorbital bestimmt. Wenn ein fluoreszierendes Molekül in seinem „Grundzustand“ ein Photon absorbiert, kann dies eine Veränderung seiner elektronischen, Vibrations- und Rotationszustände bewirken. Die absorbierte Energie führt manchmal dazu, dass ein Elektron in ein anderes Orbital wechselt, welches energetisch höher liegt. Dieser Übergang in einen „angeregten Zustand“ ist sehr schnell, typischerweise im Femtosekunden-Bereich. Vibrationsrelaxation und Fluoreszenzemission sind die beiden Hauptwege, auf denen ein Fluorophor in seinen Grundzustand zurückkehrt. Fluoreszenz ist in Abb. 4.3 dargestellt, wenn wir nur den Fluorophor „D“ betrachten: Abb. 4.3a zeigt, wie ein einfallendes Photon (hellblau) absorbiert wird, und anschließend ein grünes (Fluoreszenz-) Photon emittiert wird. Abb. 4.3b zeigt uns im linken Teil ein sogenanntes Jablonski-Diagramm, in dem die unterschiedlichen Energiezustände im Grundzustand D und im angeregten Zustand D\* dargestellt. D und D\* repräsentieren die elektronischen Niveaus, 0, 1 und 2 stellen drei Vibrationsenergieniveaus dar, Rotationsenergieniveaus sind nicht dargestellt (sie sind dichter als die Vibrationsenergiezustände und liegen zwischen diesen).

### 4.2.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

Unter bestimmten Voraussetzungen kann es bei Vorhandensein eines zweiten Fluorophors zu einem strahlungslosen Energietransfer kommen, dem die Coulomb-Wechselwirkung zweier Dipole (der Fluorophore) zugrunde liegt, dem Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET). Dies ist symbolisch in Abb. 4.3a dargestellt. Wie im Fall der Fluoreszenz absorbiert der Fluorophor D einfallendes Licht (hellblau). Anschließend kann ein Teil der absorbierten Energie auf den Fluorophor A übertragen werden (violett, gestrichelt). Dadurch gelangt A in einen

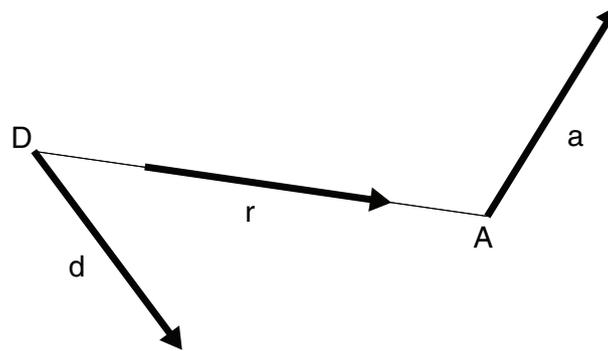


Abbildung 4.4: Orientierung der Übergangsdipolmomente eines Donor- und eines Akzeptormoleküls.  $\vec{d}$  und  $\vec{a}$  sind die Einheitsvektoren des Übergangsdipolmoments des Donors und des Akzeptors,  $\vec{r}$  ist der Einheitsvektor, der D und A verbindet.

angeregten elektronischen Zustand und kann in der Folge Licht emittieren (rot). Abb. 4.3b zeigt den Vorgang in Form eines Jablonski-Diagramms: Zunächst geht der „Donor“ D durch Absorption in den angeregten Zustand  $D^*$  über. Durch FRET überträgt D Energie auf A und relaxiert in seinen Grundzustand ohne ein Photon zu emittieren, der Fluorophor A erreicht den angeregten Zustand  $A^*$ . Der Energietransfer kann also als ein zusätzlicher „Zerfallskanal“ für die Anregungsenergie von  $D^*$  aufgefasst werden, der mit einer Ratenkonstante  $k_T$  auftritt, die vom jeweiligen Donor-Akzeptor-Paar abhängt. Wie wir gesehen haben, kann FRET als Übergang zwischen zwei Zuständen beschrieben werden:



Theodor Förster hat 1946 als erster einen korrekten Ausdruck für die Ratenkonstante klassisch hergeleitet [114] und 1948 ebenfalls als erster eine quantenmechanische Herleitung beschrieben [115]. Deshalb wird FRET auch als Förster-Transfer bezeichnet.

### Klassische Herleitung der Ratenkonstanten

Förster betrachtet bei seiner klassischen Herleitung der Ratenkonstante  $k_T$  zwei benachbarte elektrisch geladene klassische mechanische Oszillatoren, die durch ihre coulombschen elektrostatischen Wechselwirkungen gekoppelt sind. Wenn die beiden Oszillatoren dieselbe Resonanzfrequenz haben, werden sie Energie austauschen, ähnlich wie zwei Pendel in Resonanz. Förster nahm an, dass anfangs nur einer der beiden Oszillatoren, der „Donor“ schwingt. Klassisch wird der „Donor“-Oszillator seine Energie entweder in die Umgebung abstrahlen oder seine Energie (in beide Richtungen) mit dem „Akzeptor“-Oszillator austauschen, wenn die beiden Oszillatoren nahe genug beieinander sind. Die zwei Oszillatoren wechselwirken über eine Entfernung von  $R$  als Dipole mit Dipolmomenten  $\mu$  und einer Wechselwirkungsenergie von

$$E_{\text{ww}} = \kappa \mu^2 / n^2 R^3 \quad (4.29)$$

Förster nahm hierbei an, dass die beiden Oszillatoren identische Amplituden besitzen. In seiner „Überschlagsrechnung“ war der Faktor  $\kappa/n^2$  nicht enthalten.  $n$  ist der Brechungsindex

der Lösung,  $\kappa$  der Orientierungsfaktor zwischen den zwei Dipolen:

$$\kappa = \vec{d} \cdot \vec{a} - 3(\vec{d} \cdot \vec{r})(\vec{a} \cdot \vec{r}) \quad (4.30)$$

Alle Vektoren sind Einheitsvektoren,  $\vec{d}$  und  $\vec{a}$  sind die Vektoren des Übergangsdipolmoments des Donors und des Akzeptors,  $\vec{r}$  ist Vektor, der D und A verbindet (siehe Abb. 4.4. Je nach Orientierung von D und A zueinander kann  $\kappa^2$  Werte zwischen 0 und 4 einnehmen. Für eine „dynamisch schnelle“ zufällige Verteilung der Orientierungen von Donoren und Akzeptoren aufgrund von Rotationsdiffusion ergibt sich der Mittelwert  $\kappa^2 = 2/3$ . Der Begriff „dynamisch schnell“ bezeichnet die Annahme, dass die Raumwinkel von sowohl D als auch A zu allen Zeiten gleichverteilt sind. Beide Moleküle müssen bei dieser Annahme ihr isotropes Rotationsgleichgewicht in kürzerer Zeit erreichen, als die Emissionslebenszeit des Donors dauert.

Die mittlere Rate der von einem schwingenden Dipol abgestrahlten Energie ist [116]:

$$\dot{E} = \frac{16\pi^4 c}{3\lambda^4} \mu^2 = \frac{\omega^4}{3c^3} \mu^2 = \frac{\omega^3 \hbar \omega}{3\hbar c^3} \mu^2 \quad (4.31)$$

Somit gilt für die Dauer der Energieabstrahlung:

$$\tau_{\text{rad}} \approx \hbar \omega / \dot{E} = \frac{3\hbar c^3}{\mu^2 \omega^3} \quad (4.32)$$

Förster hat nun den Abstand zwischen den zwei Oszillatoren berechnet, bei dem die Strahlungsdauer  $\tau_{\text{rad}}$  gleich der Dauer für den Energieaustausch zwischen beiden Oszillatoren ist ( $\tau_{\text{rad}} = \tau_{\text{ww}}$ ). Bei diesem Abstand  $R = R_0$  zwischen D und A wird die Hälfte der Energie, die normalerweise von D in Form von Strahlung abgegeben würde, strahlungslos auf A übertragen. Da die Wechselwirkungsenergie als eine oszillierende Vibration gesehen wird, gilt:  $E_{\text{ww}} = \hbar \omega_{\text{ww}} \approx \hbar / \tau_{\text{ww}}$  und somit  $\tau_{\text{ww}} \approx \hbar / E_{\text{ww}}$ . Aus Gleichung 4.29 können wir die Austauschdauer

$$\tau_{\text{ww}} = \frac{\hbar n^2 R^3}{\kappa \mu^2} \quad (4.33)$$

bestimmen. Perrin hatte bereits 1927 diese Überlegungen angestellt und war zu dem Schluss gekommen, dass für den Fall, dass beide Oszillatoren immer exakt in Resonanz sind,  $R_0 = \lambda/2\pi$  leicht aus  $\tau_{\text{rad}} = \tau_{\text{ww}}$  berechnet werden kann [117].  $\lambda = 2\pi c/(\omega n)$  ist die Wellenlänge der Oszillation,  $c$  die Lichtgeschwindigkeit und  $\omega$  die Kreisfrequenz. Hieraus würde folgen, dass der Transfer über Entfernungen von  $\sim 100$  nm effektiv sein müsste, was nie beobachtet wurde.

Förster erkannte, dass diese extrem großen Werte für  $R_0$  aus der Annahme der exakten Resonanz der Linienspektren resultieren. In Wirklichkeit sind die Spektren durch intramolekulare Wechselwirkungen und Wechselwirkungen mit der Lösung verbreitert. Dadurch wird die exakte Resonanzbedingung nur in kurzen Intervallen während der langen für den Energietransfer benötigten Zeit erfüllt. Wenn nämlich die Wechselwirkungsenergie  $E_{\text{ww}}$  von zwei klassischen Oszillatoren sehr klein gegenüber ihrer Vibrationsenergie ist, werden sie nur im Laufe sehr vieler Perioden Energie austauschen. Durch diese Resonanzverschiebung zwischen den beiden „schmalbandigen“ Oszillatoren verlängert sich die Zeit beträchtlich, die für den Energieaustausch zwischen beiden Oszillatoren abgeschätzt wurden. Das führt zu einem wesentlich kleineren  $R_0$ . Um die längere Austauschzeit zu berechnen, führte Förster zwei Korrekturen ein: Zum einen setzt er den Bereiche des Spektrum, in dem sich die beiden Oszillatoren überlappen

in Relation zum Gesamtspektrum eines Oszillators und zum anderen berücksichtigt er das Verhältnis von Wechselwirkungsenergie  $E_{\text{ww}}$  zur Energie eines Oszillators. Er definierte die Breite der spektralen Frequenz  $\Omega$  (und nahm an, dass sie für beide Oszillatoren dieselbe sei) und den Überlappbereich  $\Omega'$ . Die beschriebene Korrektur schreibt sich als  $(\Omega'/\Omega) \cdot (E_{\text{ww}}/\hbar\Omega)$ . Der erste Faktor entspricht dem Maß, in dem D und A spektral überlappen, der zweite berücksichtigt, welchen Anteil der relativ schmale Frequenzbereich  $E_{\text{ww}}/\hbar$  innerhalb des breiten Frequenzbands  $\Omega$  einnimmt. Diese Korrektur für die Resonanzverschiebung multiplizierte Förster mit dem bisher gefundenen Ausdruck für die Transferrate  $k'_T \approx 1/\tau_{\text{ww}}$ . Mit Gleichung 4.33 erhält man:

$$k_T \approx \frac{\Omega' E_{\text{ww}}}{\hbar\Omega^2} \cdot \frac{1}{\tau_{\text{ww}}} = \frac{\mu^4 \kappa^2 \Omega'}{\hbar^2 n^4 \Omega^2 R^6} \quad (4.34)$$

Hier sehen wir die für FRET typische  $1/R^6$  Abhängigkeit der Übergangsrate. Um  $R_0$  zu berechnen, setzte Förster die korrigierte Austauschdauer gleich der Strahlungsdauer, also  $\tau_{\text{rad}} = \tau_{\text{ww}}/p$  und erhielt:

$$R_0^6 = \frac{3c^3 \mu^2 \kappa^2 \Omega'}{\omega^3 \hbar n^4 \Omega^2} = \frac{9\lambda^6 \kappa^2 \Omega'}{(2\pi)^6 n^4 \Omega^2 \tau_{\text{rad}}} \quad (4.35)$$

wobei im letzten Ausdruck  $\tau_{\text{rad}} = 3\hbar c^3/\mu^2 \omega^3$  verwendet wurde, um  $\mu^2$  und  $c = \lambda\omega/2\pi$  zu ersetzen.

### Abriss der quantenmechanischen Herleitung der Ratenkonstanten $k_T$

Bei der quantenmechanischen Herleitung [115] wird die Übergangsrate nach Fermis „Goldener Regel“ beschrieben durch

$$k_T = \frac{2\pi}{\hbar} \beta^2 \rho(E) \quad (4.36)$$

mit der Wechselwirkungsmatrix  $\beta$  (im Fall von FRET gilt  $\beta \propto 1/R^3$  – Dipol-Dipol-Wechselwirkung) und der Zustandsdichte der Endzustände  $\rho(E)$ . Es wird angenommen, dass der Energietransfer langsam im Vergleich zur Relaxation der Vibrationsanregungen ist, so dass die Energie nicht von den zu Beginn vibrationsangeregten Zuständen von  $D^*$  transferiert wird. Zudem wird angenommen, dass die Wechselwirkung zwischen  $D$  und  $A$  sehr schwach ist, so dass deren individuelle molekulare Wellenfunktionen nicht gestört werden. Die Spektren sind diejenigen der individuellen Spezies von  $D$  und  $A$ . Die Wechselwirkungsmatrix  $\beta = \langle \Psi_{D^*A} | H' | \Psi_{DA^*} \rangle$  drückt die Kopplung der beiden Zustände, mit den Wellenfunktionen  $\Psi_{D^*A}$  und  $\Psi_{DA^*}$  über den Dipoloperator  $H' = \kappa |\vec{\mu}_D| |\vec{\mu}_A| / R^3$  aus.  $|\vec{\mu}_D|$  und  $|\vec{\mu}_A|$  sind die Beträge der beiden Übergangsdipolmomente und  $\kappa$  ist der Orientierungsfaktor zwischen den beiden Dipolen aus Gleichung 4.30.

Die elektronischen und Vibrationsteile der Wellenfunktion können separiert werden, was uns zu folgendem Ausdruck führt:

$$k_T = \frac{2\pi}{\hbar} C \rho(E) \kappa^2 \left( \frac{|\vec{\mu}_D| |\vec{\mu}_A|}{R^3} \right)^2 (\langle \chi_{D^*} | \chi_D \rangle \langle \chi_{A^*} | \chi_A \rangle)^2 \quad (4.37)$$

Der letzte Term in der Gleichung ist das Produkt der Frank-Condon-Faktoren. Durch geeignete Variablentransformation und Summation über alle Resonanzzustände kommt man zu

folgendem Resultat [118, 115]:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (4.38)$$

und der Förster-Radius berechnet sich zu:

$$R_0 = \left( \frac{9(\ln 10)\kappa^2\Phi_D J(\lambda)}{128\pi^5 N_A n^4} \right)^{1/6} \quad (4.39)$$

Hier ist  $\Phi_D$  die Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, die Einheit von  $R$ ,  $R_0$  und  $\lambda$  ist cm. Die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_D$  ist definiert als das Verhältnis der Fluoreszenzintensität  $F_D$  zur absorbierten Lichtintensität  $I_{\text{abs}} = I_0 - I_{\text{tr}}$  (vgl. Gleichung 3.15):

$$\Phi_D = F_D / I_{\text{abs}} \quad (4.40)$$

$J(\lambda)$  ist das „Überlappintegral“:

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty \varepsilon_a(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty f_D(\lambda) d\lambda} \quad (4.41)$$

wobei  $\varepsilon_a(\lambda)$  der Extinktionskoeffizient des Akzeptors bei der Wellenlänge  $\lambda$  in der Einheit  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  und  $f_D(\lambda)$  die Fluoreszenzemissionsverteilung des Donors ist;  $J(\lambda)$  hat somit die Einheit  $\text{M}^{-1}\text{cm}^3$ . Mit den verwendeten Einheiten kann Gleichung 4.39 vereinfacht werden zu:

$$R_0 = \left( 8.79 \times 10^{-25} n^{-4} \Phi_D \kappa^2 J(\lambda) \right)^{1/6} \quad (4.42)$$

Will man dagegen den Förster Radius in Å bestimmen und nm als Einheit für die Wellenlängen verwenden, so hat  $J(\lambda)$  die Einheit  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$  und es gilt:

$$R_0 = 0.211 \times \left( n^{-4} \Phi_D \kappa^2 J(\lambda) \right)^{1/6} \quad (4.43)$$

Die Effizienz des Energietransfers ( $f_E$ ) entspricht dem Verhältnis von  $k_T$  zur Summe aller Raten, über die ein angeregter Donor  $D^*$  in seinen Grundzustand  $D$  zurückkehren kann:

$$f_E = \frac{k_T}{\tau_D^{-1} + k_T} \quad (4.44)$$

Durch Einsetzen von  $k_T$  aus Gleichung 4.38 zeigt sich die Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz:

$$f_E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6} \quad (4.45)$$

### 4.2.3 Einzelmolekül-FRET-Messungen

Wie kann man die FRET-Effizienz eines Transfers vom Donor zum Akzeptor experimentell bestimmen? Zunächst betrachten wir die Quantenausbeute  $\Phi_m$  eines Prozesses  $m$ , durch den ein angeregter Donor mit einer Rate  $k_m$  in seinen Grundzustand  $D$  übergeht [119]:

$$\Phi_m = k_m / \sum_i^N k_i \quad (4.46)$$

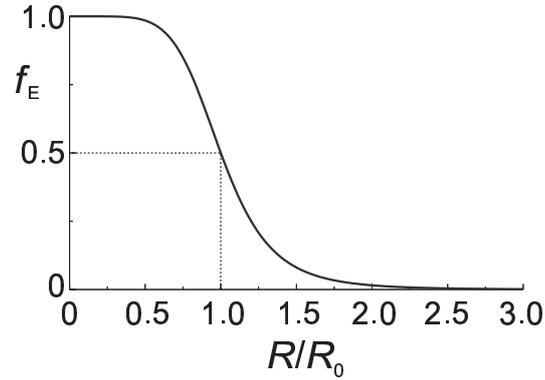


Abbildung 4.5: Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz.

$k_i$  sind die Ratenkonstanten aller  $N$  Zerfallskanäle, die von  $D^*$  nach  $D$  führen. Um die Rate  $k_p$  eines bestimmten Prozesses  $p$  zu ermitteln, können wir die Quantenausbeute des Prozesses  $m$  oder eine zu ihr proportionale Größe einmal in Gegenwart von  $p$ :

$$\Phi_{m,+p} = k_m / \left( k_p + \sum_{i \neq p} k_i \right) \quad (4.47)$$

und einmal in Abwesenheit von  $p$  messen:

$$\Phi_{m,-p} = k_m / \sum_{i \neq p} k_i \quad (4.48)$$

Nun bilden wir das Verhältnis  $\Phi_{m,+p}/\Phi_{m,-p}$ :

$$\frac{\Phi_{m,+p}}{\Phi_{m,-p}} = \frac{\sum_{i \neq p} k_i}{k_p + \sum_{i \neq p} k_i} = \frac{(k_p + \sum_{i \neq p} k_i) - k_p}{(k_p + \sum_{i \neq p} k_i)} = 1 - \Phi_p \quad (4.49)$$

also können wir auf diesem Weg die Quantenausbeute  $\Phi_p$  messen:

$$\Phi_p = 1 - \frac{\Phi_{m,+p}}{\Phi_{m,-p}} = \frac{\Phi_{m,-p} - \Phi_{m,+p}}{\Phi_{m,-p}} \quad (4.50)$$

Statt den Quantenausbeuten ( $\Phi_{m,+p}, \Phi_{m,-p}$ ) können die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten  $F_i$  gemessen werden, solange  $F_i \propto \Phi_i$  erfüllt ist, was nach Gleichung 4.40 bedeutet, dass die Absorption  $I_{\text{abs}}$  des Donors gleich sein muss, ob der Akzeptor anwesend ist oder nicht. Daher kann  $\Phi_p$  experimentell bestimmt werden durch:

$$\Phi_p = \frac{F_{m,-p} - F_{m,+p}}{F_{m,-p}} \quad (4.51)$$

Da die FRET-Effizienz  $f_E$  ihrer Definition nach der Quanteneffizienz für den Transferprozess mit der Ratenkonstanten  $k_T$  entspricht (vgl. Gleichung 4.44), kann sie folgendermaßen gemessen werden:

$$f_E = \frac{F_D - F_{DA}}{F_D} \quad (4.52)$$

$F_D$  ist die Fluoreszenzintensität des Donors in Abwesenheit des Akzeptorfarbstoffs,  $F_{DA}$  die des Donors in Anwesenheit des Akzeptors.

Führen wir nun Experimente mit Molekülen durch, die im Idealfall alle jeweils mit Donor- und Akzeptorfarbstoff markiert sind, und können die Emission in beiden Kanälen messen, so ist es ratsam, den gefundenen Ausdruck weiter zu modifizieren. Der Zähler in Gleichung 4.52 entspricht dem Verlust an Fluoreszenz des Donors durch die Anwesenheit von A. Der Nenner entspricht dagegen der Donorintensität, die durch die maximale Zahl an angeregten Donor emittiert werden kann. Folgender Ausdruck für die FRET-Effizienz trägt dem Rechnung [120]:

$$f_E = \frac{F_{AD}}{\alpha F_{DA} + F_{AD}} \quad (4.53)$$

wobei  $F_{AD}$  die Fluoreszenz des Akzeptors in Gegenwart des Donors korrigiert um direkte Anregung des Akzeptors und Übersprechen vom Donor ist und  $\alpha$  ein Detektionskorrekturfaktor, der unterschiedliche Empfindlichkeiten im Donor- bzw. Akzeptorkanal berücksichtigt:

$$\alpha = \frac{\eta_A \Phi_A}{\eta_D \Phi_D} \quad (4.54)$$

Hierbei ist  $\eta_i$  die Kollektionseffizienz und  $\Phi_i$  die Quantenausbeute des jeweiligen Kanals. Um die Entfernung zwischen Donor- und Akzeptormolekülen zu bestimmen, können Gleichung 4.45 und 4.53 zusammengefasst werden:

$$R = R_0 \left( \frac{\alpha F_{DA}}{F_{AD}} \right)^{1/6} \quad (4.55)$$

### 4.3 Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie

Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) ist eine statistische Methode zur Bestimmung physikalisch wichtiger Parameter von fluoreszenzmarkierten Teilchen in Lösung wie insbesondere der Diffusionskonstanten [101, 102, 103, 104, 105, 106, 107]. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die FCS-Theorie gegeben.

#### 4.3.1 Fluoreszenzfluktuationen

Wenn wir annehmen, dass eine Lichtquelle auf ein kleines Volumen ( $V_{\text{eff}}$ ) einer Lösung fokussiert wird, die fluoreszierende Partikel enthält, so werden nur diejenigen Partikel zum Messsignal beitragen, die sich zum Zeitpunkt einer Messung innerhalb dieses Volumens befinden. Im Durchschnitt befinden sich  $\langle N \rangle$  Teilchen innerhalb dieses Volumens. Im zeitlichen Verlauf wird die Teilchenzahl  $N(t)$  in diesem Volumen jedoch fluktuieren, da einzelne Teilchen herein- und hinausdiffundieren können. Im Fall einer stark verdünnten Lösung mit einer sehr kleinen durchschnittlichen Teilchenanzahl im Fokaltvolumen kann die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich  $N$  Teilchen im Fokaltvolumen befinden, durch eine Poisson-Verteilung beschrieben werden:

$$p(N) = \frac{\langle N \rangle^N e^{-\langle N \rangle}}{N!} \quad (4.56)$$

hierbei ist  $\langle N \rangle$  der Mittelwert der im Volumen befindlichen Teilchen. Für die Fluktuation der Teilchenanzahl  $\delta N(t) = N(t) - \langle N \rangle$  gilt hierbei folgender Zusammenhang:

$$\langle (\delta N)^2 \rangle = \langle N^2 \rangle - \langle N \rangle^2 = \langle N \rangle \quad (4.57)$$

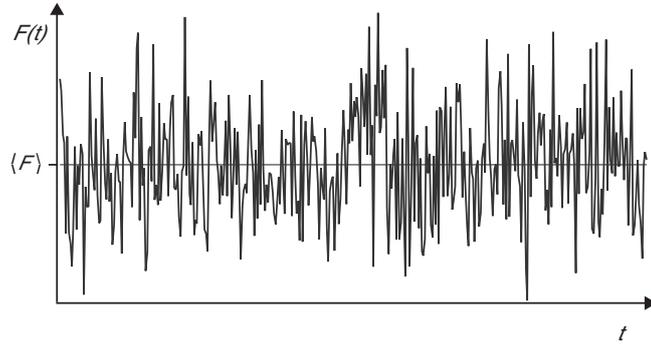


Abbildung 4.6: Das Fluoreszenzsignal  $F(t)$  fluktuiert um den Mittelwert  $\langle F \rangle$ .

Die Teilchenkonzentration sollte einerseits hoch genug sein, um eine gute Signalintensität im Vergleich zum Hintergrund zu gewährleisten, andererseits niedrig genug, um die Diffusion freier Teilchen zu beobachten. Ein guter Kompromiss entspricht etwa einem Teilchen pro Femtoliter im Fokolvolumen  $V_{\text{eff}}$ . Die FCS-Theorie zeigt, dass man die Diffusionskonstante der Teilchen aus ihrer Fluktuation  $\delta N(t)$  ableiten kann. Das Prinzip kann in einem einfachen Modell verstanden werden. Die Zeit, die ein Teilchen benötigt, um in das Fokolvolumen hinein- und herauszudiffundieren, hängt von seiner Diffusionskonstante ab. Je größer der Diffusionskoeffizient ist, desto schneller kann das Teilchen in den Fokus hinein oder aus ihm heraus diffundieren. Dadurch wird eine schnellere Zeitskala die Fluktuationen der Teilchenzahl in  $V_{\text{eff}}$  charakterisieren. Die Analyse der den Fluktuationen zugrundeliegenden Zeitskalen kann durch die Ermittlung einer Autokorrelationsfunktion durchgeführt werden.

Wir nehmen einen konstanten Wert für die Fluoreszenzemission von jedem Teilchen innerhalb des Fokolvolumens an. Durch diese Vereinfachung werden Fluktuationen in der Fluoreszenz aufgrund von Fluktuationen im Absorptionsquerschnitt, in der Quantenausbeute und durch Blinken der Teilchen bewusst vernachlässigt.

Die Teilchenanzahl im Fokus zur Zeit  $t$  kann experimentell durch die detektierte Gesamtfluoreszenz  $F(t)$  bestimmt werden. Die Fluktuation  $\delta F(t) = F(t) - \langle F \rangle$  des Fluoreszenzsignals ist definiert als die Abweichung der Fluoreszenz vom mittleren Fluoreszenzsignal  $\langle F \rangle$ , welches gegeben ist durch:

$$\langle F \rangle = \frac{1}{t_f} \int_0^{t_f} F(t) dt \quad (4.58)$$

Die Teilchenanzahl im Fokus  $N(t)$  kann als Integral über die lokale Teilchenkonzentration  $c(\vec{r}, t)$  geschrieben werden:

$$N(t) = \int_{V_{\text{eff}}} c(\vec{r}, t) d^3 r \quad (4.59)$$

Nun nehmen wir an, dass die Fluktuationen im Fluoreszenzsignal nur durch lokale Änderungen der Konzentration  $\delta c(\vec{r}, t)$  im Fokolvolumen  $V_{\text{eff}}$  bedingt werden. Wenn wir annehmen, dass die durch den Laser angeregten Moleküle in der Probe auch für unsere Detektionsoptik zugänglich sind, können wir die Funktion  $W(\vec{r})$  einführen, in der die räumlichen Verteilungen der Emissions- und Detektionswahrscheinlichkeit zusammengefasst sind. Aufgrund des typi-

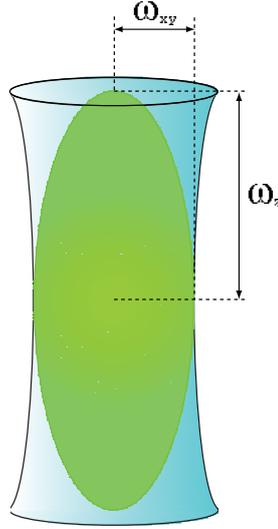


Abbildung 4.7: Das Fokalvolumen  $V_{\text{eff}}$  als Ellipsoid mit den Achsen  $\omega_{xy}$  und  $\omega_z$

schen Intensitätsprofils eines Lasers nehmen wir eine dreidimensionale Gauß'sche Verteilung für  $W(\vec{r})$  an:

$$W(\vec{r}) = W_0 \exp\left(-2(x^2 + y^2)/\omega_{xy}^2\right) \exp\left(-2z^2/\omega_z^2\right) \quad (4.60)$$

$W(\vec{r})$  ist das Produkt aus dem Anregungsprofil des fokussierten Lasers und der räumlichen Limitierung der konfokalen Detektionsoptik.  $\vec{r} = (x, y, z)$  beschreibt die Koordinaten im dreidimensionalen Raum,  $\omega_{xy}$  ist der Radius in der Fokalebene, bei dem die Anregungsintensität des Lasers verglichen mit der im Zentrum auf  $1/e^2$  abgefallen ist. Der Parameter  $\omega_z$  gibt die Ausdehnung des effektiven Detektionsvolumens entlang der  $z$ -Achse an und wird hauptsächlich durch das verwendete Objektiv und die Größe der Blende bestimmt. Anschaulich sind  $\omega_{xy}$  und  $\omega_z$  die Längen der Halbachsen des Ellipsoids, das wir als effektives Probenvolumen betrachten werden (siehe Abb. 4.7).

Die Fluktuation des Fluoreszenzsignals kann geschrieben werden als:

$$\delta F(t) = \eta \int_{V_{\text{eff}}} W(\vec{r}) \cdot \delta c(\vec{r}, t) d^3 r \quad (4.61)$$

Der konstante Wert  $\eta$  ist das Produkt der Quanteneffizienz des Farbstoffs, der Gesamtdetektionseffizienz des Aufbaus und des molekularen Absorptionsquerschnitts.

### 4.3.2 Autokorrelationsfunktion

Wir betrachten die Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität zur Beschreibung der Korrelation des Fluoreszenzsignals mit sich selbst bei unterschiedlichen Zeitverschiebungen  $\tau$  zwischen den betrachteten Fluoreszenzintensitäten. Die normierte Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  für die Fluoreszenzintensität  $F(t)$  ist definiert als:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

$$\begin{aligned}
&= \frac{\langle (\langle F \rangle + \delta F(t)) \cdot (\langle F \rangle + \delta F(t + \tau)) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \\
&= \frac{\langle F(t) \rangle^2 + \langle F \rangle \langle \delta F(t) \rangle + \langle F \rangle \langle \delta F(t + \tau) \rangle + \langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \\
&= 1 + \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} =: 1 + g(\tau)
\end{aligned} \tag{4.62}$$

Beim Übergang von der dritten auf die letzte Zeile geht ein, dass die Fluktuation der Fluoreszenz im Mittel verschwindet:  $\langle \delta F(t) \rangle = \langle \delta F(t + \tau) \rangle = 0$ . Die Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzfluktuationen  $g(\tau)$  ist ein Maß für die Selbstähnlichkeit des Fluoreszenzsignals nach einer Verzögerungszeit  $\tau$ . Für  $\tau = 0$  entspricht  $g(0)$  der Varianz  $\langle (\delta F(t))^2 \rangle$  normiert durch  $\langle F \rangle^2$ . Durch Einsetzen von Gleichung 4.61 in Gleichung 4.62 erhält man für die Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzfluktuationen, die wir nun berechnen wollen:

$$g(\tau) = \frac{\int_V \int_{V'} W(\vec{r}) \cdot W(\vec{r}') \langle \delta c(\vec{r}, \tau) \cdot \delta c(\vec{r}', 0) \rangle d^3r d^3r'}{\langle c \rangle \int_V W(\vec{r}) d^3r} \tag{4.63}$$

Unter der Annahme, dass es den Teilchen möglich ist, frei in alle drei Raumrichtungen zu diffundieren (Brownsche Diffusion), können wir einen Ausdruck für die Konzentrationsfluktuationen  $\delta c(\vec{r}, t)$  ableiten, indem wir die Diffusionsgleichung in drei Dimensionen lösen:

$$\frac{\delta c(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \Delta \delta c(\vec{r}, t) \tag{4.64}$$

mit dem Diffusionskoeffizienten  $D$  und dem Laplace-Operator  $\Delta = \partial^2/\partial x^2 + \partial^2/\partial y^2 + \partial^2/\partial z^2$ . Nun schreiben wir die Konzentrationsfluktuationen  $\delta c(\vec{r}, t)$  als Fourier-Rücktransformierte ihrer Fouriertransformierten  $\delta \tilde{c}(\vec{q}, t)$ :

$$\delta c(\vec{r}, t) = \int \delta \tilde{c}(\vec{q}, t) e^{i\vec{q}\vec{r}} d^3q \tag{4.65}$$

Für die Ableitung dieses Ausdrucks nach der Zeit ergibt sich unter Anwendung der Diffusionsgleichung 4.64:

$$\frac{\partial}{\partial t} \delta c(\vec{r}, t) = \int (-Dq^2 \delta \tilde{c}(\vec{q}, t)) e^{i\vec{q}\vec{r}} d^3q \tag{4.66}$$

Aufgrund dieser Relation lässt sich die Fouriertransformierte schreiben als:

$$\delta \tilde{c}(\vec{q}, t) = \delta \tilde{c}(\vec{q}, 0) \cdot e^{-Dq^2 t} \tag{4.67}$$

Mit Hilfe dieses Ansatzes können wir nun  $\langle \delta c(\vec{r}, \tau) \delta c(\vec{r}', 0) \rangle$  berechnen:

$$\begin{aligned}
\langle \delta c(\vec{r}, \tau) \delta c(\vec{r}', 0) \rangle &= \int \langle \delta \tilde{c}(\vec{q}, 0) \delta c(\vec{r}', 0) \rangle e^{-Dq^2 \tau} e^{i\vec{q}\vec{r}} d^3q \\
&= \int \left[ \frac{1}{2\pi} \int \langle \delta c(\vec{\rho}, 0) \delta c(\vec{r}', 0) \rangle e^{i\vec{q}\vec{\rho}} d^3\rho \right] e^{-Dq^2 \tau} e^{i\vec{q}\vec{r}} d^3q \\
&= \frac{\langle c \rangle}{2\pi} \int \exp(i\vec{q} \cdot |\vec{r} - \vec{r}'| - Dq^2 \tau) d^3q
\end{aligned} \tag{4.68}$$

Dieses Integral lässt sich mittels quadratischer Ergänzung des Exponenten unter Verwendung von  $\int_{-\infty}^{+\infty} \exp(-a^2 x^2) dx = \sqrt{\pi}/a$  berechnen:

$$\langle \delta c(\vec{r}, \tau) \delta c(\vec{r}', 0) \rangle = \frac{\langle c \rangle}{(4\pi D\tau)^{3/2}} \exp\left(-\frac{|\vec{r} - \vec{r}'|^2}{4D\tau}\right) \tag{4.69}$$

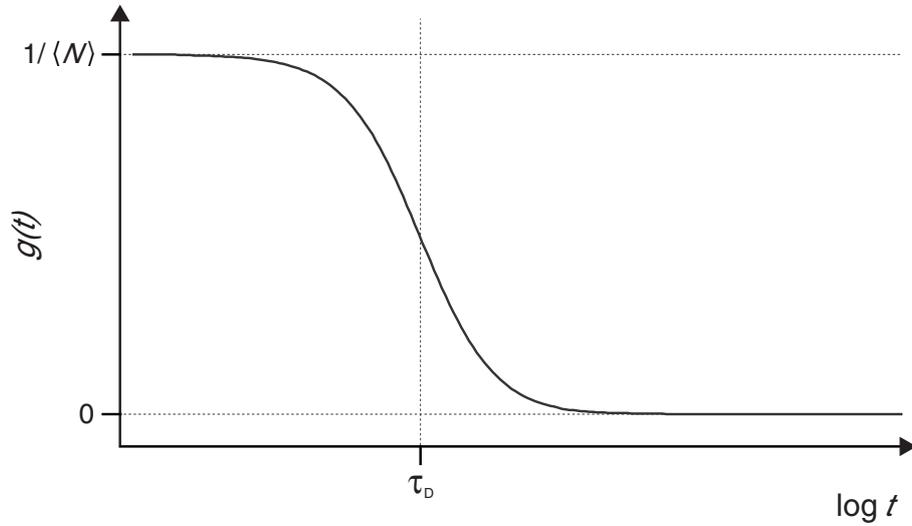


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung der Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzfluktuationen nach Gleichung 4.72. Die relevanten Informationen stecken in  $g(0) = 1/\langle N \rangle$ , der charakteristischen Diffusionszeit  $t = \tau_D$  und dem Strukturparameter  $S$ . Diese Werte lassen sich durch das Anpassen einer entsprechenden Kurve an die gemessene ermitteln (siehe auch Anhang). Für große  $t$  geht  $g(t)$  gegen 0.

Das Integral im Zähler von Gleichung 4.63 wird zu:

$$\begin{aligned} Z(\tau) &= \frac{\langle c \rangle}{(4\pi D\tau)^{3/2}} \int_V \int_{V'} W(\vec{r}) \cdot W(\vec{r}') \exp\left(-\frac{|\vec{r} - \vec{r}'|^2}{4D\tau}\right) d^3r d^3r' \\ &= \frac{W_0^2}{8} \pi^{3/2} \omega_{xy}^4 \omega_z^2 \cdot \frac{1}{\omega_{xy}^2 + 4D\tau} \cdot \frac{1}{\sqrt{\omega_z^2 + 4D\tau}} \end{aligned} \quad (4.70)$$

Nun berechnen wir den Nenner aus Gleichung 4.63:

$$\begin{aligned} \left( \langle c \rangle \int_V W(\vec{r}) d^3r \right)^2 &= \left( \langle c \rangle W_0 \int_V \exp(-2(x^2 + y^2)/\omega_{xy}^2) \exp(-2z^2/\omega_z^2) d^3r \right)^2 \\ &= \frac{\langle c \rangle^2 W_0^2}{8} \pi^3 \omega_{xy}^4 \omega_z^2 \end{aligned} \quad (4.71)$$

Sodann können wir Zähler und Nenner in Gleichung 4.63 einsetzen und erhalten:

$$\begin{aligned} g(\tau) &= \frac{1}{\langle c \rangle \pi^{3/2} \omega_{xy}^2 \omega_z} \cdot \frac{1}{1 + \frac{4D}{\omega_{xy}^2} \tau} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\omega_{xy}^2}{\omega_z^2} \cdot \frac{4D}{\omega_{xy}^2} \tau}} \\ g(\tau, \tau_D) &= \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{1 + (\tau/\tau_D)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + 1/S^2 \cdot (\tau/\tau_D)}} \end{aligned} \quad (4.72)$$

Hierbei haben wir die charakteristische Diffusionszeit  $\tau_D$

$$\tau_D = \frac{\omega_{xy}^2}{4D} \quad (4.73)$$

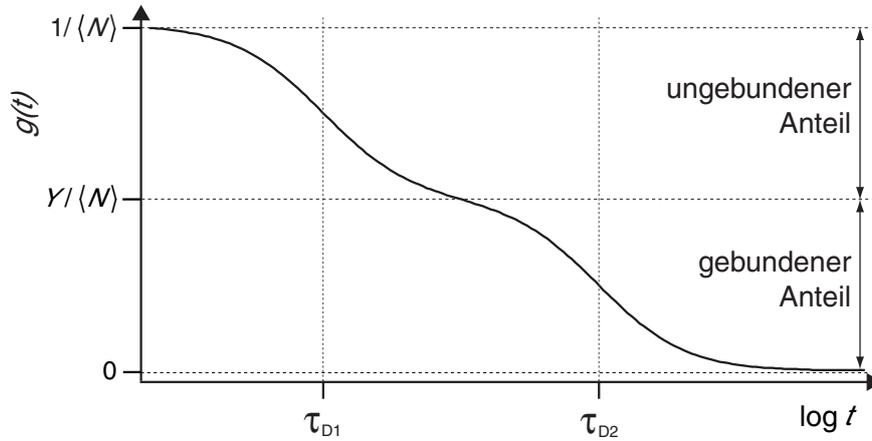


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung der Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzfluktuation nach Gleichung 4.75. Es liegen zwei fluoreszierende Komponenten mit unterschiedlichen Diffusionskonstanten  $\tau_{D1}$  und  $\tau_{D2}$  vor. Dies ist z. B. der Fall bei einem fluoreszenzmarkierten Aptamer, das zu einem bestimmten Anteil an ein nichtfluoreszierendes Protein bindet, wodurch sich die charakteristische Diffusionszeit erhöht. Dem Verlauf dieser Kurve kann man die beiden charakteristischen Diffusionszeiten und auch den Anteil der beiden Komponenten, gekennzeichnet durch die Pfeile rechts, entnehmen.

und den sogenannten Strukturparameter  $S$  eingeführt:

$$S = \omega_z / \omega_{xy} \quad (4.74)$$

Die mittlere Teilchenzahl im Detektionsvolumen  $\langle N \rangle$  erhalten wir aus  $\langle N \rangle = \langle c \rangle V_{\text{eff}} = \langle c \rangle \pi^{3/2} \omega_{xy}^2 \omega_z$ . den typischen Verlauf einer solchen Autokorrelationsfunktion zeigt Abb. 4.8.

Liegen in der Lösung zwei fluoreszierende Komponenten mit unterschiedlichen charakteristischen Diffusionszeiten vor, die nicht miteinander wechselwirken, lässt sich Ergebnis 4.72 leicht erweitern.  $g$  wird zu:

$$g(t, \tau_{D1}, \tau_{D2}) = \frac{1}{N} \left[ (1 - Y) \cdot \frac{1}{1 + (t/\tau_{D1})} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + 1/S^2 \cdot (t/\tau_{D1})}} + Y \cdot \frac{1}{1 + (t/\tau_{D2})} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + 1/S^2 \cdot (t/\tau_{D2})}} \right] \quad (4.75)$$

hierbei ist  $1 - Y$  der Anteil an Molekülen, die sich mit der charakteristischen Diffusionszeit  $\tau_{D1}$  und  $Y$  der derer, die sich mit  $\tau_{D2}$  bewegen. Für eine genauere Herleitung siehe [107]. Eine schematische Darstellung einer solchen Autokorrelationskurve zeigt Abb. 4.9.

### 4.3.3 Triplett-Zustände

Außer durch Fluoreszenzemission können die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ihre Anregungsenergie durch sogenanntes „Inter system crossing“ (ISC) verlieren (siehe Abb. 4.10).

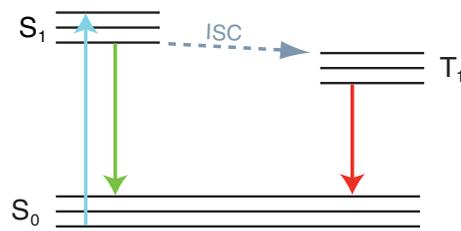


Abbildung 4.10: Jablonski-Diagramm zur Erläuterung des Triplett-Zustands eines Fluoreszenzfarbstoffs. Gezeigt sind der Grundzustand  $S_0$  (Singulett), der erste elektronisch angeregte Singulett-Zustand  $S_1$  und der erste Triplett-Zustand  $T_1$ . Der Übergang von einem Singulett-Zustand in einen Triplett-Zustand ist quantenmechanisch verboten. Aufgrund der Spin-Bahn-Wechselwirkung ergibt sich jedoch eine endliche Wahrscheinlichkeit für dieses „inter system crossing“ (ISC). Die Relaxation von  $T_1$  in den Grundzustand  $S_0$  besitzt ebenfalls eine geringe Wahrscheinlichkeit, weshalb der Triplett-Zustand eine relativ große Lebensdauer hat. Wird bei diesem Übergang ein Photon emittiert handelt es sich um Phosphoreszenz (roter Pfeil), der grüne Pfeil repräsentiert die Fluoreszenz.

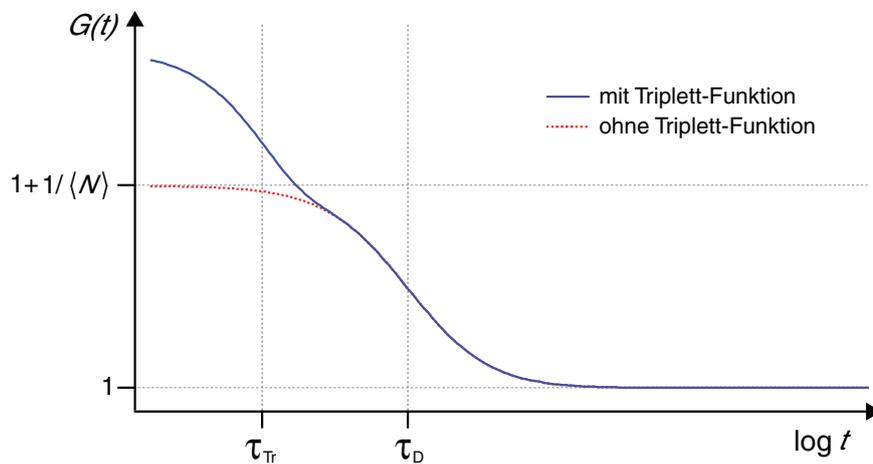


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der Autokorrelationsfunktion unter Berücksichtigung der Triplett-Zustände. Für diesen Graphen wurde ein Triplett-Anteil  $\Theta$  von 40% gewählt, die Relaxationszeit des Triplett-Zustands  $\tau_{Tr}$  beträgt 3% der charakteristischen Diffusionszeit  $\tau_D$  der gezeigten fluoreszierenden Spezies.

Der Übergang aus dem angeregten Singulett-Zustand in einen Triplett-Zustand ist quantenmechanisch verboten. Aufgrund der Spin-Bahn-Wechselwirkung ergibt sich jedoch eine endliche Wahrscheinlichkeit für ISC. Er tritt oft dann auf, wenn Vibrationsenergieniveaus des Triplett-Zustands mit den untersten Energieniveaus von  $S_1$  überlappen. Nach einem ISC-Übergang hat das Molekül im Triplett-Zustand keinen leichten Weg zurück in energetisch niedrigeren Grundzustand  $S_0$ , denn dieser Übergang ist ebenso verboten. Wenn dieser unwahrscheinliche Übergang stattfindet, der deshalb relativ langsam ist und sich im Bereich von Mikrosekunden abspielt, handelt es sich um Phosphoreszenz (roter Pfeil in Abb. 4.10) – im Gegensatz zur Fluoreszenz (grüner Pfeil). Folglich muss die Bildung von Triplett-Zuständen bei den verwendeten Farbstoffen auch bei den verwendeten relativ niedrigen Anregungsenergien berücksichtigt werden. Die Relaxationszeit des Triplett-Zustands  $\tau_{\text{Tr}}$  hängt von dem verwendeten Farbstoff ab und liegt wie schon erwähnt im Bereich von wenigen Mikrosekunden. Die Autokorrelationsfunktion  $G$  kann aus diesem Grund folgendermaßen erweitert werden [104, 107]:

$$G(t) = 1 + g(t) \cdot g_{\text{Tr}}(t, \tau_{\text{Tr}}) \quad (4.76)$$

mit der Triplettfunktion:

$$g_{\text{Tr}}(t, \tau_{\text{Tr}}) = 1 + \frac{\Theta \cdot \exp(-t/\tau_{\text{Tr}})}{1 - \Theta} \quad (4.77)$$

wobei  $\Theta$  der Triplett-Anteil ist. Den typischen Verlauf einer entsprechenden Autokorrelationsfunktion zeigt Abb. 4.11.



# 5 Experimente, Ergebnisse und Interpretation

## 5.1 Einzelmolekülmessungen an den DNA-Tweezers

In diesem Kapitel werden zunächst Fluoreszenzmessungen an einem Ensemble der in Kapitel 3.2.1 vorgestellten „DNA-Tweezers“ durchgeführt, anschließend wird ihr Aufbau in Gelektrophoreseexperimenten untersucht und schließlich liefern FRET-Messungen an einzelnen Tweezers detaillierte Verteilungen der dabei auftretenden FRET-Effizienzen, die Rückschlüsse auf die vorhandenen Konformationen und Konfigurationen der Tweezers zulassen.

### 5.1.1 Ensemblemessungen an den DNA-Tweezers

Die zeitliche Entwicklung der Transfereffizienz  $f_E$  eines Ensembles von DNA-Tweezers beim Übergang vom offenen Zustand in den geschlossenen Zustand durch Zugabe von F und (zumindest teilweise) zurück in den offenen Zustand ( $+\bar{F}$ ) ist in Abb. 5.1 gezeigt. Ursprünglich wird der offene Zustand durch eine FRET-Effizienz von etwa 20% gekennzeichnet. Nach Zugabe von F wird eine Transfereffizienz von etwa 60% erreicht. Mehr als diese Mittelwerte können aus Ensemblemessungen nicht bestimmt werden. Entsprechend kann ein mittlerer Abstand zwischen Donor und Akzeptor von  $\sim 6.4$  nm (offen, vgl. 6.0 nm in [30]) bzw.  $\sim 4.7$  nm (geschlossen) bestimmt werden, aber über die Verteilung der tatsächlich auftretenden Abstände können wir mit dieser Methode nichts lernen. Ob sich eventuell Dimere bilden entzieht sich bislang ebenfalls unserer Kenntnis. Hierüber erhalten wir jedoch erste Anhaltspunkte aus der Gelektrophorese im folgenden Abschnitt. Zum Verlauf der Transfereffizienz lässt sich sagen, dass er insgesamt verständlich ist: Im offenen Zustand können die Arme frei fluktuieren, wodurch Donor und Akzeptor im Mittel deutlich voneinander getrennt sind, weshalb der Transfer nicht sehr effizient ist. Durch das Schließen kommen die Arme aufeinander zu liegen, was die Entfernung verringert und den Transfer deutlich erhöht. Warum die Transfereffizienz nicht bis auf 80-90% ansteigt, wird noch zu erläutern sein. Nach Zugabe von  $\bar{F}$  öffnen sich wieder zunehmend Tweezers, die Effizienz sinkt, allerdings nicht so deutlich wie sie gestiegen ist und es ist auch nicht absehbar, dass das Ausgangsniveau von 20% wieder erreicht wird. Die Tatsache, dass das Abziehen des Strangs F von den geschlossenen Tweezers Zeit braucht, mag am Vorgang der Kreuzungspunktwanderung liegen (siehe Kapitel 4.1.3). Allerdings kann durch das dort erklärte Modell nicht erklärt werden, warum bei den ursprünglichen DNA-Tweezers-Experimente die Ablösung etwa gleich schnell wie das Schließen abläuft und dies bei meinen Experimenten nicht der Fall ist. Zwar wurden bei Yurke et al. [30] 20-fach höhere DNA-Konzentrationen verwendet, aber nach unseren theoretischen Überlegungen sollte das sich auf beide Reaktionsschritte in gleicher Weise auswirken. Eine weitere Ursache hierfür

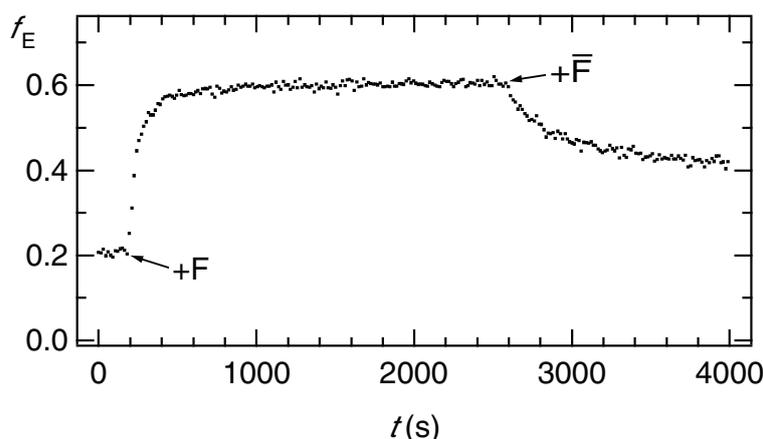


Abbildung 5.1: FRET-Effizienz während des Schaltens der DNA-Tweezers durch die Stränge F und  $\bar{F}$ . Diese Daten wurden mittels des Spektrofluorometers an einer Ensembleprobe ermittelt. Donor- und Akzeptoremission wurden dabei alle 15 s ermittelt.

wie auch dafür, dass das Anfangsniveau nach Zugabe von  $\bar{F}$  nicht erreicht wird, kann darin liegen, dass die Stöchiometrie zwischen Tweezers, F und  $\bar{F}$  nicht exakt erfüllt ist. Zudem können Fehlhybridisierungen auftreten und zu irreversiblen Strukturen oder Multimerbildung bei den Tweezers führen. Für zukünftige DNA-Aktuatoren und Maschinen wäre es von Interesse, die Abhängigkeit der Schaltgeschwindigkeit von der Konzentration der DNA-Stränge systematisch zu untersuchen.

### 5.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese der DNA-Tweezers

Den Aufbau der DNA Tweezers aus den einzelnen Strängen zeigt die Gelelektrophorese in Abb. 5.2. Hybridisierung der Einzelstränge B (Bahn 1) und A (Bahn 2) führt zu einer Bandenverschiebung (Bahn 3). Dasselbe gilt für die Hybridisierung von C an den Komplex A-B, auch diese führt zu einer Verschiebung für die Tweezers im offenen Zustand (Bahn 4). Durch Zugabe des Treibstoffstrangs F werden die Tweezers geschlossen (Bahn 5), es wird aber auch die Bildung von Dimeren (und eventuell höheren Multimeren) beobachtet. Zur Orientierung zeigt Bahn 6 eine DNA Leiter. Die Intensitätsanalyse (Abb. 5.2 rechts) bezieht sich auf Bahn 5. Ihr kann entnommen werden, dass etwa 54% der Tweezers unter diesen Reaktionsbedingungen richtig geschlossen sind, aber auch mindestens 20% Multimere bilden. Die korrekte Bildung und das Schließen der Tweezersstruktur hängen also stark von den Reaktionsbedingungen ab. Zur genaueren Untersuchung wurde eine weitere nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 5.3). Mit den in diesem Gel gezeigten Proben wurden anschließend auch die Einzelmolekülmessungen durchgeführt. Bahn a enthält die offene Tweezersstruktur zusammengesetzt aus den Strängen A, B und C nach einem Hochtemperatur-Annealing Schritt (5 Minuten bei 90°C gefolgt von Abkühlen auf 4°C über 1.5 h) in TE-Puffer. Die beherrschende Bande ist die der offenen Tweezers, aber es gibt auch unvollständige Strukturen, die aus A und einem der Stränge B oder C bestehen. Die Bahnen b und c enthalten die Ergebnisse der Hybridisierungsreaktion der Probe aus Bahn a mit dem Treibstoffstrang F nach einer Stunde in TE-Puffer bzw. in TE-Puffer mit 1 M NaCl. Die

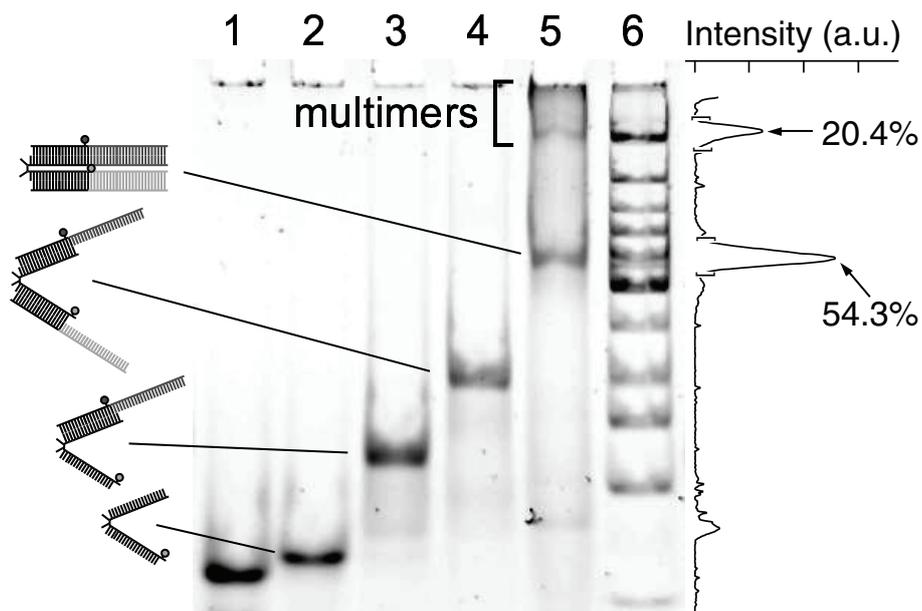


Abbildung 5.2: Polyacrylamid Gelelektrophorese der Tweezers: Bahn 1) Strang B, 2) Strang A, 3) A+B, 4) (A+B)+C (offener Zustand), 5) ((A+B)+C)+F (geschlossener Zustand), 6) DNA-Leiter (Low MW DNA ladder: 25;50;75;100;150;**200**;250;300;350;500;766bp). Die Paare in Klammern wurden eine Stunde lang inkubiert, bevor die nächste Komponente zugegeben wurde. Die Konzentration, die zur Hybridisierung verwendet wurde, betrug  $1 \mu\text{M}$  für jedes Oligonukleotid, der TE-Hybridisierungspuffer enthielt  $1 \text{ M}$  NaCl. Die Gesamtmenge an DNA beträgt für jede Bahn etwa  $50 \text{ ng}$ . Rechts ist die Intensitätsanalyse von Bahn 5) gezeigt.

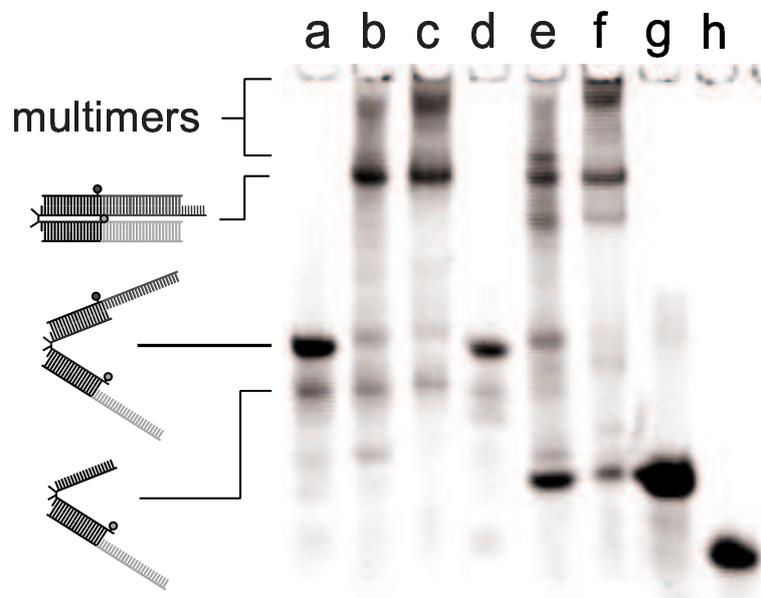


Abbildung 5.3: Polyacrylamid-Gelelektrophorese von offenen und geschlossenen Tweezers, die unter verschiedenen Bedingungen präpariert wurden. Bahn a) Tweezers-Probe, die durch Hochtemperatur-Annealing (siehe Text) von Strängen A, B und C in TE-Puffer präpariert wurde. Bahn b) Resultat 1h nach der Zugabe einer stöchiometrischen Menge Treibstoffstranges F zur Probe in Bahn a in TE-Puffer bei Raumtemperatur. Bahn c) wie in b, aber in TE-Puffer + 1 M NaCl. Bahn d) Tweezers-Probe präpariert in TE-Puffer bei Raumtemperatur ohne Annealing: zuerst hybridisieren A und B 1 h lang und anschließend C und der A-B-Komplex eine weitere Stunde. Bahn e) F wurde äquimolar zur Probe in Bahn d zugefügt und während einer Stunde bei Raumtemperatur in TE-Puffer inkubiert. Bahn f) wie in e, aber mit 1 M NaCl im Puffer. Bahn g) Treibstoffstrang F. Bahn h) Strang B.

Reaktion unter Niedrigsalzbedingungen war nach einer Stunde noch nicht abgeschlossen und eine beträchtliche Menge F liegt noch unhybridisiert vor. In beiden Fällen sieht man eine starke, hochmolekulargewichtige (hmw) Bande, die der geschlossenen Tweezersstruktur entspricht. Einige weitere hmw-Banden treten auf, die Multimerstrukturen zugeordnet werden, wie in Abb. 5.6c-e exemplarisch dargestellt. Bahn d enthält die offenen Tweezers, die in TE gebildet wurden ohne Hochtemperatur-Annealing: Gleiche Mengen von A und B wurden bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert und anschließend wurde eine äquimolare Menge von C zugegeben und eine weitere Stunde inkubiert. In Bahn e wurde anschließend der Treibstoffstrang F äquimolar in TE zugegeben. In Bahn f enthielt der TE-Puffer zusätzlich 1 M NaCl, ansonsten wurde wie für Bahn e vorgegangen. Diese Bahn ist also vergleichbar mit Bahn 5 aus Abb. 5.2.

Die Ergebnisse dieser Schließreaktionen führen zu sehr unterschiedlichen Verteilungen zwischen den verschiedenen Spezies im Reaktionsvolumen. Abb. 5.3 zeigt, dass die Zusammensetzung einer (geschlossenen) DNA-Tweezers-Probe eine komplexe Verteilung von mehreren unterschiedlichen Strukturen enthält, die aus den Einzelsträngen zusammengesetzt sind und von der „Geschichte“ der Probe, den Pufferbedingungen, der Annealingprozedur und der Reaktionszeit abhängen. In einem Ensemble-Fluoreszenzexperiment wird eine Superposition der verschiedenen Fluoreszenzsignale von den einzelnen Spezies gemessen, was es schwierig bis unmöglich macht, quantitative Aussagen über die Eigenschaften einer einzelnen Spezies zu machen. Um dieses Problem zu lösen, untersuchen wir die DNA Tweezers in Einzelmolekülexperimenten.

### 5.1.3 FRET-Experimente an einzelnen Donor-Akzeptor-Paaren

Einzelpaar-FRET-Messungen wurden durchgeführt, um ein besseres quantitatives Verständnis der Tweezers-Konformation im flexiblen offenen Zustand und um Einblick in die Verteilung der Subpopulationen in der Probe mit geschlossenen Tweezers zu gewinnen. Die Messmethode wird in Kapitel 3.5.1 vorgestellt und erläutert, auf den relevanten theoretischen Hintergrund wird in Kapitel 4.2.3 kurz eingegangen.

#### Die Tweezers im offenen Zustand

Abb. 5.4 zeigt die Histogramme der FRET-Effizienzen und der Donor-Akzeptor-Separation, die aus Proben mit DNA-Tweezers im offenen Zustand bei vier unterschiedlichen Salzkonzentrationen erhalten wurden (ohne Zugabe von Salz, 10 mM NaCl, 100 mM NaCl, 1 M NaCl). Die offenen Tweezers entsprechen der Probe in Bahn a in Abb. 5.3 mit einer anschließenden 50000-fachen Verdünnung im entsprechenden Puffer. In jedem Fall erhalten wir eine unimodale Verteilung. Wie aus Messungen am Ensemble erwartet wird, sind die FRET-Effizienzen im offenen Zustand der Tweezers niedrig. Gauss-Fits an die FRET-Effizienz Histogramme in Abb. 5.4 haben ihr Maximum bei 1.7 %, 2.1 %, 2.5 % und 3.9 % für 0 mM, 10 mM, 100 mM bzw. 1 M NaCl. Der letzte Wert von 3.9% unterscheidet sich deutlich von der Transfereffizienz von ca. 20% bei der Ensemble Messung (Abb. 5.1). Die  $f_E$ -Werte bei Ensemblemessungen sind nicht jedoch erfahrungsgemäß nicht so stabil und zuverlässig wie dies bei den Einzelmolekülmessungen der Fall ist. Einzelmolekül-Kontrollexperimente mit denselben Farbstoffen, die über Polyprolin verbunden sind, zeigen bei denselben unterschiedlichen Salzkonzentrationen keine Änderung der FRET-Effizienz, was verifiziert, dass die Eigenschaften der Farbstoffe und des Puffers nicht signifikant durch die Salzkonzentration geändert werden.

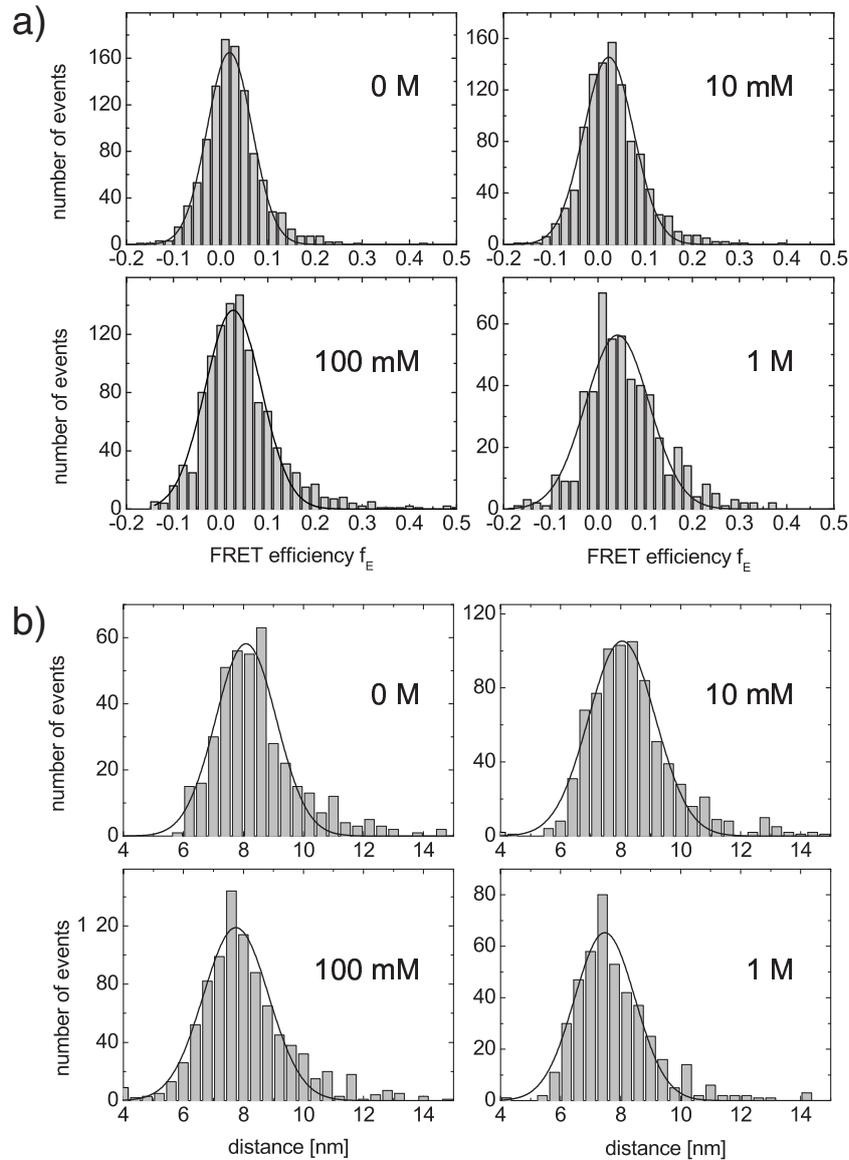


Abbildung 5.4: a) Histogramme der FRET-Effizienzen aus einer „Burst“-Analyse von spFRET/PIE-Experimenten an offenen Tweezers in Puffer mit 0 mM, 10 mM, 100 mM und 1 M NaCl. Bei höheren Salzkonzentrationen verschiebt sich das Maximum der FRET-Effizienzen zu höheren Werten. Das bedeutet, dass der durchschnittliche Abstand zwischen den beiden Farbstoffen von mindestens 10.0 nm auf etwa 8.7 nm verringert, wie die Histogramme der Donor-Akzeptor-Abstände in b) zeigen (Erläuterungen siehe Text). Die Verteilungen der Effizienzen/Abstände sind unimodal. Jeder Datensatz wurde durch eine Gaußkurve gefittet (durchgezogene Linien).

Aus den Maxima der FRET-Effizienz-Histogramme wird die Donor-Akzeptor-Entfernung zu 10.0 nm, 9.7 nm, 9.4 nm und 8.7 nm für 0 mM, 10 mM, 100 mM bzw. 1 M NaCl Konzentrationen berechnet. Um die Entfernung mittels FRET so genau messen zu können, müssen wir  $R_0$  entsprechend genau bestimmen. Wir haben  $R_0$  für die von uns verwendeten an die DNA angehängten Farbstoffe unter experimentellen Bedingungen bestimmt ( $R_0 = 5.1$  nm) und einen Orientierungsfaktor von  $2/3$  angenommen. Die ermittelten Entfernungen sind vergleichbar mit denen aus Ensemblesmessungen bestimmten [30]. Obwohl wir die Entfernungen mit der größtmöglichen Genauigkeit ermittelt haben, geben die absoluten Werte nur eine Vorstellung der tatsächlichen D-A-Distanz. Die im Folgenden diskutierten Ergebnisse und Schlussfolgerungen hängen aber nicht von den exakten Absolutwerten der Donor-Akzeptor-Entfernung ab. PIE gewährleistet, dass die niedrige FRET-Effizienz, die wir messen, nur von DNA-Komplexen kommt, die fluoreszenzaktive Donor- und Akzeptormoleküle enthalten. Um die untere Auflösungsgrenze unseres spFRET/PIE Systems zu bestimmen, haben wir ein Testexperiment mit 60 bp dsDNA durchgeführt, die an ihrem 5'- und 3'-Ende mit einem gleichartigen Farbstoffpaar markiert ist (Atto 532 und Atto 647). Die aus dieser Struktur (mit einem nominalen Abstand von 20 nm zwischen den Farbstoffen) erhaltene FRET-Effizienz beträgt  $f_E = 2.2\%$ . Das bedeutet für unsere Ergebnisse, dass die Entfernung zwischen den Farbstoffen der Tweezers bei 0 mM NaCl auch größer sein kann als 10.0 nm.

Auf jeden Fall wird bei allen durchgeführten Messungen übereinstimmend eine Abnahme des Abstands zwischen den Tweezersarmen nach Zugabe von NaCl zum Puffer beobachtet. Diese Tendenz ist leicht zu erklären durch die gegenseitige elektrostatische Abstoßung der beiden stark geladenen Tweezersarme. Die relevante Längenskala über die sich die Arme gegenseitig elektrostatisch abstoßen ist die Debye-Abschirmlänge (siehe Kapitel 3.3.1):

$$l_D = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T}{2 \cdot 10^3 e^2 N_A c}} \quad (5.1)$$

wobei  $c$  die Konzentration der einwertigen Ionen in mol/l ist - sinkt von fast 10 nm bei 1 mM Salz auf gerade noch 0.3 nm bei 1 M Salzkonzentration. Die Vorstellung, dass statische Abstoßung zwischen den DNA-Armen die Konformationsdynamik der DNA-Tweezers beeinflusst ist konsistent mit der Tatsache, dass in Messungen ohne zugefügtes Salz nur äußerst selten Fluoreszenzsignale auftraten, die Energietransfereffizienzen über  $\approx 30\%$  entsprechen. Bei höheren Salzkonzentrationen, insbesondere 100 mM, scheinen sich die Arme gelegentlich zu schließen, was man an den vereinzelt auftretenden höheren FRET-Effizienzen erkennt.

### Die Tweezers im geschlossenen Zustand

Eine ganz andere Verteilung der FRET-Effizienzen wird für die „geschlossenen“ Tweezers erhalten. SpFRET/PIE-Messungen wurden an derselben Probe durchgeführt, die in Bahn c in Abb. 5.3 verwendet wurde. Das ermittelte FRET-Histogramm zeigt Abb. 5.5a. Drei Subpopulationen sind zu sehen: Ein Peak bei hohen FRET-Effizienzen ( $f_E = 90.0\%$ ) aufgrund der reduzierten Entfernung zwischen den Farbstoffen im geschlossenen Zustand, ein Teil mit niedriger Transfereffizienz ( $f_E = 4.2\%$ ), und bemerkenswerterweise ein dritter Anteil mit einer breiten Verteilung bei mittleren FRET-Werten ( $f_E = 37.7\%$ ). Dies erklärt nun, warum der bei den Ensemble-Messungen ermittelte Wert von ca. 60% (Abb. 5.1) nicht höher liegt. Obwohl wir die Tweezers als geschlossen ansehen, liegen diese nicht in einer einzelnen Struktur vor, sondern in drei Subpopulationen mit unterschiedlichen FRET-Effizienzen.

Die entsprechende Abstandsverteilung zeigt Abb. 5.5b. Der Anteil bei hoher Transfereffizienz

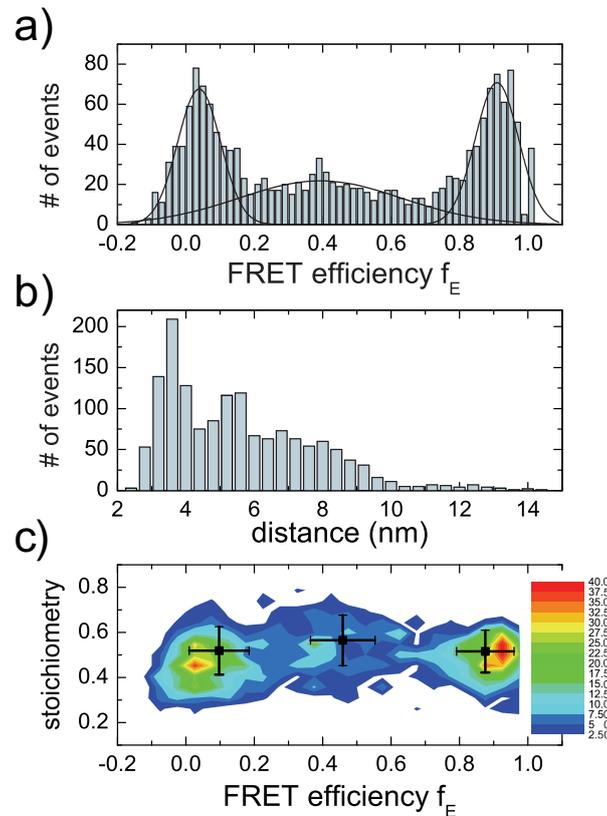


Abbildung 5.5: a) FRET-Effizienz- und b) Abstandshistogramm der geschlossenen Tweezers in TE Puffer mit 1 M NaCl. Es werden drei Subpopulationen beobachtet: Ein ausgeprägter Peak bei hohen FRET-Effizienzen ( $f_E$ ), eine breite Verteilung bei mittleren  $f_E$  Werten und ein Peak bei niedrigen FRET-Effizienzen. Diese Anteile enthalten Beiträge aus einer Vielfalt an Konstrukten in der „geschlossenen“ Tweezers-Probe (siehe Text). Der Peak bei hoher Transfereffizienz enthält richtig und vollständig geschlossene Tweezersstrukturen, in denen der Donor- und der Akzeptorfarbstoff etwa 3-4 nm entfernt sind (siehe Abb. 5.6d). Die beiden anderen Teile enthalten auch Multimer, aber mit unterschiedlichen Verhältnissen zwischen Tweezers- und Treibstoffsträngen, und / oder unvollständigen Donor- und Akzeptormarkierungen. Ausserdem können vermutlich auch unvollständig geschlossene Tweezers beobachtet werden. c) Eine Analyse der Stöchiometrie der Farbstoffmarkierung, Gleichung 5.1.3, die den FRET-Effizienzen in a) entspricht. Der Anteil mittlerer FRET-Effizienz hat einen leicht erhöhten Stöchiometriewert, was einen Beitrag von Dimer-Strukturen mit mehr Donor- als Akzeptorfarbstoffen bedeutet. Die drei schwarzen Rechtecke mit Fehlerbalken stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen der FRET-Effizienz und Stöchiometrie dar für Moleküle mit einer FRET-Effizienz unter 0.2, zwischen 0.2 und 0.65, und oberhalb von 0.65.

entspricht einem Abstand von 3.5 nm zwischen den beiden Farbstoffen. Dieser Wert stimmt mit dem in früheren Messungen gefundenen überein und ist abhängig von der tatsächlichen relativen Position der Farbstoffe im geschlossenen Zustand. Hier sehen wir noch einmal die Begrenzung der Ensemblemessungen: der dort ermittelte mittlere Abstand von 4.7 nm ist zwar nicht völlig falsch, kommt aber aus der Superposition von drei tatsächlichen Abständen im Bereich von 3.5 – 8.4 nm zustande und hätte uns eher vermuten lassen, dass der Großteil der Tweezers korrekt geschlossen ist, bei einem größeren Abstand von Donor und Akzeptor. A priori erwartet man für den geschlossenen Zustand einen Wert im Bereich zwischen 0 nm und 6 nm (null- bis zweimal den Durchmesser des DNA Duplex plus/minus der Länge der Farbstoffspacer). Dieselbe FRET-Effizienz wird allerdings auch erwartet für Tweezers-Dimere, die aus zwei Tweezersstrukturen gebildet werden, die durch zwei Treibstoffstränge verbunden werden (siehe Abb. 5.6d)

Der Anteil bei niedrigen FRET-Effizienzen zeigt dieselben  $f_E$ -Werte wie die offenen Tweezers. Der niedrig-FRET-Peak verschwindet allerdings selbst dann nicht, wenn der Schließstrang F im deutlichen Überschuss gegenüber den Tweezers zugefügt wird. Daher kann dieser Anteil kaum als eine Subpopulation von Tweezers, die einfach noch geöffnet sind, erklärt werden. Da wir PIE verwenden, ist sichergestellt, dass die analysierten Komplexe aktive Donor- und Akzeptormoleküle haben, was die Möglichkeit ausschließt, dass der niedrig-FRET-Peak von Tweezers kommt, die ausschließlich mit einem Donor markiert sind. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass ein Teil der offenen Tweezers an zwei Treibstoffstränge bindet (Abb. 5.6c). Die Wahrscheinlichkeit für das Binden von zwei Treibstoffsträngen kann erhöht sein aufgrund der Tatsache, dass die Arme der offenen Stränge wenig fluktuieren, wenn sie nahe beieinander sind, was aus den Einzelpaar-FRET Verteilungen ersichtlich ist. Eine weitere mögliche Erklärung für den Nieder-FRET-Anteil bei den geschlossenen Tweezers ist die Bildung unvollständiger Dimere, wenn z. B. ein Treibstoffstrang zwei Tweezersstrukturen miteinander verbindet (Abb. 5.6e). SpFRET/PIE-Messungen zeigen die Existenz einer dritten Subpopulation mit mittleren FRET-Effizienzwerten. Die spFRET/PIE-Methode erlaubt uns, für die verschiedenen FRET-Effizienzwerte die Label-Stöchiometrie zu berechnen wie sie in Lee et al. definiert wurde [121]. Abb. 5.5c zeigt eine „Landkarte“ der Label-Stöchiometrie/FRET-Effizienz-Landschaft unserer Experimente. Der Stöchiometriefaktor gibt das Verhältnis Anzahl der aktiven Donormoleküle zur Gesamtzahl der aktiven Farbstoffe an und wird experimentell bestimmt durch:

$$S = \frac{\alpha F_{DA} + F_{AD}}{\alpha F_{DA} + F_{AD} + F_{AA}} \quad (5.2)$$

wobei  $F_{AA}$  die Fluoreszenzintensität des Akzeptors bei direkter Anregung mit  $\lambda = 635$  nm ist (siehe Abb. 3.18 in Kapitel 3.5.1). Die Anteile niedriger und hoher FRET-Effizienzen sind ungefähr gleichermaßen mit Donor- und Akzeptorfarbstoffen markiert ( $S \approx 0.5$ ). Dies rechtfertigt im Nachhinein unsere implizite Annahme, dass der Detektionskorrekturfaktor  $\alpha = 1$  verwendet werden kann. Wäre dies nicht der Fall, würden sich die Werte von  $S$  bei den Anteilen niedriger und hoher FRET-Effizienzen unterscheiden [122, 121]. Der Anteil mittlerer FRET-Effizienzen zeigt dagegen eine Verschiebung zu höheren Stöchiometriewerten, d.h. die Strukturen enthalten mehr Donoren als Akzeptoren. Da der durchschnittliche Stöchiometriewert der mittleren FRET-Population zwischen  $\sim 0.5$  und  $\sim 0.66$  liegt, ist die Stöchiometrie dieses Zustands gemischt. Das legt nahe, dass der mittlere FRET-Anteil zum Teil aus Dimeren wie in Abb. 5.6e entsteht, in welchen ein Akzeptor-Farbstoff fehlt oder nicht fluoresziert. Ein anderer Teil dieser Subpopulation hat 1:1-Stöchiometrie und kann von unvollständigem Schließen der Tweezers durch den Treibstoffstrang herrühren, wie es in Abb. 5.6f gezeigt ist. Wenn ein

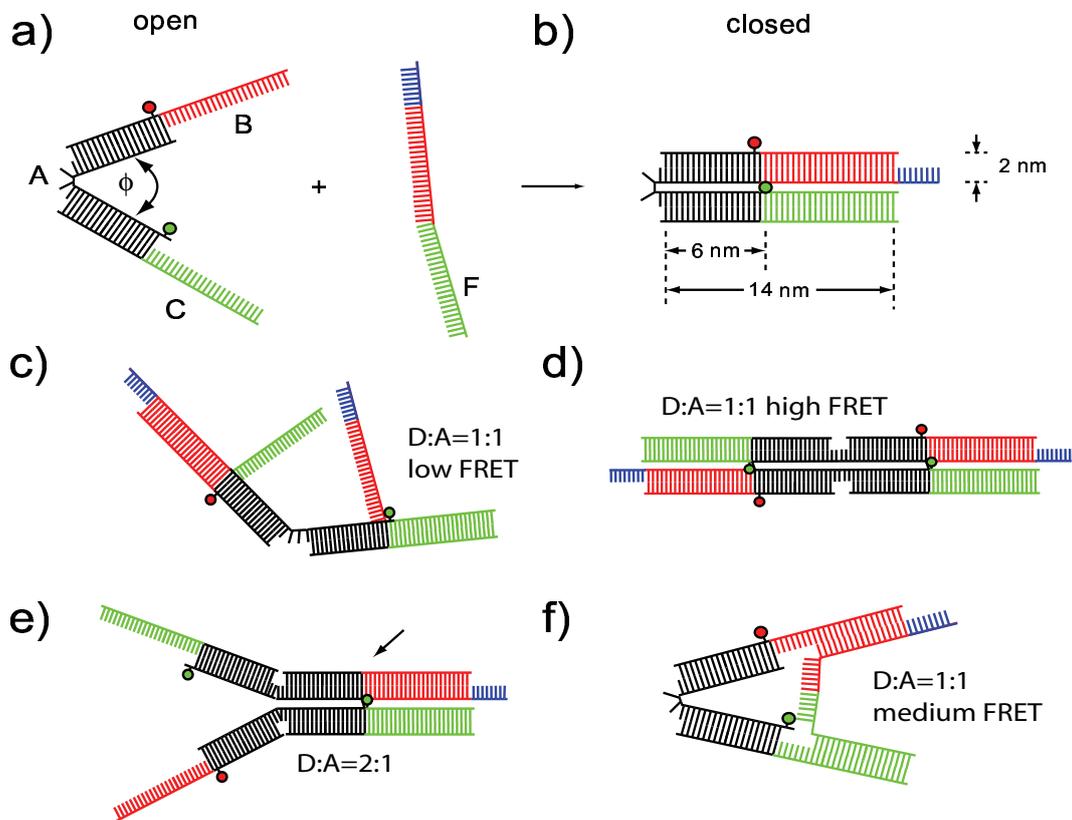


Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der DNA Tweezers. a) Die offenen Tweezers bestehen aus den drei Einzelsträngen A, B und C. b) Durch Zugabe des „Treibstoffstrangs“ F schließen sich die Tweezers, die Arme werden zusammengezogen. c-f) Unerwünschte Hybridisierungsprodukte, die aus der Reaktion von Treibstoffsträngen mit den Tweezers entstehen. c) Reaktion von zwei Treibstoffsträngen mit einem Tweezer. d) Dimer aus zwei Tweezers, die durch zwei Treibstoffstränge verbunden sind, was zu einer äquivalenten Anordnung von Donoren und Akzeptoren führt, wie sie für ordentlich geschlossene Tweezers erwartet wird. e) Zwei Tweezers, die durch einen Treibstoffstrang verbunden sind. Zusätzlich wird angenommen, dass einer der Tweezers unvollständig fluoreszenzmarkiert ist. Der Pfeil zeigt die Stelle, an der das Akzeptormolekül fehlt. f) Eine sterisch behinderte Tweezersstruktur, die nur teilweise geschlossen ist. Die weitere Hybridisierung der verbleibenden ungepaarten Nukleotide ist aufgrund der doppelhelikalen Natur der DNA unzulässig.

Treibstoffstrang gleichzeitig an beide Arme eines Tweezers hybridisiert, kann die Topologie so sein, dass eine vollständige Hybridisierung sterisch behindert ist aufgrund der helikalen Natur der Duplex-DNA. Die niedrigen und mittleren FRET-Effizienz-Werte können zum Teil auch aufgrund Dimerbildung von unvollständig markierten Tweezers entstehen - eine Situation, die selbst durch PIE-Experimente nicht ausgeschlossen werden kann.

Mit Einzelmolekülspektroskopie ist es möglich, Informationen über die tatsächlich vorliegenden Strukturen der DNA-Tweezers im offenen und geschlossenen Zustand zu gewinnen. Die verwendeten Fluoreszenzmarkierungen sind an Stellen angebracht, die die Funktion der Tweezers optimal beobachten lassen. Die FRET-Effizienz ist sehr hoch im geschlossenen Zustand (90%) und geht auf praktisch Null im offenen Zustand. Um die Dynamik der Tweezers in den offenen und geschlossenen Zuständen zu untersuchen, sollte das FRET-Signal in diesen Konformationen etwa 50% betragen. Daher sind neue DNA-Konstrukte mit den Fluoreszenzfarbstoffen an anderen Stellen notwendig, die sensibler auf Änderungen im FRET-Signal sind, um die Dynamik der Tweezers in den verschiedenen Zuständen zu untersuchen. Aus den Einzelmolekülmessungen mit PIE können wir unterschiedliche Subpopulationen auflösen. Obwohl unterschiedliche Oligomere auch in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese beobachtet wurden, können wir mit den Einzelmolekülmessungen die FRET-Effizienz der verschiedenen Subpopulationen bestimmen und so Zusatzinformationen über die Strukturen dieser Subpopulationen gewinnen. Außerdem sind die FRET-Effizienzen, die wir für die geschlossenen und die offenen Tweezers bestimmen, nicht durch unvollständige Fluoreszenzmarkierung oder die mittlere Subpopulation beeinflusst. Im Gegensatz zu Werten, die aus Ensemblemessungen stammen, können die spFRET/PIE-Effizienzen verwendet werden, um die Entfernung zwischen den Farbstoffen angemessen zu bestimmen.

## 5.2 DNA-Nanopartikel-Konstrukte

Von den in Kapitel 3.2.2 vorgestellten Gold-Nanopartikel-DNA-Tweezers und dem in Kapitel 3.2.3 beschriebenen „Stepper“ werden zunächst die Absorptions- und Emissionsspektren ermittelt. Im Anschluss werden Fluoreszenzintensitätsmessungen durchgeführt, während die Hybridkonstrukte durch Zugabe von den jeweiligen DNA-Treibstoffsträngen ihre Konfiguration ändern.

### 5.2.1 Gold-Nanopartikel-DNA-Tweezers

Das Absorptionsspektrum der Streptavidin-beschichteten 5 nm großen Gold-Nanopartikel ist in Abb. 5.7 dargestellt (rote Kurve). Deutlich zu sehen ist die Plasmon-Bande bei etwa 520-530 nm sowie der Anstieg der Absorption bei kürzeren Wellenlängen aufgrund von Interbandanregungen (siehe Kapitel 3.2.2). In blau und grün sind Absorption und Emission von Oregon Green 488 aufgetragen. Man erkennt den deutlichen Überlapp zwischen der Emission des Farbstoffs und der Absorption des Nanopartikels. Dass die Emission des Farbstoffs tatsächlich durch die Entfernung zum Gold-Nanopartikel beeinflusst wird, zeigt der Verlauf derselben in Abb. 5.8 beim Schalten des Hybridtweezers. Analog zu herkömmlichem FRET sinkt die Donoremission, wenn Farbstoff und Nanogold einander nahe kommen, was durch Zugeben des Treibstoffstranges initiiert wird. Ausgehend von Abb. 3.8 können wir die mittleren Abstände vom Farbstoff zur Oberfläche des Goldpartikels in der „offenen“ und in der

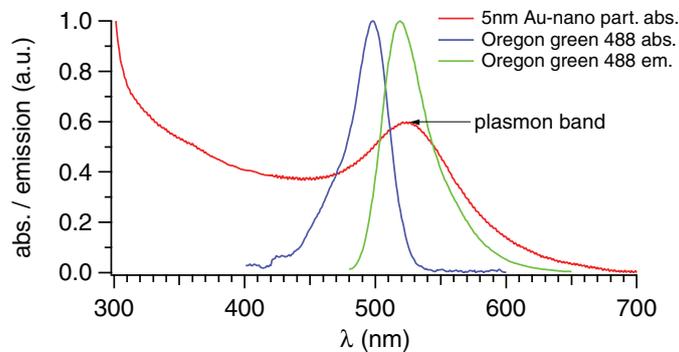


Abbildung 5.7: Absorptionsspektrum der Streptavidin-beschichteten 5 nm Gold-Nanopartikel (rot) sowie Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes Oregon Green 488 (blau bzw. grün). Deutlich zu erkennen ist der Peak der Plasmon-Resonanz im Absorptionsspektrum des Gold-Nanopartikels. Dieser fällt in denselben Wellenlängenbereich wie die Emission von Oregon Green 488.

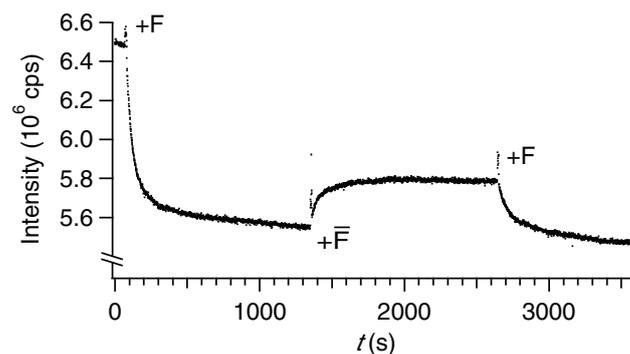


Abbildung 5.8: Verlauf der Fluoreszenzemission der Gold-Nanopartikel–DNA-Tweezers beim Schalten zwischen der offenen und der geschlossenen Konfiguration durch Zugabe der entsprechenden Treibstoffstränge.

„geschlossenen“ Konfiguration grob abschätzen:

$$\langle d_{\text{open}} \rangle \approx 2\langle r_{\text{strep}} \rangle + \sqrt{\langle \bar{R}_{\text{ss24}}^2 \rangle} + \langle d_{\text{Tweezers}} \rangle \quad (5.3)$$

$$\langle d_{\text{closed}} \rangle \approx 2\langle r_{\text{strep}} \rangle + l_{\text{ds18}} \quad (5.4)$$

$2\langle r_{\text{strep}} \rangle \approx 1.75$  nm ist die mittlere Dicke der Streptavidinmoleküle auf der Goldoberfläche,  $\sqrt{\langle \bar{R}_{\text{ss24}}^2 \rangle}$  ist der mittlere End-zu-End-Abstand des 24 Basen-langen DNA-Einzelstrangabschnitts,  $\langle d_{\text{Tweezers}} \rangle$  der mittlere Abstand zwischen dem Farbstoff und dem anderen Arm der Tweezers (nach den spFRET-Messungen können wir einen Wert von 9 nm annehmen, vgl. Kapitel 5.1.3) und  $l_{\text{ds18}} \approx 6.1$  nm die Länge einer 18-Basenpaar-Doppelhelix. Nach dem Modell des halbsteifen Polymers (Kapitel 3.1.1) können wir  $\sqrt{\langle \bar{R}_{\text{ss24}}^2 \rangle}$  nach Gleichung 3.4 approximieren durch  $\sqrt{2L \cdot L_P} = 4.5$  nm, wobei  $L = 24 \cdot 0.43$  nm = 10.3 nm ist und die Persistenzlänge von ssDNA  $L_P = 1$  nm verwendet wird. Insgesamt kann der Abstand zwischen Farbstoff und Goldoberfläche bei der offenen Konfiguration im Bereich von 0–24 nm variieren, wobei die Goldoberfläche weitgehend durch Streptavidin bedeckt ist, was zu einem Mindestabstand von etwa 3.5 nm führt. Nach Gleichung 5.3 erhalten wir mit diesen Werten einen „mittleren Abstand“ von etwa 17 nm, der sich im geschlossenen Zustand nach Gleichung 5.4 auf etwa 10 nm verkürzt.

Teilweise ist der Fluoreszenzrückgang reversibel und durch Zugeben des komplementären Treibstoffstranges steigt die Fluoreszenz wieder an, da sich einige Tweezers öffnen. Als Hauptursache, dass die Fluoreszenz das Ausgangsniveau nicht wenigstens annähernd erreicht, wird hierbei der Unterschied gesehen, dass bei den Hybridtweezers der eine Seitenarm fest am Gold-Nanopartikel angebunden ist und dadurch unter Umständen im geschlossenen Zustand die Haltepunktsequenz durch die Anwesenheit des Nanogolds für den zweiten Treibstoffstrang nicht so leicht zugänglich ist wie bei den freien DNA-Tweezers (vgl. Abb. 3.8). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass mehrere DNA-Tweezers auf einem einzigen Gold-Nanopartikel gebunden sind. Diese können über zugefügte Treibstoffstränge quervernetzt werden. Dieses Crosslinking wurde auch bei den „normalen“ Tweezers beobachtet (Kapitel 5.1.2 und 5.1.3). Dort war es verantwortlich für die Bildung von Dimeren und Multimeren. Bei den Hybridtweezers ist es eine mögliche Ursache dafür, dass quervernetzte Tweezers nach der Zugabe des komplementären Treibstoffstrangs nicht mehr vollständig geöffnet werden. Zu den genannten Ursachen für die nicht vollständige Reversibilität kommen die in Kapitel 5.1.1 genannten.

Abb. 5.8 zeigt ein hohes Hintergrundsignal. Hierfür gibt es zwei naheliegende Gründe: zum einen sind die erwarteten mittleren Abstände zwischen Goldoberfläche und dem Farbstoff Oregon Green 488 hoch ( $\geq 10$  nm). Dadurch wird kein starkes „Quenchen“ erwartet. Zum anderen liegt es an dem (unbeabsichtigten) massiven Überschuss an DNA-Tweezers gegenüber den Streptavidin-Goldpartikeln (siehe Kapitel 3.2.2), der zur Folge hat, dass nur ein Bruchteil der Tweezers (und damit der Farbstoffe) an ein Gold-Nanopartikel gebunden ist. Die frei in Lösung vorkommenden Farbstoffe können somit mit praktisch konstanter Intensität emittieren ohne, dass sie dabei durch Treibstoffstränge beeinflusst würden.

Die durchgeführten Messungen sind einfache Ensemblemessungen und zeigen, dass Gold-Nanopartikel erfolgreich als Quencher für Fluoreszenzfarbstoffe in DNA-Nanoaktuatoren eingesetzt werden können, um Abstandsänderungen  $\geq 10$  nm zu verfolgen. Es fehlen zum einen wesentliche Kontrollexperimente, um diese Erkenntnisse abzusichern, zum anderen sind die Abstände bei dieser Verwendung der Tweezers aufgrund ihrer Struktur nicht präzise defi-

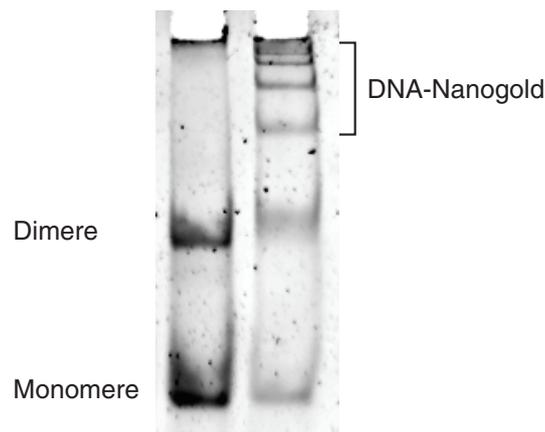


Abbildung 5.9: Gelnachweis der Bindung des Gold-Nanopartikels an den Devicestrang. Die linke Bahn enthält ausschließlich den Devicestrang. Neben der Monomerbande tritt eine obere Bande auf, die Dimeren zugeordnet werden kann (siehe Text). Die rechte Bahn des Gels zeigt den Devicestrang nach der Reaktion mit Monomaleimido-Nanogold. Im oberen Bereich dieser Bahn sehen wir mehrere Banden, die DNA-Nanogold-Verbindungen zugeordnet werden können.

niert, und wir argumentieren auf der Basis von mittleren Abständen (Hier könnten Einzelmolekülexperimente Abhilfe schaffen). Schließlich kann man nicht exakt kontrollieren, wieviele DNA-Tweezers an ein Streptavidin-Goldpartikel angebunden sind. Um den beiden letztgenannten Problemen zu begegnen, wurde in der Folge der “DNA-Stepper“ entwickelt und untersucht.

### 5.2.2 Gold-Nanopartikel–DNA-Stepper

Die Struktur, das Funktionsprinzip und die Präparation dieses von uns entworfenen Hybridaktuators sind in Kapitel 3.2.3 beschrieben. In einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zunächst überprüft, ob die Gold-Nanopartikel wie gewünscht an den Devicestrang gebunden werden können. Das Ergebnis zeigt Abb. 5.9. Die linke Bahn enthält ausschließlich den Devicestrang. Neben der Monomerbande (unten) tritt eine obere Bande auf, die Dimeren zugeordnet werden kann. Es gibt gleich zwei Möglichkeiten, warum der Devicestrang Dimere bildet: Zum einen ist er hochgradig selbstkomplementär, aufgrund der gewählten Sequenz, was natürlich dazu führen kann, dass zwei Stränge teilweise miteinander hybridisieren. Zum zweiten befindet sich an einem Ende jedes Devicestrangs eine Thiolgruppe und zwei Thiole können eine Disulfidbrücke bilden. In künftigen Experimenten könnte man dies durch Zugabe eines Reduktionsmittels wie Dithiothreitol (DTT) oder TCEP (Tris(2-Carboxyethyl)Phosphin) überprüfen, durch das die Disulfidbrücke aufgebrochen wird. Die rechte Bahn des Gels zeigt Devicestrang plus Monomaleimido-Nanogold. Wir erkennen die beiden Banden aus der linken Bahn wieder (Devicestränge, die nicht mit Nanogold reagiert haben), aber zusätzlich sehen wir mehrere Banden im oberen Teil des Gels, die DNA-Nanogold-Verbindungen zugeordnet werden können. Dass es mehr als zwei Banden sind, könnte an der Bildung von Multimeren mit einer unterschiedlichen Anzahl von Nanogold-Partikeln liegen.

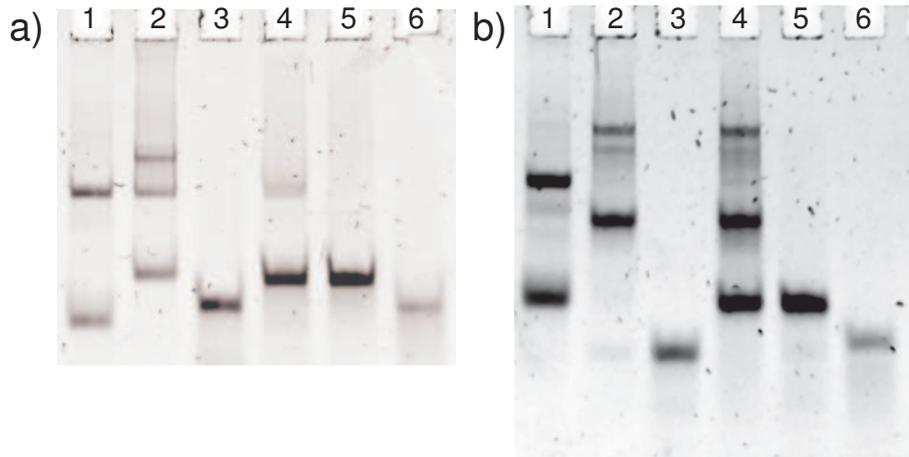


Abbildung 5.10: Gelnachweis des Schaltens des Steppers. a) Bahn 1: Devicestrang D (vgl. Abb. 5.9 links), Bahn 2: D + „56-Basen-Komplement“ (56C). Zu erkennen sind drei Banden: eine auf der Höhe des Devicestrang-Dimers aus Bahn 1, die Monomerbande ist dagegen verschwunden. Zwei weitere Banden entsprechen vermutlich der gewünschten Struktur (unterste Bande) und einem Dimer, das teilweise hybridisiert ist (oberste Bande). Bahn 3: Komplementstrang 56C, Bahn 4: (D + 56C) + der 56-Basen-lange Removal-Strang (56R), Bahn 5: 56C + 56R, Bahn 6: 56R. b) zeigt die analogen Reaktionsschritte für die 38-Basen-Stränge (38C und 38R statt 56C und 56R). Interpretation siehe Text.

In zwei weiteren Gelelektrophoresen wurde das prinzipielle Funktionieren des Steppers (ohne angehängtes Nanogold) überprüft (Abb. 5.10). Zu Abb. 5.10a: In Bahn 1 befindet sich der Devicestrang (vgl. Abb. 5.9 links). Bahn 2 enthält den Devicestrang und das 56 Basen Komplement (56C). Wir erkennen drei Banden. Eine auf der Höhe des Devicestrang-Dimers aus Bahn 1, das Monomer ist dagegen vollständig hybridisiert. Zwei weitere Banden entsprechen vermutlich der gewünschten Struktur (unterste Bande) und einem Dimer, das teilweise hybridisiert ist (oberste Bande). Bahn 3 zeigt den Komplementstrang 56C, welcher in Bahn 2 also vollständig hybridisiert war. In Bahn 4 befindet sich (Devicestrang + 56C) + der 56-Basen-lange Removal-Strang (56R). Die ursprüngliche Devicestrang-Dimer-Bande ist erhalten, dagegen verschwindet die teilhybridisierte Dimerbande, die Monomerbanden sind nicht deutlich zu erkennen, u. U. werden sie von der neuen hellen unteren Bande überdeckt. Wir hätten erwartet, dass die hybridisierte Monomerbande verschwindet und die ursprüngliche Monomerbande aus Bahn 1 wieder erscheint. Bahn 5 zeigt die Hybridisierung von 56C mit 56R, was die helle untere Bande in Bahn 4 erklärt. Das bedeutet zudem, dass 56C zu einem bedeutenden Teil aus den hybridisierten Strukturen mittels Branch-Migration herausgelöst wurde, folglich liegen die Devicestränge zum Großteil unhybridisiert vor. Bahn 6 zeigt zur Kontrolle den Strang 56R.

Abb. 5.10b zeigt die gleichen Reaktionsschritte, nur dass statt den beiden 56-Basen-Strängen die 38-Basen-Stränge verwendet wurden. Hier gelingt es, die Devicestränge annähernd vollständig mit 38C hybridisieren zu lassen (Bahn 2), dafür erscheint das Ablösen von 38C schwieriger, die hybridisierten Strukturen bleiben vielfach erhalten (Bahn 4). Da 38C mit 38R auch

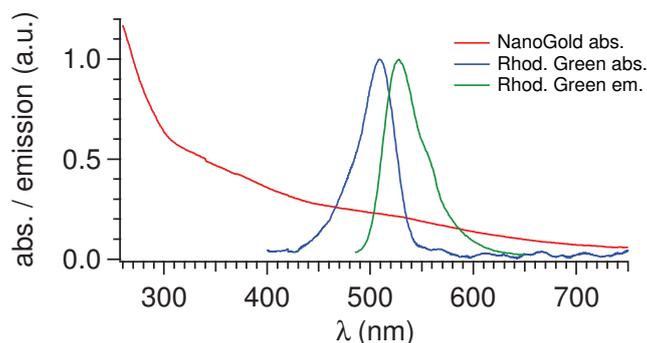


Abbildung 5.11: Absorptionsspektrum der 1.4 nm Gold-Nanopartikel (rot) sowie Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin Green (blau bzw. grün). Im Gegensatz zum Absorptionsspektrum der 5 nm Gold-Nanopartikel (Abb. 5.7) zeigt das Spektrum der 1.4 nm Goldpartikel keine Plasmon-Bande. Dagegen ist auch hier der Anstieg der Absorption bei kürzeren Wellenlängen aufgrund von Interbandanregungen zu erkennen.

in Bahn 4 hybridisiert (vgl. mit Bahn 5), gelingt das Ablösen aber immerhin teilweise, wenn man davon ausgeht, dass die Stöchiometrie stimmt. Insgesamt bieten die beschriebenen Gelelektrophoresen Anhaltspunkte dafür, dass die Übergänge zwischen den einzelnen Strukturen des Steppers wie erwartet funktionieren – allerdings nicht vollständig. Auf die möglichen Ursachen dafür wird bei der Diskussion der Fluoreszenzexperimente eingegangen. Im Anschluss an die Gelelektrophoreseexperimente wurden Fluoreszenzexperimente durchgeführt. Das Absorptionsspektrum der 1.4 nm Gold-Nanopartikel zeigt die rote Kurve in Abb. 5.11. Im Vergleich zu Abb. 5.7 sieht man, dass die Plasmon-Bande verschwunden ist. Das liegt daran, dass die Nanogold-Partikel mit einem Radius von 0.7 nm sehr klein sind (siehe Kapitel 3.2.2). Der kontinuierliche Anstieg der Absorption bei kürzer werdenden Wellenlängen wird dagegen auch bei diesen kleinen Nanopartikeln beobachtet. Die Ursache für diesen Anstieg sind Anregungen einzelner Elektronen, wodurch diese Übergänge zwischen einzelnen Bändern machen können. Die blaue und grüne Kurve zeigen die Absorption und Emission des Farbstoffs Rhodamin Green. Auch in diesem Fall gibt es einen spektralen Überlapp zwischen der Emission des Farbstoffs und der Absorption des Nanopartikels. Unter Verwendung der Förster-Theorie wurde aus den Spektren in Abb. 5.11 und dem vom Hersteller der Nanogold-Partikel angegebenen Extinktionskoeffizienten (Kapitel 3.2.3) der Förster Radius für das Paar Rhodamin Green – Nanogold nach Gleichung 4.43 zu  $R_0 \approx 5.2$  nm ermittelt. Dieser Förster-Radius ist vergleichbar mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten für Farbstoff-Paare.

Abb. 5.12 zeigt den Verlauf der Fluoreszenzintensität beim Schalten des Steppers bei einer Proben temperatur von 25° C. Die durchgezogenen Kurven sind Fits entsprechend einer Reaktionskinetik 2. Ordnung an die Datenpunkte. Wir erkennen einen Anstieg der Fluoreszenzemission durch das Stepperensemble nach dem Zugeben der Komplementstränge. Die Intensität steigt in der Reihenfolge 24C, 38C, 56C. Dazwischen wurden jeweils die entsprechenden „Removal“-Stränge zugegeben, was jeweils einen Intensitätsabfall zur Folge hat. Aus der unterschiedlich stark gedämpften Intensität sehen wir, dass auch bei dieser Hybridstruktur

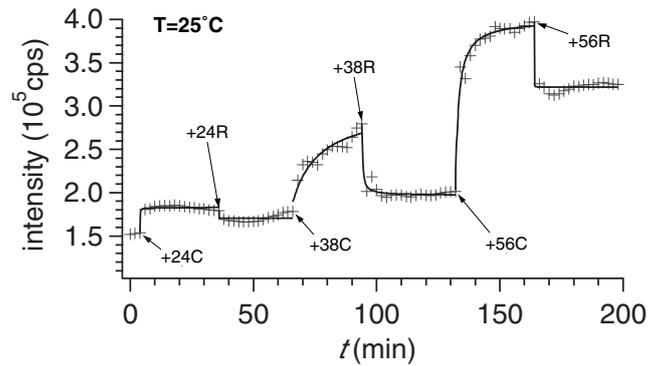


Abbildung 5.12: Intensitätsverlauf der Fluoreszenzemission durch den Farbstoff Rhodamin Green beim Schalten des Steppers bei  $25^\circ\text{C}$ . Die Zeitpunkte der Zugabe der Komplementstränge 24C, 38C und 56C bzw. der Removalstränge 24R, 38R und 56R sind durch Pfeile markiert. Die durchgezogenen Kurven sind Fits an die Datenpunkte (Kreuze) für eine Kinetik 2. Ordnung.

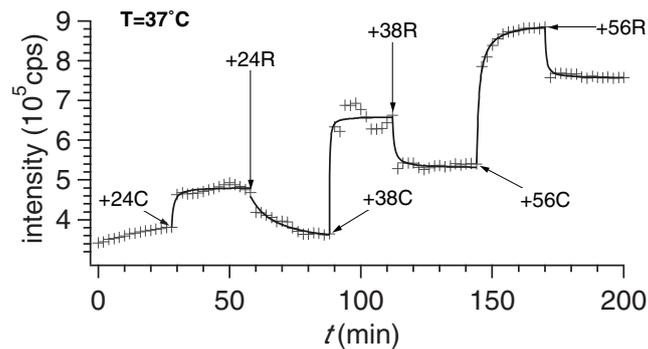


Abbildung 5.13: Intensitätsverlauf der Fluoreszenzemission beim Schalten des Steppers bei  $37^\circ\text{C}$ .

die Gold-Nanopartikel erfolgreich als Quencher funktionieren. Ein Teil der Anregungsenergie des Farbstoffs Rhodamin Green wird auf das Nanogold-Partikel transferiert. Da wir drei unterschiedliche Intensitätsniveaus finden, lässt sich sagen, dass unser Aktuator tatsächlich drei unterschiedliche Strukturen annimmt. Wir erkennen allerdings auch, dass das Ausgangsniveau der Fluoreszenz durch Zufügen der Removalstränge nicht mehr erreicht wird. Das bedeutet, dass der Farbstoff im Mittel nicht mehr so weit vom Nanopartikel entfernt ist, wie ursprünglich. Insbesondere bleibt die Intensität nach Zugabe von 56R auf einem hohen Niveau. Dies kann daher kommen, dass die Komplementstränge nicht vollständig abgelöst werden können (wie es ja auch bei den Tweezers z. T. der Fall war) oder dass der Devicestrang nun stärker auf sich selbst faltet, als dies im Ausgangszustand der Fall war.

Um diesen Sachverhalt weiter zu untersuchen wurden dieselben Reaktionen bei einer höheren Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt (Abb. 5.13). Durch die höhere Temperatur werden Hybridisierung und Kreuzungspunktwanderung erleichtert. Das Ergebnis zeigt, dass die höhere

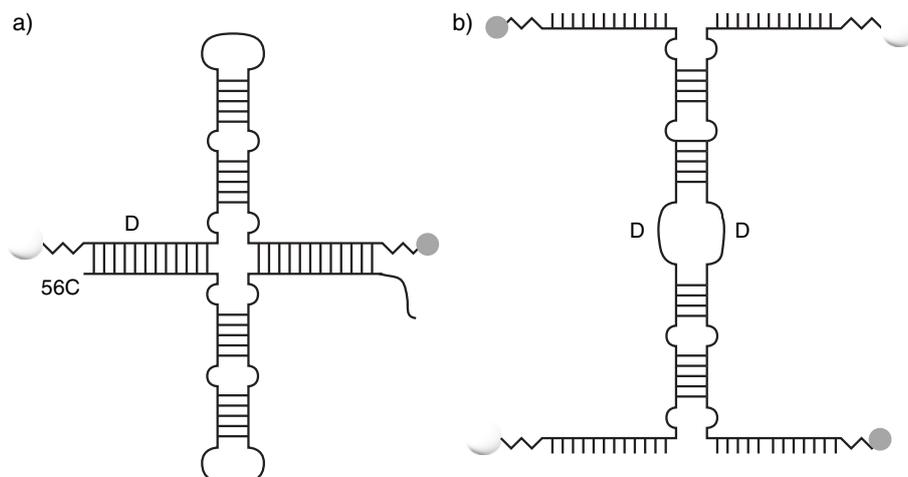


Abbildung 5.14: Unbeabsichtigte Stepperstrukturen: a) Unvollständig hybridisierte Struktur mit Sekundärstrukturen (Hairpin-Loops) aus dem Devicestrang mit dem Komplementstrang 56C. b) Dimer aus zwei Devicesträngen, der durch abschnittsweise Doppelhelixbildung aufgrund der teilweisen Selbstkomplementarität stabilisiert wird.

Temperatur für die Reaktionen mit den kürzeren Strängen (24 und 38 Basen) hilfreich ist, aber nach wie vor der Ausgangszustand nicht erreicht wird (insbesondere wiederum nach Zugabe von 56R).

Durch die gewählte Sequenz des Devicestrangs – und damit auch der Komplementstränge, kann es dazu kommen, dass sich Strukturen nicht immer wie beabsichtigt bilden. Zwei dieser Strukturen sind in Abb. 5.14 dargestellt. Abb. 5.14a zeigt den Devicestrang mit dem Komplementstrang 56C, wobei beide nicht vollständig miteinander hybridisieren, sondern aufgrund ihrer jeweiligen Selbstkomplementarität eine vierarmige Kreuzung (4 way junction) bilden. Diese mögliche Konformation erschwert vermutlich die vollständige Hybridisierung beider Stränge zu dem ausgestreckten Doppelstrang (vgl. Abb. 3.9 in Kapitel 3.2.3. In dieser Konformation ist die Entfernung zwischen Farbstoff und Nanogold deutlich geringer als erwartet. In Abb. 5.14b ist dagegen ein Dimer aus zwei Devicesträngen gezeigt, der durch abschnittsweise Doppelhelixbildung stabilisiert wird. Ursache hierfür ist wieder die Hairpin-Struktur des Steppers, die eine abschnittsweise Selbstkomplementarität bedingt. Die mögliche Bildung dieser Dimerstruktur bestätigt unsere Vermutung, dass in den Abb. 5.9 und 5.10 Dimerbanden auftreten.

Abb. 5.15 zeigt, wie stark die Effizienz des Förster-Transfers bei den Distanzen unseres Steppers mit dem ermittelten Förster-Radius von 5.2 nm (noch) ist. Für den Abstand von 24 Basenpaaren ( $\sim 8.4$  nm) beträgt  $f_E = 6.1\%$ , bei 38 Basenpaaren ( $\sim 12.9$  nm) ist  $f_E = 0.43\%$  und bei 56 Basenpaaren ( $\sim 19.0$  nm)  $f_E = 0.04\%$ . Aus unseren Fluoreszenzmessungen können wir die Transfereffizienzen zwar nicht ermitteln, sehen aber zumindest, dass die absolute Dämpfung in etwa gleich großen Schritten abnimmt, während die Änderung der Transfereffizienz nach Förster einmal etwa 5.7% und anschließend nur noch ca. 0.4% beträgt. Ob die Abstandsabhängigkeit der Dämpfung einem  $1/R^4$ -Verhalten wie von Yun et al. [86] beobach-

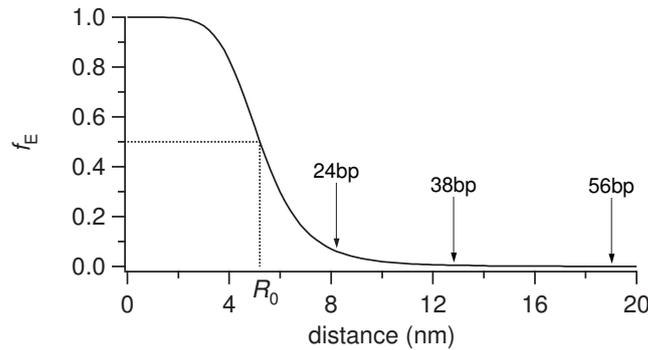


Abbildung 5.15: Berechnete FRET-Effizienzen für die Entfernungen des Steppers mit dem experimentell ermittelten Förster-Radius von  $R_0 = 5.2$  nm. Für den Abstand von 24 Basenpaaren ( $\sim 8.4$  nm) beträgt  $f_E = 6.1\%$ , bei 38 Basenpaaren ( $\sim 12.9$  nm) ist  $f_E = 0.43\%$  und bei 56 Basenpaaren ( $\sim 19.0$  nm)  $f_E = 0.04\%$ .

Aktion	Zeit	$I_{\text{CTAB}}$ (a.u.)	$I_{\text{noCTAB}}$ (a.u.)
Devicestrang (D)	0 h	1.0	1.0
D+56C	1.5	2.71	1.67
(D+56C)+56R	19 h	1.19	1.26
(D+56C)+56R	20.5 h	1.03	1.23
...+24C	22 h	1.26	–

Tabelle 5.1: Langzeitverlauf der Fluoreszenzintensitäten des Nanogold-DNA-Steppers  $I_{\text{CTAB}}$  bzw.  $I_{\text{noCTAB}}$  mit bzw. ohne 3 mM-Konzentration des Tensids Cetyl-Trimethyl-Ammoniumbromid (CTAB) im Puffer.

tet folgt oder doch einem  $1/R^6$ - (Förster)-Verhalten mit einem größeren Förster-Radius, wie von Gueroui & Libchaber beobachtet [90], lässt sich nicht sagen. Drei definierte Abstände wie bei unserem Stepper sind hierfür nicht ausreichend. Aber wir beobachten eine deutliche Signaländerung der Intensität beim Umschalten zwischen der 38- und der 56-Basenpaar-Konfiguration des Steppers, was einer Abstandsänderung von etwa 13 nm auf 19 nm entspricht.

Schließlich wurde versucht, die Ablösungsreaktion durch Zugabe des kationischen Tensids Cetyl-Trimethyl-Ammoniumbromid (CTAB) zum Puffer zu beschleunigen. Dieser Stoff beschleunigt den DNA-Strangaustausch bei 20-bp DNA-Doppelsträngen um einen Faktor 5–7, wenn er in 3 mM Konzentration vorliegt [123]. Tabelle 5.1 zeigt die Fluoreszenzintensitätswerte des Steppers nach bestimmten Schaltschritten für zwei Messreihen, die in Anwesenheit (3. Spalte) und Abwesenheit (4. Spalte) von 3 mM CTAB im Puffer. Ausgangspunkt ist das Fluoreszenzniveau des Devicestrangs mit angebundenem Nanogold (D), das auf 1 normiert wurde. 1.5 Stunden nach Zugeben des Komplementstrangs 56C ist die Intensität um etwa 170% erhöht (mit CTAB), bzw. um etwa 70% (ohne CTAB). Wir erkennen daran, dass bereits die Hybridisierung durch CTAB beschleunigt wird. Dagegen ist 17.5 Stunden nach der anschließenden Zugabe des Removalstrangs 56R in beiden Fällen die Ausgangsintensität

(noch) nicht wieder erreicht. Erst weitere 1.5 Stunden später wird dieser Wert in Anwesenheit von CTAB annähernd wieder erreicht, in Abwesenheit von CTAB ist die Intensität immer noch um 23% erhöht, die Ablösung von 56C also nicht vollständig. Die Kreuzungspunktwanderung wird also durch die Anwesenheit von CTAB beschleunigt. Als Kontrolle wurde bei dem Experiment mit CTAB anschließend der kurze Komplementstrang 24C zugegeben und nach 1.5 Stunden ein weiteres Mal die Intensität gemessen. Dass hier die Fluoreszenz wieder ansteigt, gibt Anzeichen dafür, dass der Stepper intakt und tatsächlich wie geplant schaltbar ist.

Das Umschalten zwischen den verschiedenen Konfigurationen des Steppers lässt sich also durch Zugabe des Tensids CTAB zum Puffer beschleunigen, dennoch dauert insbesondere das Umschalten aus dem 56bp-Zustand mit fast 20 Stunden sehr lange. Bei der Entwicklung neuer Hybridaktuatoren, die über große Distanzen agieren, sollte man interne Doppelhelixstrukturen wie Hairpin-Loops vermeiden, da diese zusammen mit den Komplementärsträngen schnell zu unbeabsichtigten Strukturen wie den in Abb. 5.14 gezeigten führen.

### 5.3 Schaltbares DNA-Thrombin-Aptamer

In diesem Kapitel wird die Funktion des in Kapitel 3.2.4 schaltbaren Thrombin-Aptamers in Gelelektrophorese-Experimenten, in FRET- und Fluoreszenzanisotropie-Messungen untersucht. Anschließend wird die Bindungskinetik genauer untersucht: durch FRET-Experimente mit variiertem DNA-Aptamer- und Thrombinkonzentration und bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Dissoziationskonstante der Aptamer-Thrombin-Bindung wird in Fluoreszenzkorrelationspektroskopie-Messungen ermittelt. Durch die numerische Simulation des in Kapitel 4.1.4 beschriebenen Modells der einzelnen Reaktionsschritte werden schließlich typische experimentelle Fluoreszenzverläufe reproduziert.

#### 5.3.1 Gelnachweis

Der Arbeitszyklus der Maschine wurde in einem elektrophoretischen Bandenverschiebungsexperiment beobachtet, das in Abb. 5.16 dargestellt ist. Das Binden von A (Spalte a) an Thrombin resultiert in einer starken Verschiebung der korrespondierenden Bande (Spalte b). Bei Zugabe von Q wird Thrombin von A freigegeben und eine Bande erscheint für den Duplex A-Q (Spalte c). Nach Zugabe von R wird A freigesetzt und kann von Neuem Thrombin binden (Spalte g). Das kann aus dem Wiederauftauchen der Bande A-T und einer zweiten Bande aus dem „Abfallprodukt“ Q-R geschlossen werden. Eine zusätzliche, schwache Bande wird in den Spalten b und g direkt unter der zu A-T gehörenden Bande beobachtet. Experimentell findet man, dass die Intensität dieser Bande von einer Thrombinprobe zur anderen variiert. Überdies haben wir gefunden, dass die Intensität bei älteren Thrombinproben im Vergleich zu „frischen“ Proben zunimmt (Daten nicht gezeigt). Wir haben diese zusätzliche Bande daher auf eine Verunreinigung in unserer Thrombinlösung zurückgeführt, möglicherweise ein Thrombin-Abbauprodukt, an welches das Aptamer gleichfalls binden kann [124]. Eine neuere Veröffentlichung von Liu et al. legt dagegen nahe, dass sich in Gegenwart von DNA-Aptamern unter Umständen Thrombin-Dimere bilden können [125]. Begründet wird dies mit der zwei möglichen Bindungsstellen in Thrombin, an die das Aptamer binden kann [93]. In Spalte h setzt weitere Zugabe von Q erneut Thrombin frei und zwei nahe beieinanderliegende Banden erscheinen für den Duplex A-Q und das Abfallprodukt aus dem vorhergehenden Schritt. Die Gelexperimente zeigen somit eindeutig, dass die Aptamermaschine mehrfach zwischen ihren

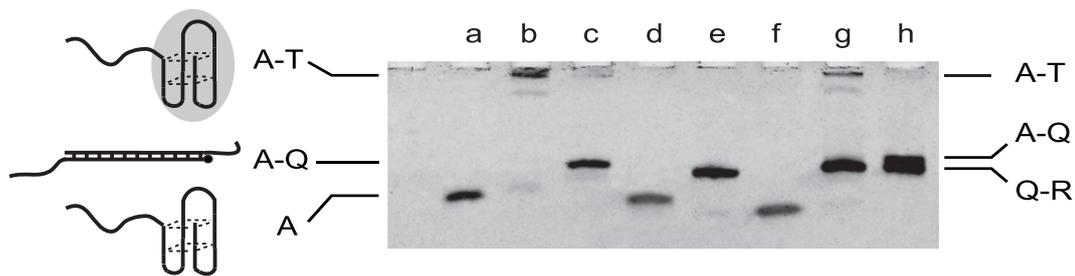


Abbildung 5.16: Gelnachweis der Funktion der DNA-Maschine. Die Spalten enthalten: a: A, b: A + Thrombin (T), c: (A + T) + Q, d: Q, e: Q+R, f: R, g: ((A+T)+Q) + R, h: (((A + T) + Q) + R)+ Q. Die Paare in Klammern wurden 1 Stunde lang inkubiert, bevor die nächste Komponente hinzugegeben wurde. In den Hybridisierungsreaktionen hat jedes Oligonukleotid eine Konzentration von  $1 \mu\text{M}$ . Humanes  $\alpha$ -Thrombin (Fluka) wurde im Verhältnis Protein : Aptamer = 10 : 1 zugegeben. Aufgrund der höheren Fluoreszenzintensität des Gelfärbemittels bei der Bindung an DNA-Duplexe wurde die Gesamtmenge an DNA, die in die Bahnen c, e, g und h geladen wurde, angepasst, um eine gleichmäßige Intensität der Banden ohne starke Verbreiterung oder Verschmieren zu erhalten. Verglichen mit Bahn b wurde in g nur 60% der Menge an Strang A geladen, was die reduzierte Intensität des Aptamer-Thrombin Komplexes in dieser Bahn erklärt.

zwei Konformationen hin- und hergeschaltet werden kann und zyklisch Thrombin bindet und freigibt.

### 5.3.2 UV-Absorptionsspektroskopie-Schmelzkurven

Um eine funktionierende DNA-Maschine auf der Grundlage eines existierenden DNA-Aptamers zu konstruieren, muss jede Modifikation auf eine Weise vorgenommen werden, dass die Bindungseigenschaften der Aptamersektion erhalten bleiben. In unserem Fall wurde die Zufalls-„Haltepunkt“ Sektion an das 5' Ende der Thrombin-Aptamersequenz angehängt, da an dieser Stelle keine Interaktion des Aptamers mit dem Protein erwartet wird [93]. Das richtige Falten in die G-Quartett-Struktur wurde mit Schmelzexperimenten überprüft, bei denen die UV-Absorption bei  $\lambda=295\text{nm}$  in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt wird [27]. Abb. 5.17 zeigt die gemessenen UV-Schmelzkurven der Aptamermaschine. Da die G-Quartett-Bildung durch Kaliumionen stabilisiert wird (siehe Kapitel 2.1.1), beobachtet man einen deutlichen Unterschied im Schmelzverhalten der Aptamermaschine in Gegenwart von Kaliumionen verglichen mit der ausschließlichen Gegenwart von Natriumionen. Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass unsere Maschine trotz der angehängten Haltepunktsektion korrekt in eine Thrombin-bindende Konformation faltet. Aus dem Verlauf der Schmelzkurve in Gegenwart von Kaliumionen kann auf eine Schmelztemperatur von etwa  $45^\circ\text{C}$  für die Aptamermaschine unter physiologischen Pufferbedingungen geschlossen werden.

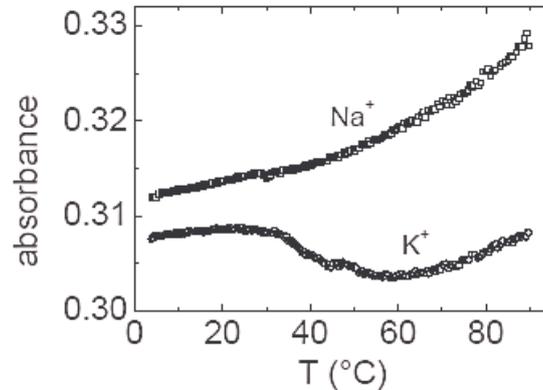


Abbildung 5.17: UV-Schmelzkurven der Aptamermaschine aufgenommen bei  $\lambda=295$  nm. In Gegenwart von Kaliumionen zeigt die Aptamermaschine einen klaren Schmelzübergang bei ca.  $45^\circ\text{C}$ . Das weist auf die Bildung einer Guanin-Quartett Sekundärstruktur hin. In einem Puffer, der nur Natriumionen enthält wird hingegen kein Schmelzübergang beobachtet.

### 5.3.3 Fluoreszenzmessungen an der Aptamermaschine

#### Bestimmung des Förster Radius

Abb. 5.18 zeigt die Absorptions- und Emissionsspektren der beiden verwendeten Farbstoffe Oregon Green 488 (als Donor) und TAMRA (als Akzeptor). Aus diesen Spektren kann das Überlapp-Integral  $J(\lambda)$  und der Förster Radius  $R_0$  bestimmt werden. Bei dieser Distanz  $R_0$  beträgt die Effizienz des Energietransfers 50% (siehe Kapitel [?]). Zur Bestimmung des Überlapp-Integrals werden die auf 1 normierten Donor-Emissions- und Akzeptor-Absorptionskurven miteinander multipliziert. Das Ergebnis zeigt Abb. 5.19. Die resultierende Kurve wird nun noch mit  $\lambda^4$  multipliziert. Hierbei legt man sich auf eine Einheit für die Wellenlänge fest. Desweiteren ist der molare Extinktionskoeffizient des Akzeptors zu berücksichtigen ( $\epsilon_{A,\text{max}} = 95000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und wir müssen das Ganze durch die integrierte Donoremission  $\int f_D(\lambda)d\lambda \approx 50$  normieren. Der gesamte Integrand wird nun numerisch integriert. In unserem Fall erhalten wir  $J(\lambda) = 3.4 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$ . Nach Gleichung 4.43 ergibt sich der Förster Radius zu  $R_0 \approx 62 \text{ \AA} = 6.2 \text{ nm}$ . Hierfür wurden  $n = 1.33$ ,  $\kappa^2 = 2/3$  und  $\Phi_D = 0.9$  für Oregon Green 488 eingesetzt.

#### FRET-Experimente

In unserem Fall wird FRET eingesetzt, um die Konformationsänderungen der DNA-Maschine zu verfolgen, die das Binden und die Freigabe von Thrombin begleiten. In Abbildung 5.20 sind Ergebnisse von FRET-Experimenten dargestellt, in denen die Stränge A, Q (siehe Abb. 3.12) und R in Abwesenheit (Abb. 5.20a) und in Gegenwart (Abb. 5.20b) von Thrombin verwendet wurden. Nach Binden von Q an A wird die Fluoreszenz des Farbstoffes an A durch den FRET-Akzeptor an Q unterdrückt. Die Fluoreszenz ist bereits teilweise geschwächt, wenn Q an die Haltepunktsequenz bindet (vgl. (II) in Abb. 3.12), volle Unterdrückung tritt nach dem

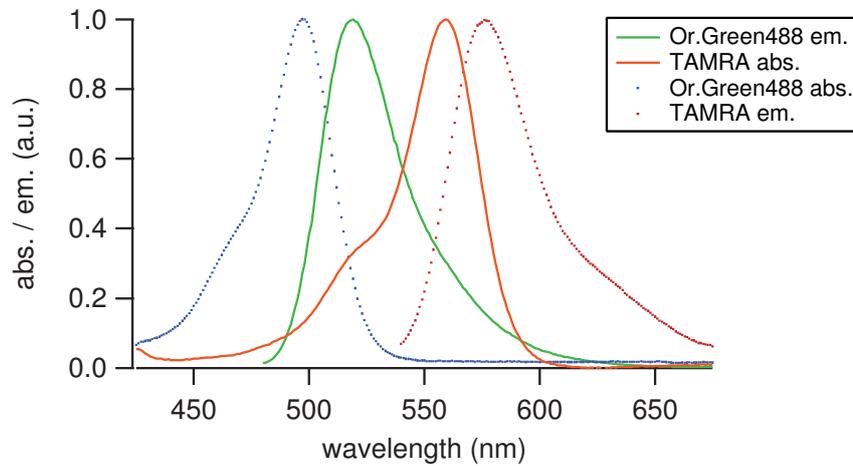


Abbildung 5.18: UV-Vis Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren des verwendeten Donor-Akzeptor-Paars Oregon Green 488 und TAMRA. Die Emission des Donors überlappt in einem relativ großen Bereich mit der Absorption des Akzeptors.

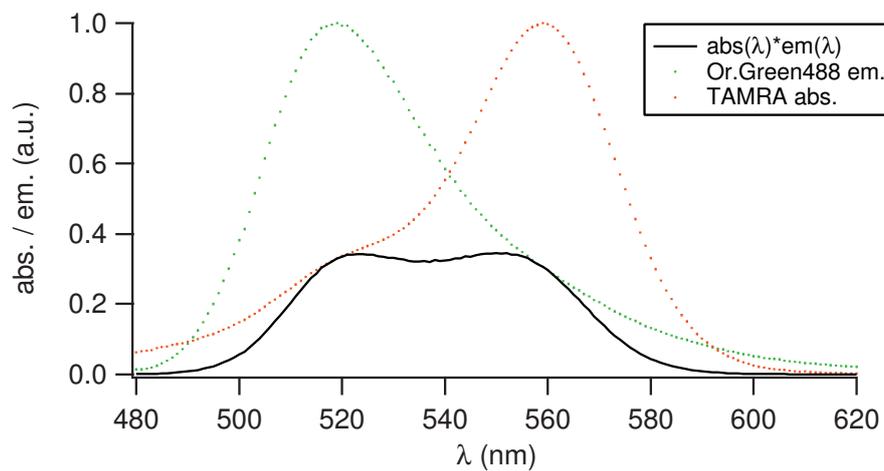


Abbildung 5.19: Die durchgezogene schwarze Kurve zeigt das Ergebnis der Multiplikation der auf 1 normierten Donor-Emissions- mit der Akzeptor-Absorptionskurve.

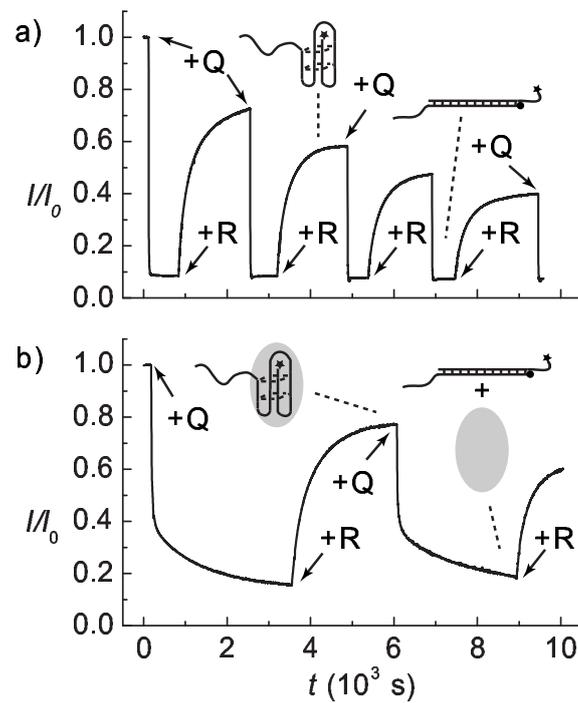


Abbildung 5.20: Normierte Fluoreszenzintensität während des Betriebs der DNA-Maschine, a) ohne Thrombin, b) in Gegenwart von Thrombin. Die Fluoreszenzniveaus entsprechen den unterschiedlichen Konformationen, die durch die Symbole angezeigt werden.

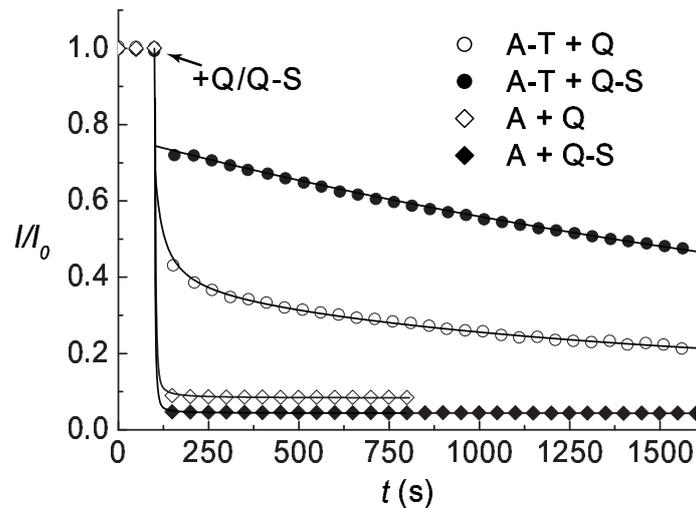


Abbildung 5.21: Fluoreszenzabfall nach Zugabe der Quenchersequenz zur Maschine in Gegenwart von Thrombin (Kreise) oder ohne Thrombin (Rechtecke). Jeder 50. Datenpunkt ist dargestellt. Die durchgezogenen Linien sind Fitkurven an die Messpunkte (siehe Text).

vollständigen Binden von Q an A auf. In Abb. 5.20 beobachtet man, dass die Maschine in Abwesenheit von Thrombin wesentlich schneller von der G-Quartett- in die Duplex-Struktur geschaltet werden kann. Die Kinetik dieses Schaltprozesses wird in Abschnitt eingehend untersucht. Der Ablöseschritt hingegen ist unabhängig von Thrombin und zeigt eine Kinetik zweiter Ordnung mit ungefähr derselben Zeitkonstante für beide Situationen ( $\tau = 220 - 240$  s ohne Thrombin,  $\tau = 290 - 350$  s mit Thrombin). Die Kinetik der Maschine wird in hohem Maße von der Gegenwart des „Haltepunkt“-Abschnittes beeinflusst, der an die Aptamersequenz angehängt ist. Um diesen Effekt weiter aufzuklären, wurde ein kürzerer Öffnungsstrang, QS, konstruiert, der zu der ursprünglichen 15 Basen langen Aptamersequenz komplementär ist, aber das Komplement des Haltepunktes nicht beinhaltet. In Abwesenheit von Thrombin geht die Maschine nach Zugabe von entweder Q oder QS schnell in die Duplexform über. Das Endniveau der Fluoreszenz ist dabei bei der A-QS Struktur geringfügig niedriger, da sich die Farbstoffe näher kommen als beim A-Q Komplex. In beiden Fällen sind die Halbwertszeiten für die Übergänge in der Größenordnung von  $\tau = 5$  s. Die Situation ist in der Gegenwart von Thrombin völlig verändert. Der Zeitverlauf der Fluoreszenz, der durch den Öffnungsstrang Q induziert wird, kann in diesem Fall gut durch eine Superposition eines Prozesses zweiter Ordnung und eines Prozesses erster Ordnung beschrieben werden. Die Halbwertszeit des Schrittes zweiter Ordnung beträgt  $\tau = 24$  s, die des Prozesses erster Ordnung ist  $\tau = 960$  s. Die schnelle Komponente wird wahrscheinlich von der Reaktion von Q mit thrombinfreiem A-Strängen verursacht sowie von der Bindung von Q an den Haltepunkt und seiner Wiederfreisetzung ((II) in Abb. 3.12). Der langsame Reaktionsschritt entspricht der Freigabe von Protein aus dem Q-A-T Komplex. Im Fall des QS Stranges, der nicht an die Haltepunkt-Sektion bindet, wird ein viel langsamerer Schritt erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von  $\tau = 1740$  s beobachtet. Die Fitkurven deuten an, dass der Haltepunkt die Freisetzungsrates des Proteins in etwa verdoppelt.

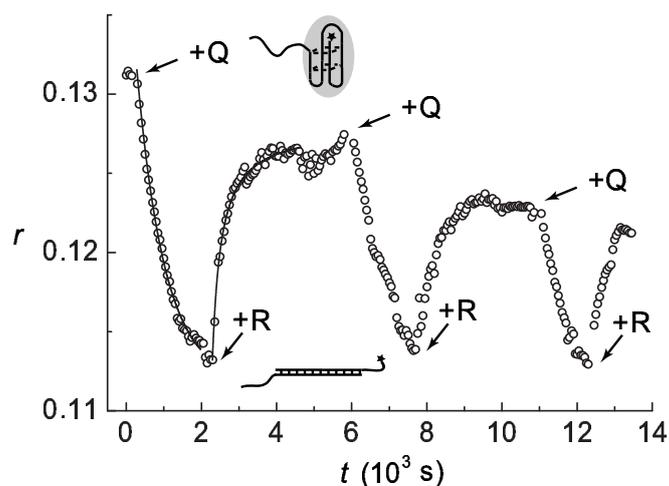


Abbildung 5.22: Fluoreszenzanisotropie  $r$  während des Betriebs der Aptamermaschine in Gegenwart von Thrombin. Die Signaländerung ist abhängig von der Bindung der Maschine an das Protein und zeigt daher direkt das Binden und Freigeben von Thrombin. Die durchgezogenen Linien sind Fitkurven an die Messpunkte.

### Fuoreszenzanisotropie-Messungen

Um das Binden und Freigeben von Thrombin durch die Maschine direkt zu beobachten, wurden Messungen der Fluoreszenzanisotropie  $r$  durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.2). In Abb. 5.22 ist  $r$  für einige Zyklen des Betriebs der Maschine dargestellt. Bei diesen Experimenten wurde nur der Aptamerstrang A fluoreszenzmarkiert. Fluoreszenzanisotropie reagiert empfindlich auf die Umgebung eines Fluorophors. Die Gegenwart des Proteins schränkt den rotatorischen Freiheitsgrad des Farbstoffs ein und erhöht dadurch die Anisotropie. Die Änderung von  $r$  entspricht folglich der Proteinbindung oder -freigabe. Der Öffnungsschritt bestätigt die Kinetik erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von etwa 600 s, der Bindungsschritt entspricht einer Reaktion zweiter Ordnung mit der Halbwertszeit  $\tau = 230$  s.

#### 5.3.4 Kinetik der Proteinfreigabe durch die Aptamermaschine

Zur Analyse des Öffnungsschrittes, bei dem das Protein Thrombin von der Thrombin-Aptamermaschine freigesetzt wird (von I über II nach III in Abb. 3.12, Kapitel 3.2.4) haben wir das in Abb. 4.2 in Kapitel 4.1.4 dargestellte Modell aufgestellt, das mögliche Teilschritte der Gesamtreaktion berücksichtigt.

#### *A priori* Bestimmung von Ausgangskonzentrationen und Ratenkonstanten

Die Werte für die verbleibenden Ratenkonstanten können folgendermaßen abgeschätzt werden: Wir betrachten zunächst nur das Öffnen der Aptamermaschine in Abwesenheit von Thrombin, d.h. die Reaktionen (1)-(4). Die erste Reaktion hängt mit der Stabilität der G-Quartett Sekundärstruktur des Aptamers ab. Mergny et al. haben diese Struktur untersucht und thermodynamische Daten erhalten [27]: Mit Reaktion (1) ist eine Freie Enthalpie von

$\Delta G_{298K} = -13.7$  kJ/mol bei  $T = 298$  K und in Gegenwart von  $K^+$  Ionen assoziiert, was einer Gleichgewichtskonstante von  $K = e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \approx 250$  entspricht. Die Raten  $k_3$ ,  $k_5$  und  $k_{11}$  sollten als typische DNA Hybridisierungs-Vorwärtsraten in der Größenordnung von  $10^{-3} \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [71] liegen, was uns als Ausgangswert zur numerischen Behandlung dient. Die Rate  $k_6$  kann aus der typischen Assoziations- und Dissoziationsrate eines 12 bp Duplexes und seiner Gleichgewichtskonstante für die Hybridisierung unter den gegebenen Pufferbedingungen abgeschätzt werden. Die Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{toe}} = k_5/k_6$  wird nach Gleichung 4.6 zu  $2.46 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  aus der Freien Standardenthalpie  $\Delta G_{298K}^0 = -53.5$  kJ/mol berechnet. Letztere wurde für unsere Sequenz mit dem Programm HYTHER<sup>TM</sup> berechnet [111]. Somit liegt der Ausgangswert für  $k_6$  bei  $k_6 = 4.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Die Raten  $k_9$  und  $k_{10}$  sind durch die Dissoziationskonstante  $K_d$  der Aptamermaschine über  $K_d = k_{10}/k_9$  verknüpft. Die Dissoziationskonstante wird im Folgenden durch eine Reihe von Fluoreszenzkorrelationsspektroskopiemessungen bestimmt, bei denen das anfängliche Verhältnis von Thrombin zu Aptamer variiert wird (siehe Kapitel 5.3.4).

Zwei Reihen von Experimenten mit einer unterschiedlichen Gesamtkonzentration von Aptamermaschinen (50 nM und 1  $\mu\text{M}$ ) und verschiedenen Verhältnissen an Protein zu Aptamer wurden durchgeführt. Die Anfangskonzentrationen wurden für die Simulationen entsprechend gewählt. Wie im Folgenden gezeigt werden wird, wurde die Dissoziationskonstante für den Aptamer-Protein-Komplex zu  $K_d = 122$  nM bestimmt. Aus diesem Wert können wir nun die Anfangskonzentration des an Protein gebundenen Aptamers berechnen:

$$x_7(0) = 1/2[(a + t + K_d) - ((a + t + K_d)^2 - 4at)^{1/2}] \quad (5.5)$$

wobei  $a$  und  $t$  die Gesamtkonzentrationen an Aptamer und Thrombin sind. Die Menge an freien Aptamermaschinen ist dann  $x_2(0) = a - x_7(0)$ , während die Menge an freiem Thrombin  $x_6(0) = t - x_7(0)$  ist. Der „Treibstoff“-Strang wird in Stöchiometrie zur Aptamermaschine  $x_3(0) = a$  zugegeben und alle anderen Konzentrationen werden zu Beginn auf Null gesetzt.

Die in den FRET-Experimenten gemessene Fluoreszenzintensität  $I$  ist proportional zur Konzentration der fluoreszierenden Spezies in der Probe, d.h.  $I \propto x_1 + x_2 + x_7 + \xi_1 x_5 + \xi_2 x_8$ . Hierbei wird angenommen, dass das Binden von Aptamer an Thrombin ( $x_7$ ) die Fluoreszenz nicht beeinflusst und dass das Binden des Treibstoffstranges  $x_3$  an die Haltepunktsequenz der Aptamermaschine ( $x_5$ ) zu einer Reduzierung der Fluoreszenz um einen Faktor  $0 \leq \xi_1 \leq 1$  aufgrund von FRET führt, während das Binden an die Haltepunktsequenz des Thrombin-Aptamer-Komplexes ( $x_8$ ) zu einer Reduzierung der Fluoreszenz um einen Faktor  $0 \leq \xi_2 \leq 1$  führt.

Zum Vergleich zwischen den Experimenten und dem kinetischen Modell wurden die Ratengleichungen in Mathlab (The MathWorks, Natick, MA, USA) implementiert und gelöst. Um die verbleibenden freien Parameter zu optimieren, wurde die mittlere quadratische Abweichung zwischen den experimentell bestimmten Daten und den berechneten Intensitätsverläufen minimiert. Dies wurde für alle acht experimentellen Zeitverläufe simultan durchgeführt.

### Bestimmung der Dissoziationskonstante

In Abb. 5.23 sind die normalisierten Autokorrelationsfunktionen für das Aptamer in Abwesenheit von Thrombin und in Gegenwart eines hundertfachen Überschusses von Thrombin gezeigt. Letzteres wurde so gewählt, dass alle Aptamermaschinen an das Protein gebunden sind. An diese zwei Kurven wurde jeweils eine Einzelkomponentenkurve entsprechend Gleichung 4.76 mit  $G_{\text{Diff}}$  aus Gleichung 4.72 angefitet. Für das Aptamer wurde die Diffusionszeit

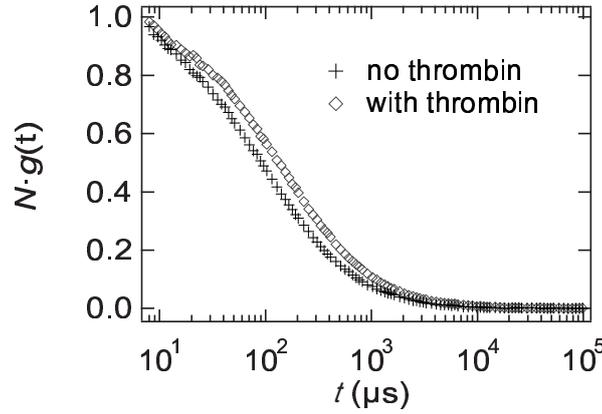


Abbildung 5.23: Experimentell ermittelte normalisierte Autokorrelationsfunktionen für die Aptamermaschine in Abwesenheit von Thrombin (Kreuze) und in Gegenwart eines hundertfachen Überschusses an Thrombin (Rauten). Durch Fits nach Gleichung 4.76 mit  $G_{\text{Diff}}$  aus Gleichung 4.72 an die Messwerte wurden die charakteristischen Diffusionszeiten zu  $\tau_{\text{D1}} = 97.0 \pm 2.6 \mu\text{s}$  (ohne Thrombin) und  $\tau_{\text{D2}} = 141.3 \pm 3.5 \mu\text{s}$  (Thrombin-Überschuss) bestimmt.

zu  $\tau_{\text{D1}} = 97.0 \pm 2.6 \mu\text{s}$  bestimmt, wohingegen sie für das an Thrombin gebundene Aptamer  $\tau_{\text{D2}} = 141.3 \pm 3.5 \mu\text{s}$  beträgt. Somit sind die Diffusionskonstanten  $D_1 = 76.6 \pm 3.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $D_2 = 52.6 \pm 2.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Die FCS-Messungen wurden bei einer Temperatur von  $T = 21.8 \pm 1.0^\circ\text{C}$  durchgeführt. Bei dieser Temperatur ist die Viskosität von Wasser  $\eta = 0.96 \pm 0.02 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  [126]. Aus den Diffusionskonstanten können die hydrodynamischen Radien  $R_H = k_B T / 6\pi\eta D$  des Aptamers und des Protein-Aptamer-Komplexes bestimmt werden zu  $R_{\text{H1}} = 2.9 \pm 0.2 \text{ nm}$  und  $R_{\text{H2}} = 4.3 \pm 0.3 \text{ nm}$ . Aus NMR- und Röntgenstrukturen kann die Größe des Aptamers [73] und die von an Thrombin gebundenem Aptamer [93] abgeschätzt werden. Der Rotationsradius dieser Strukturen ist  $r_{\text{Apt}} \approx 1.6 \text{ nm}$  und  $r_{\text{Apt+Th}} \approx 3 \text{ nm}$ . Bei unserer Aptamermaschine wurde die ursprüngliche Aptamerstruktur um eine 12 Nukleotid-lange Haltepunktsequenz erweitert. Nach dem Modell des halbsteifen Polymers (Kapitel 3.1.1) wird erwartet, dass diese nach Gleichung 3.4 einen End-zu-End-Abstand von  $\sqrt{\langle \vec{R}^2 \rangle} \approx \sqrt{2L \cdot L_P} = 3.2 \text{ nm}$  hat, wobei die Kontourlänge  $L = 12 \cdot 0.43 \text{ nm} = 5.2 \text{ nm}$  ist und als Persistenzlänge von ssDNA  $L_P = 1 \text{ nm}$  [127] angenommen wurde. Wenn man nun davon ausgeht, dass sich diese Länge einfach zum Durchmesser der Struktur addiert, erhält man Rotationsradien von  $r_{\text{Apt-toehold}} \approx 3.2 \text{ nm}$  und  $r_{\text{Apt-toehold+Th}} \approx 4.6 \text{ nm}$ , was sehr gut mit den hydrodynamischen Radien übereinstimmt.

Aus FCS-Messungen mit variiertem Thrombinkonzentration und „Zweikomponentenfits“ entsprechend Gleichung 4.76 mit  $G_{\text{Diff}}$  aus Gleichung 4.75 kann die Dissoziationskonstante  $K_d$  des Aptamer-Thrombin Komplexes ermittelt werden. Die Werte dieser „FCS-Titration“ in Abb. 5.24 entsprechen dem Wert  $Y$  in Gleichung 4.75, d. h. dem Verhältnis von thrombingebundenem Aptamer zur ursprünglichen Menge an Aptamermaschinen in Lösung. Die durchgezogene Kurve zeigt einen Fit mit Gleichung 5.5 (mit  $Y = x_7(0)/a$ ) an die gemessenen Daten für die gegebene anfängliche Aptamerkonzentration von  $a = 25 \text{ nM}$ . Aus diesem Fit ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $K_d = 122 \pm 16 \text{ nM}$ . Diese liegt sehr gut im Bereich der

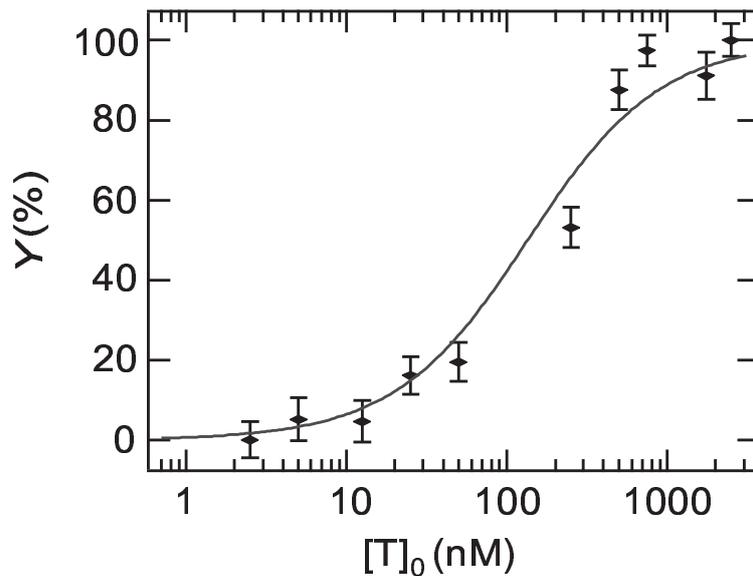


Abbildung 5.24: Aus den FCS-Experimenten erhaltene Titrationskurve. Der Prozentsatz von gebundenen Aptamer-Thrombin-Komplexen ( $Y$ ) ist als Funktion der anfänglichen Thrombinkonzentration  $[T]_0$  aufgetragen. Die durchgezogene Kurve entspricht einem Fit nach Gleichung 5.5 an die Messwerte mit  $K_d$  als dem einzig freien Parameter. Wir erhalten  $K_d = 122 \pm 16$  nM.

Dissoziationskonstanten, die in der Vergangenheit für das unmodifizierte Thrombin-Aptamer gefunden wurden (3 – 450 nM) [42, 46].

Unser kinetisches Modell berücksichtigt die Möglichkeit der Dimerbildung bei Thrombin [128, 125] wie auch die Tatsache, dass das Aptamer an zwei unterschiedliche Bindungsstellen des Proteins binden kann [93], nicht näher (siehe auch die Diskussion im Folgenden). Wenn es eine größere Menge von diesen Strukturen gibt, sollten wir diese in den FCS-Experimenten als Spezies mit langsamerer Diffusion sehen. Da dies in unserem betrachteten Konzentrationsbereich nicht der Fall zu sein scheint, nehmen wir an, dass für unsere kinetische Analyse die Berücksichtigung von einfachen 1:1 Aptamer-Thrombin-Komplexen ausreichend ist.

### Vergleich der Ergebnisse aus Experimenten und Simulationen

Die experimentellen Ergebnisse des Abfalls der Fluoreszenzintensität für die Aptamermaschine nach Zugabe des Treibstoffstranges sind in Abb. 5.25 a) und Abb. 5.26 a) für unterschiedliche Verhältnisse zwischen Aptamer und Protein gezeigt. Abb. 5.25 a) enthält die Kurven für  $[A]_0 = x_1(0) + x_2(0) + x_7(0) = 1 \mu\text{M}$ , während Abb. 5.26 a) die Kurven für  $[A]_0 = 50$  nM zeigt. Für beide Konzentrationen kann der Abfall für lange Zeiten nach Zugabe von Thrombin im Überschuss sehr gut durch einen exponentiellen Abfall beschrieben werden. Dieser Prozess entspricht der Freigabe des Proteins durch die Aptamermaschine. Aus diesem Fit mit einer Exponentialfunktion kann die Ratenkonstante  $k_{13} = 6.5 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$  bestimmt werden. Für die numerischen Simulationen wurde  $k_{13}$  auf diesen Wert festgelegt. Im Gegensatz zum Verhalten für lange Reaktionszeiten ist der anfängliche Fluorezenzabfall deutlich unterschiedlich bei den zwei unterschiedlichen Kurvenscharen in Abb. 5.25 a) und Abb. 5.26 a). Dies

bedeutet, dass ein konzentrationsabhängiger Schritt zweiter Ordnung wie z.B. Hybridisierung zwischen Treibstoff- und Aptamermaschinenstrang zu diesem anfänglichen Abfall beitragen. Möglicherweise wird dieser Schritt durch die Ratenkonstanten  $k_3, k_5, k_7$  oder  $k_{11}$  bestimmt. Um eine quantitative Beschreibung des Gesamtprozesses zu erhalten, wurde das oben beschriebene kinetische Modell benutzt, um einen Satz von Ratenkonstanten zu finden, mit dem alles experimentellen Daten in Abb. 5.25 a) und Abb. 5.26 a) gleichermaßen vernünftig gefittet werden können. Es sollte erwähnt werden, dass eine nahezu perfekte Übereinstimmung zwischen einer einzelnen Datenkurve und dem Modell erzielt werden kann (wie dies bei der obersten Kurve in Abb. 5.27a der Fall ist). Unser Ziel war hier jedoch eine umfassende Beschreibung unserer Daten, um die konzentrationsabhängigen Prozesse besser zu erfassen. Basierend auf unseren bisherigen Überlegungen wurden die Ratenkonstanten innerhalb physikalisch sinnvoller Grenzen variiert, um die Least-Square-Abweichung zu allen experimentellen Kurven in Abb. 5.25 a) und Abb. 5.26 a) gleichzeitig zu minimieren.

Wir beginnen die Simulationen mit  $k_3 = k_5 = 10^{-3} \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $k_4 = k_8 = k_{14} = 0$ ;  $k_6 = 4.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{13} = 6.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  als festgelegten Parametern und variieren die verbleibenden Parameter  $k_1, k_2, k_7, k_9, k_{10}, k_{11}, k_{12}, \xi_1$  und  $\xi_2$ .

Es zeigt sich, dass die Ratenkonstante  $k_1$  über einen extrem großen Bereich variiert und sogar gleich Null gesetzt werden kann, ohne das Ergebnis zu verschlechtern. Da in unserem Modell  $k_2 \approx k_1/250$  ist, macht das im Wesentlichen die Reaktionen (1) und (2) unwichtig (und damit  $k_3$ ). Desweiteren zeigt sich, dass die besten Ergebnisse erhalten werden für eine Fluoreszenzreduzierung von  $\xi_1 = 0$ . Das heißt, dass in unserem Experimenten Reaktion (4) im Wesentlichen nicht beobachtbar ist, da sie nur mit einer vernachlässigbaren Fluoreszenzänderung einhergeht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Abwesenheit des Proteins die Hybridisierung des Effektorstranges mit der gefalteten Aptamermaschine als ein einziger Reaktionsschritt beobachtet wird. Die Raten  $k_6$  und  $k_7$  können in unseren Experimenten ebenfalls nicht aufgelöst werden und somit können schließlich die Reaktionen (3) und (4) zu einer einzigen Reaktion zweiter Ordnung zusammengefügt werden. Anstelle von  $k_5 = 10^{-3} \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_6 = 4.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , und  $k_7 = 6.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  wird nach Gleichung 4.20 die modifizierte Vorwärtsrate  $k'_5 = k_5 \cdot k_7 / (k_6 + k_7) = 6.2 \times 10^{-4} \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}$  eingeführt und  $k'_6 = k'_7 = 0$  verwendet. Die Situation ist eine andere in der Gegenwart des Proteins. Hier werden die Reaktionen (6) und (7) tatsächlich als zwei separate Schritte beobachtet.

Von den verbleibenden freien Parametern  $k_9, k_{10}, k_{11}, k_{12}$  finden wir, dass die Rückwärtsrate  $k_{12}$  ebenfalls keinen signifikanten Einfluß auf das Resultat der numerischen Simulation hat. Das Verhältnis  $k_{10}/k_9$  ist durch die bereits bestimmte Dissoziationskonstante  $K_d$  festgelegt. Um eine bestmögliche Übereinstimmung zwischen der Simulation und dem Experiment zu erzielen, wird der Quench-Faktor  $\xi_2 = 0.3$  gesetzt. Physikalisch bedeutet das, dass in Spezies  $x_8$  (Treibstoffstrang gebunden and Protein-Aptamer-Komplex) der Abstand zwischen den Farbstoffen groß genug ist, um vollständiges Quenchen in diesem Zwischenzustand zu verhindern. Das kann einfach als Ergebnis der Anwesenheit des relativ großen Proteins verstanden werden.

Die Ergebnisse der numerischen Simulationen sind in Abb. 5.25 b) und Abb. 5.26 b) für die folgenden Parameter dargestellt:  $k_1 = 0, k_2 = 0, k_3 = 0, k_4 = 0, k'_5 = 6.2 \times 10^{-4} \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}, k'_6 = 0, k'_7 = 0, k_8 = 0, k_9 = 10^{-5} \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}, k_{10} = 1.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}, k_{11} = 10^{-4} \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}, k_{12} = 0, k_{13} = 6.5 \times 10^{-4} \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}, k_{14} = 0, \xi_1 = 0, \xi_2 = 0.3$ .

In diesem Zusammenhang bedeutet das Nullsetzen einer Ratenkonstante, dass die entsprechende Rate nicht aus unseren Experimenten bestimmt werden kann, aber bei anderen Anfangsbedingungen durchaus ein Wert ungleich Null gewählt werden muss. Verglichen mit dem

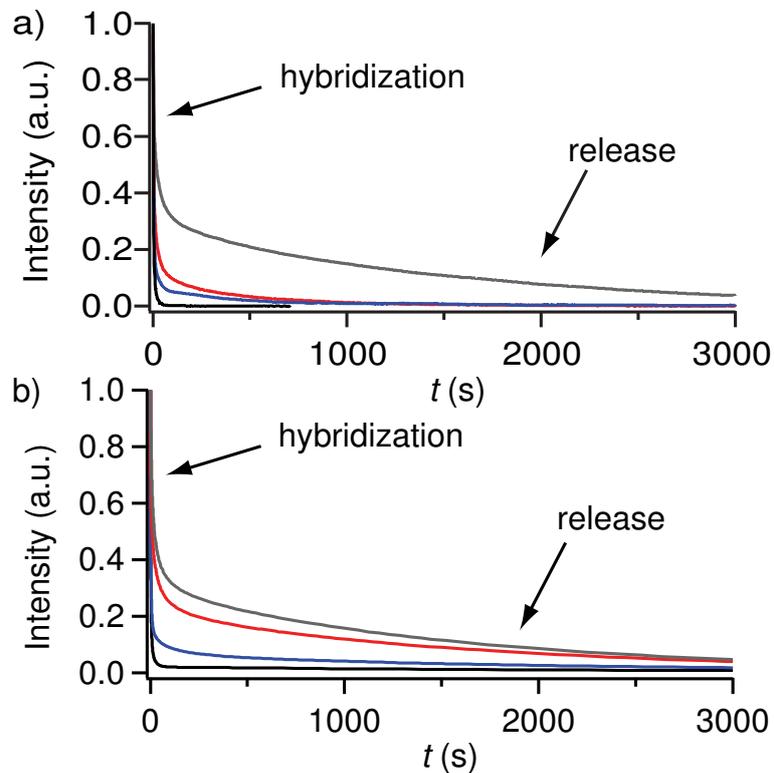


Abbildung 5.25: a) Die zeitlichen Fluoreszenzverläufe für die Aptamermaschine mit einer Konzentration von  $[A]_0 = 1\mu\text{M}$  und 5:1, 1:1, 1:5, 0:1 Verhältnissen von Thrombin zu Aptamer (von oben nach unten) nach Starten der Proteinfreisetzung durch Zugabe des Treibstoffstranges. Der anfängliche (steile) Abfall entspricht der Hybridisierung des Treibstoffstranges und der Aptamermaschine und ist zweiter Ordnung. Dagegen entspricht der flache Abfall bei längeren Zeiten der Freigabe von Protein (siehe Text). b) Die entsprechenden zeitlichen Verläufe, die mit dem kinetischen Modell für die Proteinfreisetzung mit einem einzigen Satz an Ratenkonstanten für alle Kurven berechnet wurden. Insgesamt wird das Verhalten der experimentellen Kurven gut wiedergegeben. Insbesondere die schnelle Hybridisierung und die langsame Freisetzungsphase stimmen gut mit den experimentellen Daten überein.

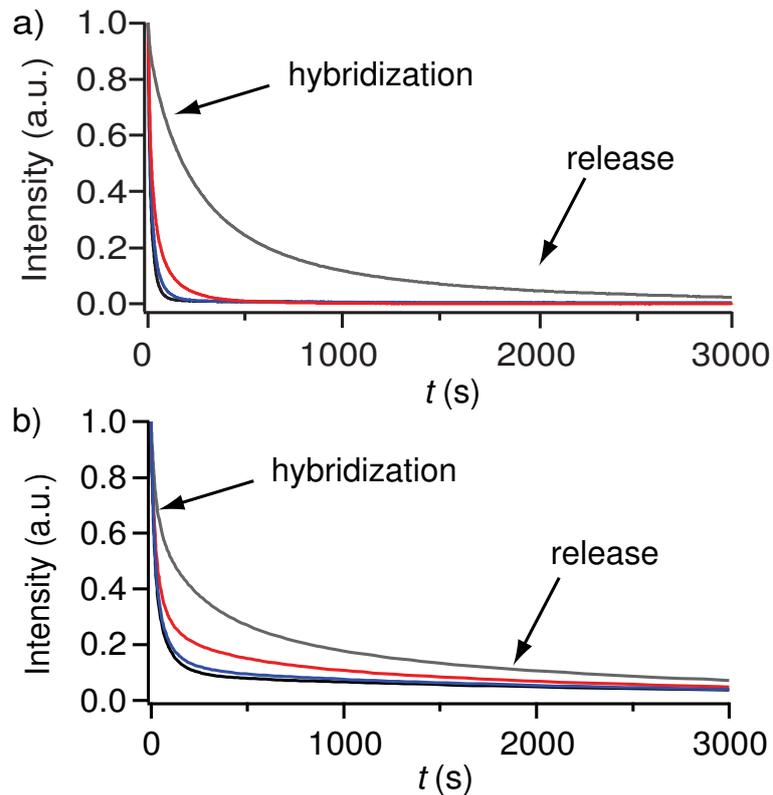


Abbildung 5.26: a) Die zeitlichen Fluoreszenzverläufe für die Aptamermaschine mit einer Konzentration von  $[A]_0 = 50$  nM und 5:1, 1:1, 1:5, 0:1 Verhältnissen von Thrombin zu Aptamer (von oben nach unten). Der Vergleich mit Abb. 5.25 a) zeigt, dass der anfängliche Abfall wiederum der Hybridisierung von Treibstoffstrang und Aptamermaschine entspricht und stark von den DNA-Strangkonzentrationen abhängt. b) Die entsprechenden berechneten zeitlichen Verläufe für die niedrigen DNA-Konzentrationen, wobei dieselben Parameter wie in Abb. 5.25 b) verwendet wurden. Insgesamt wird das Verhalten der Kurven wiederum gut reproduziert.

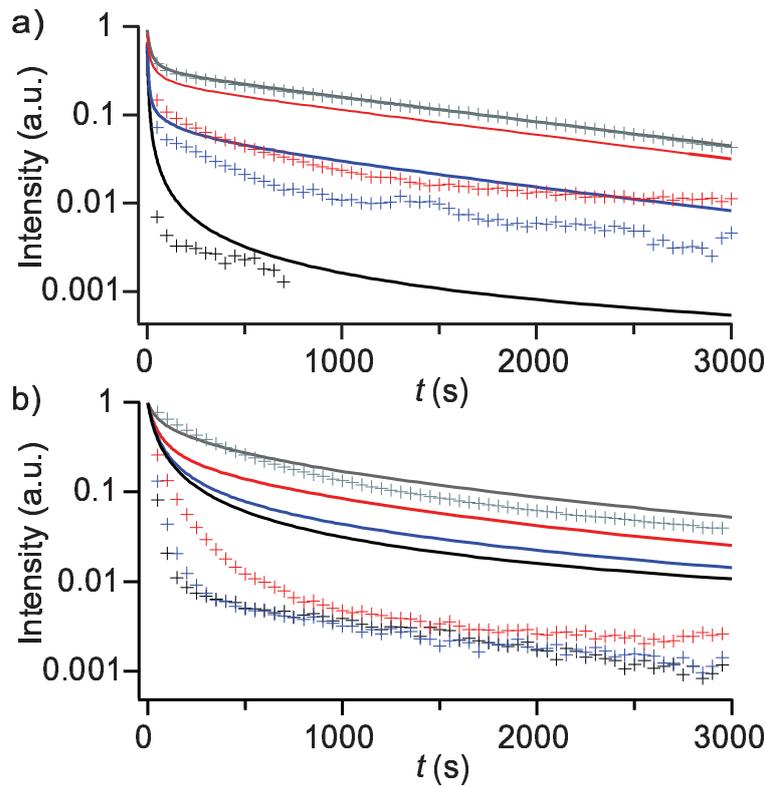


Abbildung 5.27: a) Halblogarithmische Darstellung der Messdaten (Ein Kreuz repräsentiert jeweils den 50. Datenpunkt) und der entsprechenden berechneten Fitkurven (durchgezogene Kurven) für eine Aptamermaschinenkonzentration von  $[A]_0 = 1 \mu\text{M}$  und 5:1, 1:1, 1:5, 0:1 Verhältnissen von Thrombin zu Aptamer (von oben nach unten). b) Halblogarithmische Darstellung der niedrigen Konzentrationen ( $[A]_0 = 50 \text{ nM}$ , Rest wie in a). Es wurden für beide Sätze von Fitkurven dieselben Parameter verwendet.

Protein-freien Fall ist die Vorwärtsrate  $k_{11}$  für die Hybridisierung des Effektorstranges mit der Haltepunktsequenz um nahezu eine Größenordnung reduziert. Das zeigt, dass die Hybridisierung in der Tat durch die Gegenwart des Proteins leicht gehemmt wird.

Es gibt es eine gute generelle Übereinstimmung zwischen der Simulation und den experimentellen Ergebnissen. Die Hauptmerkmale: ein schneller anfänglicher Fluoreszenzabfall gefolgt von einem langsamen Abfall in der Gegenwart von Thrombin werden gut wiedergegeben.

Zum direkten Vergleich zwischen den experimentellen und den Ergebnissen aus der Simulation dient die halblogarithmische Darstellung in Abb. 5.27. Wir sehen klar den exponentiellen Langzeitverlauf sowohl in den berechneten wie auch in den gemessenen Kurven durch den geradlinigen Verlauf ab ca. der Hälfte der Messzeit. In Abb. 5.27a sehen wir, dass die Situation für niedrige und hohe Proteinkonzentrationen besonders gut reproduziert wird, während es Abweichungen für die beiden mittleren Verläufe gibt. Bei den niedrigen Konzentrationen (Abb. 5.27b) wird der Gesamttrend korrekt wiedergegeben, insbesondere der exponentielle Abfall. Die logarithmische Skala übertreibt zudem die Abweichungen bei geringen Intensitäten.

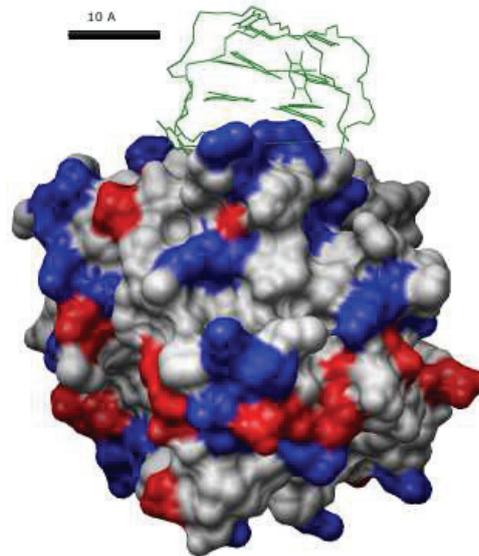


Abbildung 5.28: Röntgenstruktur des Aptamer-Thrombin-Komplexes (nach [92]). Das elektrostatische Potential der Aminosäuren des Proteins sind farblich gekennzeichnet: rot bedeutet negativ geladen, blau positiv. Es ist deutlich zu sehen, dass die Bindungsstelle, an die das Aptamer bindet, ein positiv geladener Bereich ist.

Natürlich ist jedoch klar, dass der berechnete anfängliche Abfall langsamer ist, als der gemessene für  $[A]_0 = 50 \text{ nM}$ , außer für  $[T]_0 = 250 \text{ nM}$  (die obere Kurve), was uns die Begrenzung unseres numerischen Modells bewusst macht.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich folgendes vereinfachtes Bild, das die experimentell beobachtete Kinetik der Aptamermaschine hinreichend erklärt: In Gegenwart des Proteins liegt der Aptamerstrang entweder an das Protein gebunden oder frei in Lösung vor. Wenn der Treibstoffstrang zugegeben wird, bindet dieser entweder an einen Aptamerstrang, der an das Protein gebunden ist oder frei in Lösung vorliegt. Zugegebener Treibstoffstrang hybridisiert schnell an freie und etwas langsamer an gebundene Aptamerstränge. Im Übergangskomplex aus Aptamer, Protein und Treibstoffstrang ist die Fluoreszenz nur teilweise auf Grund von FRET gequencht. Aus diesem Übergangszustand wird das Protein in einem langsamen Schritt erster Ordnung freigegeben und der Treibstoffstrang bindet vollständig an den Aptamerstrang. Offensichtlich ist der erste Schritt – Hybridisierung von Treibstoff- und Aptamerstrang – konzentrationsabhängig, während der zweite Schritt dies nicht ist. Das erklärt die Hauptmerkmale, die in Abb. 5.25 a) und Abb. 5.26 a) beobachtet werden.

Die Reduzierung der Hybridisierungsrate zwischen Effektorstrang und Haltepunkt in Gegenwart von Thrombin ist in besonderem Maße interessant. Wir können uns folgende Ursachen für die Reduzierung der Hybridisierungseffizienz vorstellen: 1. Wenn Thrombin an die Aptamermaschine gebunden ist, nimmt das Protein Platz ein und die Hybridisierung zwischen Haltepunkt und Treibstoffstrang kann sterisch behindert sein. 2. Es wurde herausgefunden,

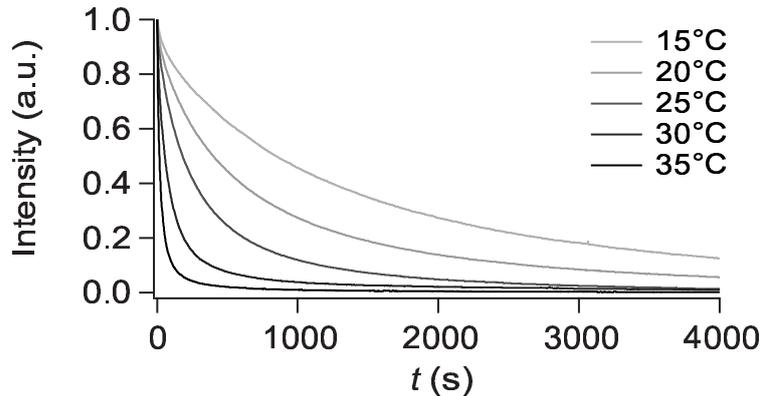


Abbildung 5.29: Fluoreszenzintensitätsabfall für  $[A]_0 = 50 \text{ nM}$  und  $[T]_0 = 250 \text{ nM}$  bei Temperaturen von  $T = 15^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$  und  $35^\circ\text{C}$  (von oben nach unten).

dass das ursprüngliche DNA-Thrombinaptamer entweder an Exosite I oder II von Thrombin bindet [93]. Diese Exosites – auch bekannt als Anionen-Bindungs-Exosites – sind, wie man aus Abb. 5.28 erkennen kann, positiv geladen [129] und können daher mit dem negativ geladenen DNA-Rückgrat unserer Aptamermaschine elektrostatisch wechselwirken. Diese geladenen Bereiche können auch mit der Haltepunktsequenz der Aptamermaschine interagieren und so eventuell die Fähigkeit zur Hybridisierung mit dem Treibstoffstrang verringern.

### Temperaturabhängigkeit des Freisetzungsprozesses

Zusätzlich zur Konzentrationsabhängigkeit wurde auch die Temperaturabhängigkeit des Freisetzungsprozesses untersucht. Abb. 5.29 zeigt den Intensitätsabfall für  $[A]_0 = 50 \text{ nM}$  und  $[T]_0 = 250 \text{ nM}$  bei Temperaturen von  $T = 15^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$  und  $35^\circ\text{C}$  nach Zugeben des Treibstoffstranges in Stöchiometrie zum Aptamerstrang. Wie erwartet fällt die Fluoreszenz bei höheren Temperaturen schneller ab. Indes ist der Einfluss der Temperatur auf den Freisetzungsprozess ziemlich komplex, da die in Abb. 4.2 a) gezeigten chemischen Gleichgewichte in unterschiedlichem Maße betroffen sind. Wir konzentrieren uns hier auf das kinetische Verhalten bei langen Zeiten, welches gut durch einen einfachen exponentiellen Zerfall gefittet werden kann. Wie bereits diskutiert wurde, entspricht das dem Proteinfreisetzungsprozess. Die Raten für den Langzeitabfall werden aus den in Abb. 5.29 gezeigten Kurven durch einen Exponentialfit ermittelt. Für diese simple Teilreaktion nehmen wir nun an, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Arrhenius-Gleichung

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (5.6)$$

genügen. Durch Logarithmieren erhält man

$$\ln k = -\frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln A \quad (5.7)$$

Abb. 5.29 zeigt den resultierenden Arrhenius-Plot der Freisetzungsratenkonstanten (die  $k_{13}$  in Abb. 4.2 a) entsprechen), in dem  $\ln k$  über die inverse Temperatur aufgetragen ist. Wir erhalten eine Gerade  $y = mx + b$ , was unsere Annahme rechtfertigt und können aus dem  $y$ -Achsenabschnitt  $b = \ln A$  und der Steigung  $m = -E_a/R$  den Frequenzfaktor  $A = 5.3 \pm 1.6 \text{ s}^{-1}$

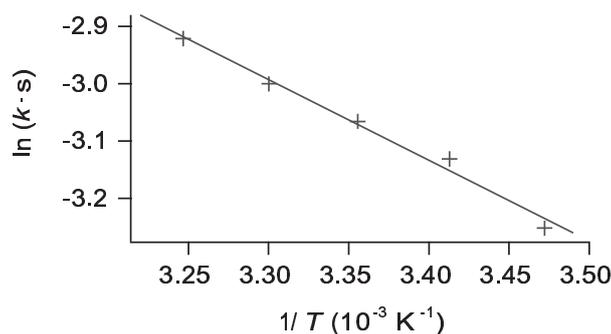


Abbildung 5.30: Arrhenius-Plot. Die Raten wurden für den exponentiellen Abfall im Langzeitverhalten der Fluoreszenzkurven aus Abb. 5.29 ermittelt. Nach Gleichung 5.3.4 erhalten wir in dieser Auftragung eine Gerade.

und die Aktivierungsenergie  $E_a = 11.7 \pm 0.8 \text{ kJ/mol}$  bestimmen. Demzufolge ist  $E_a$  von derselben Größenordnung wie die Energie einer typischen Wasserstoffbrückenbindung, die bei Wasser etwa  $7.9 \text{ kJ/mol}$  beträgt [130].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit präsentierte Entwicklung eines schaltbaren proteinbindenden DNA-Aptamers die präzise Steuerung der Konzentration des frei in Lösung befindlichen Proteins Thrombin zwischen einem verarmten und einem angereicherten Zustands ermöglicht. Die Kombination des Operationsprinzips von DNA-basierten nanomechanischen Strukturen mit den Bindungseigenschaften von DNA-Aptameren erweitert den Spielraum für die Konstruktion weiterer funktionaler DNA-Nanomaschinen bedeutend. Da sich Aptamere für die Bindung an eine Vielzahl beliebiger Verbindungen konstruieren lassen, sollten ausgehend von der beschriebenen Maschine daher weitere DNA-basierte Nanomaschinen konstruiert werden können, die andere Moleküle als Thrombin tragen, binden und wieder freigeben. Bislang wurde noch kein weiteres schaltbares Nukleinsäure-Aptamer vorgestellt, obwohl hierzu auch in unserer Gruppe zahlreiche Experimente durchgeführt worden sind. Problematisch könnte hierbei sein, dass ein Aptamer durch Anbringen einer Steuer- oder Haltpunktsequenz seine Bindungsfähigkeit verliert, oder dass die Bindung des Aptamers durch Zugeben eines Treibstoffstranges nicht beeinträchtigt wird. In Kürze wird von Eike Friedrichs die erfolgreiche Entwicklung eines schaltbaren DNA-Aptamers publiziert, das kontrolliert an Taq-Polymerase bindet und diese dadurch deaktiviert [131]. Es gilt in der Zukunft herauszufinden, warum das von uns vorgestellte Prinzip nicht einfach auf beliebige Aptamere übertragen werden kann.

Die in diesem Kapitel quantitativ untersuchte nichttriviale Kinetik des eigentlich sehr einfachen Thrombin-Aptamer-Systems könnte zeigt Parallelen zur Modellierung von Enzymkinetiken, welche eine der Wurzeln der heutigen Systembiologie ist. Die ermittelte Dissoziationskonstante  $K_D \approx 120 \text{ nM}$  zeigt, dass die Bindung unseres schaltbaren Aptamers im Vergleich zum ursprünglichen DNA-Thrombin-Aptamer kaum beeinträchtigt ist [42].

# 6 Ausblick

In diesem kurzen Ausblick wird ein Überblick gegeben, welche Trends und Entwicklungen aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und Erkenntnisse in Zukunft von Bedeutung sein können. Vorstellbare Anwendungen der untersuchten DNA-basierten Nanomaschinen und -aktuatoren im medizinischen und pharmazeutischen Bereich sowie als Modellsystem für die Systembiologie werden diskutiert.

## 6.1 Einzelmolekülfluoreszenzmessungen an „DNA-Devices“

Einzelmolekülmessungen zur Charakterisierung von DNA-basierten Nanomaschinen und -aktuatoren – wie die in dieser Arbeit und die kürzlich von Buranachai et al. veröffentlichten an einem DNA-„Nanometronom“ [132] – werden in Zukunft wesentlich an Bedeutung bei der Entwicklung von DNA-Nanomaschinen und -aktuatoren gewinnen, da sie Einblick in die tatsächlich vorliegenden Strukturen der DNA-Konstrukte ermöglichen. Durch neue Einzelmolekülmessungen wird es möglich sein, die Dynamik der Strukturänderungen von DNA-Aktuatoren genauer zu untersuchen. Der Einsatz von drei Fluoreszenzfarbstoffen und entsprechende Einzelmolekülmessungen können bei der Analyse komplexerer DNA-Maschinen oder bei zwei einfachen DNA-Nanogeräten, die miteinander interagieren, zum Einsatz kommen und simultan wertvolle Informationen über Fluoreszenzresonanz-Energietransfer zwischen drei Farbstoffpaaren liefern, woraus wieder auf Abstandsänderungen geschlossen werden kann [100]. Hierzu bietet die Methode der gepulsten „verschachtelten“ Anregung (PIE), die bereits in unseren Experimenten zum Einsatz kam, ideale Voraussetzungen. Diese Methode erlaubt außerdem die zuverlässige Bestimmung niedriger FRET-Effizienzen, was bei Abständen zwischen den Farbstoffen von etwa dem zweifachen Förster-Radius sehr wichtig ist.

## 6.2 Metallnanopartikel–DNA-Maschinen

Da es widersprüchliche experimentelle Befunde und Aussagen über den Mechanismus und die Abstandsabhängigkeit des Energietransfers von Farbstoffen bzw. Halbleiternanokristallen auf Gold-Nanopartikel gibt (siehe Referenzen [90] und [86]), können stabile hybride DNA-Aktuatoren unter Umständen sogar einen Beitrag zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen leisten. Gerade Einzelmolekülexperimente könnten hier zuverlässige Messwerte liefern. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann man sagen, dass an DNA gebundene Gold-Nanopartikel die Rolle des Akzeptorfarbstoffs für Fluoreszenzmessungen übernehmen können und dadurch der Abstandsreichweite, der zugänglich ist, von etwa 10 nm bei FRET mit zwei Farbstoffen auf etwa 20 nm verdoppelt werden kann. Dies kann

in künftigen DNA-Nanoaktuatoren gezielt eingesetzt werden, wenn man Bewegungen über derart „große“ Abstände verfolgen will.

Schaltbare DNA-„Hybridmaterialien“ sind eine denkbare Anwendung der hier vorgestellten Hybridaktuatoren. In ihrer einfachsten Form als zweidimensionales DNA-Gitter, in das Metallnanopartikel integriert sind und das zwischen zwei Gittergrößen umgeschaltet werden kann, sind solche Materialien vielleicht in Kürze schon realisierbar, da sowohl ein DNA-Gitter mit integrierten Gold-Nanopartikeln [133] als auch ein schaltbares DNA-Gitter [134] in den letzten Jahren bereits präsentiert wurden.

### 6.3 Schaltbare DNA-Aptamere

Die in dieser Arbeit präsentierte Entwicklung eines schaltbaren proteinbindenden DNA-Aptamers ermöglicht die Steuerung der Konzentration des frei in Lösung befindlichen Proteins Thrombin zwischen einem verarmten und einem angereicherten Zustand. Die Kombination des Operationsprinzips von DNA-basierten nanomechanischen Strukturen mit den Bindungseigenschaften von DNA-Aptameren erweitert den Spielraum für die Konstruktion weiterer funktionaler DNA-Nanomaschinen bedeutend. Da sich Aptamere für die Bindung an eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle entwickeln lassen, sollten ausgehend von der beschriebenen Maschine daher weitere DNA-basierte Nanomaschinen konstruiert werden können, die andere Moleküle als Thrombin tragen, binden und wieder freigeben. Bislang wurde noch kein weiteres schaltbares Nukleinsäure-Aptamer vorgestellt, obwohl hierzu auch in unserer Gruppe zahlreiche Experimente durchgeführt worden sind. In Kürze wird von Eike Friedrichs die erfolgreiche Entwicklung eines schaltbaren DNA-Aptamers publiziert, das kontrolliert an Taq-Polymerase bindet und diese dadurch deaktiviert [131]. Es gilt in der Zukunft herauszufinden, ob und wie das von uns vorgestellte Prinzip auf beliebige Aptamere übertragen werden kann.

Es liegen bereits Arbeiten vor, die die Immobilisierung von DNA-Aptameren auf Oberflächen vorstellen. Wenn es in Zukunft gelingt, schaltbare Nukleinsäure-Aptamere an Oberflächen anzubinden, hätte man ein steuerbares Depot für z. B. Thrombin. Dieses könnte im proteinbindenden Zustand gefüllt werden, und bei Bedarf könnte man durch Zugeben eines Treibstoffstranges das Protein freigeben und so dessen Konzentration in Lösung erhöhen. Bei der Realisierung dieses Vorhabens wird man auf einige Fragestellungen und Schwierigkeiten treffen: Kann neben dem 5'-Ende der Thrombin-Aptamersequenz auch die Sequenz am 3'-Ende erweitert werden, ohne die Bindungseigenschaften zu beeinträchtigen? Wie gelingt es zu gewährleisten, dass ein immobilisiertes Aptamer sowohl seine Bindungsfähigkeit als auch seine „Schaltbarkeit“ behält? Auf die erste Frage haben Beyer et al. die Antwort gefunden, dass ihre Thrombin-Aptamere mit am 3'-Ende erweiterten Sequenzen binden nicht mehr an Thrombin [135]. Dementgegen fanden Liu et al., dass ihre am 3'- und am 5'-Ende erweiterten Thrombin-Aptamere (die auf derselben Aptamersequenz basieren) auch nach dem Einbau in ein zweidimensionales DNA-Gitter ihre Thrombin-Bindungsfähigkeit besitzen [125]. Vermutlich kommt es also darauf an, wie man die Aptamersequenz am 3'-Ende erweitert. Ob die Immobilisierung eines schaltbaren Aptamers realisiert werden kann, bleibt bislang jedoch offen.

Eine der konkreten Herausforderungen im Bereich der DNA-Nanogeräte ist der Transport von (Makro-) Molekülen. Wenn es gelingt, ein schaltbares Aptamer mit sich selbst bewegen-

den DNA-Konstrukten („Walker“) zu kombinieren, hätte man ein Transportsystem vergleichbar dem von Motorproteinen in der Zelle geschaffen, das eine geringe Last spezifisch binden, über eine bestimmte Strecke transportieren und anschließend wieder freigeben kann. Einfache DNA-Walker existieren bereits in unterschiedlichen Varianten [136, 137, 138, 139, 140, 141]. Ein interessantes Beispiel eines autonomen DNA-Nanomotors auf der Basis eines RNA-schneidenden DNA-Enzyms stammt von Chen et al. [142]. Hierbei bewegen sich die zwei Arme des Motors kontinuierlich zwischen einem offenen und einem geschlossenen Zustand hin und her (vergleichbar mit den entsprechenden Zuständen der DNA-Tweezers, siehe Kapitel 3.2.1). Der Motor selbst bewegt sich aber nicht gerichtet entlang einer Strecke, wie das bei den „Walkern“ der Fall ist.

## 6.4 Medizinische und pharmazeutische Anwendungen

DNA vereint als Baumaterial für die Nanobiotechnologie viele Vorteile. Sie verfügt über einen einzigartigen Selbsterkennungsmechanismus, ist biokompatibel und außerdem als Aptamer in der Lage, Moleküle zu erkennen und zu binden.

Das 28-Basen-RNA-Aptamer „Pegaptanib“ bindet spezifisch an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) [143]. Es verhindert das Binden von VEGF an dessen Rezeptoren, die hauptsächlich auf der Oberfläche der vaskulären Endothelzellen angesiedelt sind. Dadurch wird die pathologische Angiogenese (Wachstum von kleinen Blutgefäßen) gehemmt. Das Zuckerrückgrat von pegaptanib ist modifiziert, um den Abbau der RNA durch Endonukleasen oder Exonukleasen zu verhindern. Zudem sind zwei  $\sim 20$  kDa Polyethylenglykol-Einheiten kovalent an das Aptamer angebunden, um die Halbwertszeit des Wirkstoffes zu verlängern. Seit Februar 2006 ist Pegaptanib zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration (AMD, degenerative Netzhauterkrankung) in Deutschland zugelassen. Pegaptanib wird von Pfizer unter dem Markennamen Macugen<sup>TM</sup> vertrieben. Ein noch neuerer Ansatz besteht in der Verwendung von siRNA-Molekülen, die direkt die Bildung von VEGF unterdrücken sollen. Ein Wirkstoffkandidat, Sirna-027, ist eine chemisch optimierte kurze interferierende RNA-Sequenz, die von Sirna Therapeutics entwickelt wurde (gehört mittlerweile zu Merck) und sich mittlerweile in den USA in der 2. klinischen Phase zur Zulassung befindet.

Es gibt bereits Sensoren, die auf Aptameren basieren, und über die im vorhergehenden Kapitel beschriebene Depotfunktion von immobilisierten schaltbaren Aptameren ist auch eine kontrollierte Abgabe von Proteinen oder sonstigen Wirkstoffen vorstellbar. Rusconi et al. konnten durch *in vivo*-Experimente zeigen, dass der Blutgerinnungsprozess durch die Wechselwirkung eines RNA-Aptamers mit dem bei der Blutgerinnung involvierten Protein Faktor IX beeinflusst werden konnte [144]. Dabei konnte das RNA-Aptamer durch Zugabe eines RNA-„Antidot“-Strangs, der komplementär zu einem Teil der Aptamersequenz ist, deaktiviert werden. Die Funktionsweise ist der von unserem schaltbaren Thrombin-Aptamer sehr ähnlich, mit dem Unterschied dass das Deaktivieren des Aptamers bei Rusconi et al. nicht reversibel ist. Unter Verwendung unseres schaltbaren Thrombin-Aptamers könnte so unter Umständen Thrombose verhindert werden, da das Aptamer Thrombin bindet und dessen Wirkung unterdrücken kann, bzw. der Wundheilungsprozess durch Schalten in die nichtbindende Konfiguration (wieder) ermöglicht wird. Derartige steuerbare DNA-Aptamere sind somit ein vielversprechender Ansatz für das Forschungsgebiet „drug release“ („Wirkstofffreigabe“). DNA-basierte Nanomaschinen, -aktuatoren und „Hybrid-Devices“ stellen also einen wichtigen Ausgangs-

punkt zur Entwicklung neuer Materialien für pharmazeutische und biomedizinische Anwendungen dar.

## 6.5 Werkzeugkasten für Systembiologen

Systembiologie ist die Wissenschaft, die die Prinzipien aufdeckt, die der Entstehung der funktionalen Eigenschaften von lebenden Organismen aus den Wechselwirkungen von Makromolekülen zugrunde liegt [145]. Der Hauptfokus der Systembiologie zielt darauf, die Regulierung von komplexen zellulären Transportwegen und von interzellulärer Kommunikation auf quantitative und voraussagbare Weise zu verstehen, um so Aufschluss über komplexe biologische Funktionen zu erhalten wie z. B. den Metabolismus, die Signalübermittlung in Zellen, den Zellzyklus, die Apoptose (programmierter Zelltod), die Zelldifferenzierung und die genetische Transformation.

Bei den DNA-basierten Nanomaschinen und -aktuatoren gibt es einige Parallelen zu den in der Systembiologie untersuchten Systemen: Es gibt logische Schalter [64], die z. B. den Bindungszustand eines Aptamers kontrollieren können [146], Nukleinsäuren mit katalytischer Wirkung (siehe Kapitel 2.1.3), es können einfache Regelkreise realisiert werden und sogar die genetische Kontrolle von DNA-Aktuatoren ist möglich, wie Dittmer et al. gezeigt haben [147, 148]. Beyer und Simmel haben einen Signalübersetzer entwickelt, der einen beliebigen Inputstrang auf einen Effektorstrang übersetzt, der dann z. B. als Steuerstrang für eine DNA-Maschine dient [149]. Eine der historischen Wurzeln der Systembiologie liegt in der quantitativen Modellierung der Enzymkinetik (1900-1970). Auch in dieser Arbeit wurde die nichttriviale Kinetik eines sehr einfachen Systems quantitativ untersucht (Kapitel 5.3.4).

Die heute bereits zur Verfügung stehenden DNA-Konstrukte mit vielen einfachen aber interessanten Funktionen können also in der Zukunft als „Modellbaukasten“ oder Werkzeugkasten für Systembiologen dienen, denn viele Konstrukte lassen sich miteinander kombinieren. Der Vorteil liegt hier darin, dass das System vom Menschen entworfen und variiert werden kann. Aufgrund der Einfachheit der künstlichen Systeme könnte es gelingen, hier gewonnene Erkenntnisse in Modelle für die ungleich komplexeren natürlichen biologischen Systeme zu übertragen.

# A Anhang

## A.1 Moleküldarstellungen

Zur Moleküldarstellung wurden die folgenden Bioinformatik-Tools verwendet:

### UCSF Chimera

Die Molekulare Darstellung in den Abbildungen 3.2, 3.4b und c, 3.11 in Kapitel 3.11 sowie die Abbildung 5.28 in Kapitel 5.3 wurden mit dem Grafikprogramm UCSF Chimera erzeugt, welches von der Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics an der University of California, San Francisco zur Verfügung gestellt wird [150]. Dieses Projekt wird unterstützt durch NIH P41 RR-01081.

Weitere Informationen finden sich auf der Chimera-Website:

<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

### RCSB Protein Data Bank

Die den Abbildungen zugrundeliegenden Strukturen wurden der Protein Data Bank (Protein-Datenbank, PDB) des Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) entnommen [151].

Weitere Informationen finden sich auf der PDB-Website:

<http://www.pdb.org/>

Dort finden sich auch Links zu weiteren Software-Tools.

## A.2 IGOR-Fitfunktion für FCS-Daten

```
#pragma rtGlobals=1          // Use modern global access method.

Function G1(S,tau,t)
// Diffusion contribution for each species variable S
// Structure parameter variable tau
// characteristic diffusion time of this species variable t

return 1/ ((1+t/tau)*sqrt(1+t/(tau*S*S)))
end

Function Gmulti(w,t) : FitFunc wave w
```

```

// coefficient wave variable t

variable i variable ret
  //CurveFitDialog/ These comments were created by the Curve Fitting dialog.
  //CurveFitDialog/ Altering them will make the function less convenient
  //CurveFitDialog/ to work with in the Curve Fitting dialog.
  //CurveFitDialog/ Equation:
  //CurveFitDialog/  $f(x)=1+(1+((w[0]/(1-w[0]))*exp(-t/w[1]))/w[2])$ 
  //CurveFitDialog/  $*1/((1+t/w[4])*sqrt(1+t/(w[4]*w[3]^2)))$ 
  //CurveFitDialog/ End of Equation

  // Assignments of the parameters to the elements of the coefficient wave:
  variable triplet=w[0]      // triplet fraction: [0,1]
  variable tauT=w[1]        // triplet time (microseconds)
  variable N=w[2]           // Number of particles
  variable tau=w[3]         // char. diffusion time (microseconds)
  variable S=w[4]           // structure parameter
  // If there is more than one species existent, the wave is extended by:
  // w[5] fraction of species 1: [0,1]
  // w[6] characteristic diffusion time of species 2
  // w[7] fraction of species 2: [0,1]

  variable num=floor((numpts(w)-4)/2) // number of species
  variable index

  if(num==0) // only one fraction
    ret=G1(S,tau,t)
    return 1+((1+(triplet/(1-triplet))*exp(-t/tauT))/N)*ret
  endif
  ret=w[5]*G1(S,tau,t) // first fraction
  for(index=1;index<num;index+=1)
    ret+=w[5+2*index]*G1(S,w[4+2*index],t)
    // following fraction(s)
  endfor
  return 1+((1+(triplet/(1-triplet))*exp(-t/tauT))/N)*ret
  // calculate triplet correction
End

```

### A.3 IGOR Macro zur Auswertung von Zeiss ConfoCor 2 RAW-Data

Nähere Informationen zum RAW-Data Format des Zeiss ConfoCor 2 findet man online unter:

[http://www.zeiss.de/C12567BE00472A5C/EmbedTitelIntern/RawData/\\$File/RawData.pdf](http://www.zeiss.de/C12567BE00472A5C/EmbedTitelIntern/RawData/$File/RawData.pdf)

```

#pragma rtGlobals=1 // Use modern global access method.

Menu "Macros"
  "SplitWavesIn2 /1"
  "GetCounts /2"
  "BinCounts /3"
  "Histogramm /4"
  "TotalFE /5"
End

Macro SplitWavesIn2()

  // Raw Data from Zeiss ConfoCor2 have been loaded as follows:
  // Data.. Load Waves.. Load General Binary File

```

```

// Input file:
// Data Type: 8 bit unsigned Integer
// Bytes to skip at start of file: 30
// Number of arrays in file: 1
// Number of points in array: auto
// Bite order: High byte first -- shouldn't matter
// Output waves:
// Data Type: 8 bit unsigned Integer
// Base name: rawdata
//
// Resulting Wave rawdata0 has to be renamed to rawdata !!
// This macro sorts Time and Event Bytes into two separate waves:
// rawtime, rawevents

Silent 1;PauseUpDate

variable index=0
WaveStats rawdata
variable numP=V_npnts/2
Make/N=(numP)/D/O rawtime, rawevents
Do
    rawtime[index] = rawdata[2*index]
    rawevents[index] = rawdata[2*index+1]
    index += 1
while(index < 2*numP)

end

Macro GetCounts()

// This Macro evaluates the events separate for channels 1 and 2
// (Donor and Acceptor, i.e. Cy5 and Tamra)
// Three waves are created: realtime, ch1, ch2:
// realtime indicates the time point [microsecs] of an event
// ch1 and ch2 indicates whether in ch1 and/or ch2 an event was observed
// realtime, ch1 and ch2 are shortened (all zeros from realtime deleted)

Silent 1;PauseUpDate

variable indexR=0,indexF=0,tindex=0,timer=0
WaveStats rawtime
variable numP=V_npnts
Make/N=(numP)/D/O realtime, ch1, ch2
Do
    if (rawevents[indexR]==0)
        tindex += 1
    else
        indexF+=1
        realtime[indexF]=realtime[indexF-1]+(258*(tindex)+rawtime[indexR]+timer)*0.05
        if ( rawevents[indexR] & 1 )
            ch1[indexF]=1
        endif
        if ( rawevents[indexR] & 2 )
            ch2[indexF]=1
        endif
        if (rawevents[indexR]&4 || rawevents[indexR]&8)
            indexF+=1
            realtime[indexF]=realtime[indexF-1]+0.05
            timer=2
            if (rawevents[indexR]&4)
                ch1[indexF]=1
            endif
            if (rawevents[indexR]&8)
                ch2[indexF]=1
            endif
        endif
    else

```

```

        timer+=1
    endif
    if (rawevents[indexR]&16 || rawevents[indexR]&32)
        indexF+=1
        realtime[indexF]=realtime[indexF-1]+(3-timer)*0.05
        timer=1
        if (rawevents[indexR]&16)
            ch1[indexF]=1
        endif
        if (rawevents[indexR]&32)
            ch2[indexF]=1
        endif
    else
        timer+=1
    endif
    if (rawevents[indexR]&64 || rawevents[indexR]&128)
        indexF+=1
        realtime[indexF]=realtime[indexF-1]+timer*0.05
        timer=0
        if (rawevents[indexR]&64)
            ch1[indexF]=1
        endif
        if (rawevents[indexR]&128)
            ch2[indexF]=1
        endif
    else
        timer+=1
    endif
    tindex =0
endif
indexR += 1
while(indexR < numP)
indexF=0
do
    indexF+=1
    while(realtime[indexF]>0)
DeletePoints (indexF),(numP-indexF), realtime,ch1,ch2
end
end

```

Macro BinCounts()

```

    // Counts in ch1 or ch2 are collected in bins of defined
    // binwidth [microsecs] into waves c1 and c2

    Silent 1;PauseUpDate

    variable indexR=0, indexC=0, binwidth=25000
    WaveStats realtime
    variable numP=V_max/binwidth
    print numP
    Make/N=(numP)/D/0 c1,c2,c12
    Do
        if (realtime[indexR] <= indexC*binwidth)
            if (ch1[indexR]==1)
                c1[indexC]+=1
            endif
            if (ch2[indexR]==1)
                c2[indexC]+=1
            endif
            indexR += 1
        else
            indexC += 1
        endif
    while(indexR < V_npnts)
    c12=c1+c2
end

```

```
Macro Histogramm()  
  
    // Finally the FRET Efficiency (FretEff) for c1 and c2 is calculated  
    // A Threshold can be set  
    // The Histogram FEHist of the Fret Efficiencies is calculated and displayed  
  
    Silent 1;PauseUpDate  
  
    variable index=0, threshold=10  
    WaveStats c1  
    Make/N=(V_npnts)/D/0 FretEff, FEHist  
    Do  
        if (c1[index]+c2[index] > threshold)  
            FretEff[index]=c1[index]/(c1[index]+c2[index])  
        else  
            FretEff[index]=-1  
        endif  
        index+= 1  
    while(index < V_npnts)  
    Histogram/B={0,0.05,20} FretEff,FEHist  
    Display FEHist  
    ModifyGraph mode=5,hbFill=4  
end  
  
Macro TotalFE()  
  
    // The Total FRET Efficiency of a Histogram FEHist  
    // is calculated.  
  
    Silent 1;PauseUpDate  
  
    variable index=0, bins=20  
    string state="c1"  
    WaveStats FEHist  
    Make/N=(V_npnts)/D/0 Total=0  
    Do  
        Total[index]=FEHist[index]*index  
        index+= 1  
    while(index < V_npnts)  
    WaveStats Total  
end
```



# Literaturverzeichnis

- [1] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York, 1st edition, 1997.
- [2] C. M. Niemeyer. Self-assembled nanostructures based on DNA: towards the development of nanobiotechnology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(6):609–618, 2000.
- [3] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806–811, 1998.
- [4] J. Couzin. Breakthrough of the year: Small RNAs make big splash. *Science*, 298(5602):2296–2297, 2002.
- [5] J. D. Watson and F. H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356):737–738, 1953.
- [6] N. C. Seeman. Nucleic acid junctions: Building blocks for genetic engineering in three dimensions. In R.H. Sarma, Herausgeber, *Biomolecular Stereodynamics*, p. 269–277, New York, 1981. Adenine Press.
- [7] N. R. Kallenbach, R. I. Ma, and N. C. Seeman. An immobile nucleic-acid junction constructed from oligonucleotides. *Nature*, 305(5937):829–831, 1983.
- [8] J. H. Chen and N. C. Seeman. Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature*, 350(6319):631–633, 1991.
- [9] Y. W. Zhang and N. C. Seeman. Construction of a DNA-truncated octahedron. *Journal of the American Chemical Society*, 116(5):1661–1669, 1994.
- [10] W. M. Shih, J. D. Quispe, and G. F. Joyce. A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron. *Nature*, 427(6975):618–621, 2004.
- [11] R. P. Goodman, I. A. T. Schaap, C. F. Tardin, C. M. Erben, R. M. Berry, C. F. Schmidt, and A. J. Turberfield. Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks for molecular nanofabrication. *Science*, 310(5754):1661–1665, 2005.
- [12] T. J. Fu and N. C. Seeman. DNA double-crossover molecules. *Biochemistry*, 32(13):3211–3220, 1993.

- [13] T. H. LaBean, H. Yan, J. Kopatsch, F. R. Liu, E. Winfree, J. H. Reif, and N. C. Seeman. Construction, analysis, ligation, and self-assembly of DNA triple crossover complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 122(9):1848–1860, 2000.
- [14] E. Winfree, L. Furong, L. A. Wenzler, and N. C. Seeman. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature*, 394:539–544, 1998.
- [15] S. Beyer. *DNA-based Molecular Templates and Devices*. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, 2006.
- [16] N. C. Seeman and P. S. Lukeman. Nucleic acid nanostructures: bottom-up control of geometry on the nanoscale. *Reports on Progress in Physics*, 68(1):237–270, 2005.
- [17] U. Feldkamp and C. M. Niemeyer. Rational design of DNA nanoarchitectures. *Angewandte Chemie-International Edition*, 45(12):1856–1876, 2006.
- [18] Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union. Maschinenrichtlinie 98/37/EG. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*, L207:1-46, 1998.
- [19] J. Weiß. *DIE ZEIT - Das Lexikon in 20 Bänden*. Zeitverlag Gerd Bucerius, Hamburg, 2005. Band 9.
- [20] F. C. Simmel and B. Yurke. DNA-based nanodevices. In H. S. Nalwa, Herausgeber, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Band 2, p. 495–504, Los Angeles, 2004. American Scientific Publishers.
- [21] T. Liedl, T. L. Sobey, and F. C. Simmel. DNA-based nanodevices. *Nano Today*, 2(2):36–41, 2007.
- [22] A. Condon. Designed DNA molecules: principles and applications of molecular nanotechnology. *Nature Reviews Genetics*, 7(7):565–575, 2006.
- [23] M. K. Beissenhirtz and I. Willner. DNA-based machines. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4(18):3392–3401, 2006.
- [24] F. C. Simmel and W. U. Dittmer. DNA nanodevices. *Small*, 1(3):284–299, 2005.
- [25] C. D. Mao, W. Q. Sun, Z. Y. Shen, and N. C. Seeman. A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA. *Nature*, 397(6715):144–146, 1999.
- [26] D. Sen and W. Gilbert. A sodium-potassium switch in the formation of 4-stranded G4-DNA. *Nature*, 344(6265):410–414, 1990.
- [27] J. L. Mergny, A. T. Phan, and L. Lacroix. Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Letters*, 435(1):74–78, 1998.
- [28] K. Gehring, J. L. Leroy, and M. Gueron. A tetrameric DNA-structure with protonated cytosine-cytosine base-pairs. *Nature*, 363(6429):561–565, 1993.
- [29] S. Ahmed, A. Kintanar, and E. Henderson. Human telomeric C-strand tetraplexes. *Nat Struct Mol Biol*, 1(2):83–88, 1994.

- [30] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, F. C. Simmel, and J. L. Neumann. A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. *Nature*, 406(6796):605–608, 2000.
- [31] F. C. Simmel and B. Yurke. Using DNA to construct and power a nanoactuator. *Physical Review E*, 6304(4), 2001.
- [32] F. C. Simmel and B. Yurke. A DNA-based molecular device switchable between three distinct mechanical states. *Applied Physics Letters*, 80(5):883–885, 2002.
- [33] H. Yan, X. P. Zhang, Z. Y. Shen, and N. C. Seeman. A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology. *Nature*, 415(6867):62–65, 2002.
- [34] J. W. J. Li and W. H. Tan. A single DNA molecule nanomotor. *Nano Letters*, 2(4):315–318, 2002.
- [35] P. Alberti and J. L. Mergny. DNA duplex-quadruplex exchange as the basis for a nanomolecular machine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4):1569–1573, 2003.
- [36] A. J. Turberfield, J. C. Mitchell, B. Yurke, A. P. Mills, M. I. Blakey, and F. C. Simmel. DNA fuel for free-running nanomachines. *Physical Review Letters*, 90(11), 2003. 118102.
- [37] A. D. Ellington and J. W. Szostak. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287):818–822, 1990.
- [38] C. Tuerk and L. Gold. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968):505–510, 1990.
- [39] D. L. Robertson and G. F. Joyce. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, 344(6265):467–468, 1990.
- [40] R. A. Beckman, A. S. Mildvan, and L. A. Loeb. On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. *Biochemistry*, 24(21):5810–5817, 1985.
- [41] J. W. Famulok, M. Szostak. In-vitro-Selektion spezifisch ligandenbindender Nucleinsäuren. *Angewandte Chemie*, 104(8):1001–1011, 1992.
- [42] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, and J. J. Toole. Selection of single-stranded-DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 355(6360):564–566, 1992.
- [43] P. Morawitz. Beiträge zur Kenntnis der Blutgerinnung. *Deutsches Archiv für klinische Medizin*, 79:215–233, 1904.
- [44] R. A. Potyrailo, R. C. Conrad, A. D. Ellington, and G. M. Hieftje. Adapting selected nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors. *Analytical Chemistry*, 70(16):3419–3425, 1998.
- [45] M. N. Stojanovic, P. de Prada, and D. W. Landry. Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine. *Journal of the American Chemical Society*, 8(21):4928–4931, 2001.

- [46] J. W. J. Li, X. H. Fang, and W. H. Tan. Molecular aptamer beacons for real-time protein recognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(1):31–40, 2002.
- [47] R. Nutiu and Y. F. Li. Structure-switching signaling aptamers. *Journal of the American Chemical Society*, 125(16):4771–4778, 2003.
- [48] T. R. Cech, A. J. Zaug, and P. J. Grabowski. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*, 27(3, Part 2):487–496, 1981.
- [49] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, and S. Altman. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35(3, Part 2):849–857, 1983.
- [50] D. P. Bartel and J. W. Szostak. Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences. *Science*, 261(5127):1411–1418, 1993.
- [51] B. Zhang and T. R. Cech. Peptide bond formation by in vitro selected ribozymes. *Nature*, 390(6655):96–100, 1997.
- [52] A. C. Forster and R. H. Symons. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active-sites. *Cell*, 49(2):211–220, 1987.
- [53] J. Haseloff and W. L. Gerlach. Sequences required for self-catalysed cleavage of the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Gene*, 82(1):43–52, 1989.
- [54] M. Martick and W. G. Scott. Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell*, 126(2):309–320, 2006.
- [55] R. R. Breaker and G. F. Joyce. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chemistry & Biology*, 1(4):223–229, 1994.
- [56] R. R. Breaker and G. F. Joyce. A DNA enzyme with  $Mg_2^+$ -dependent RNA phosphoesterase activity. *Chemistry & Biology*, 2(10):655–660, 1995.
- [57] S. W. Santoro and G. F. Joyce. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9):4262–4266, 1997.
- [58] B. Cuenoud and J. W. Szostak. A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature*, 375(6532):611–614, 1995.
- [59] F. J. Grundy and T. M. Henkin. tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. *Cell*, 74(3):475–482, 1993.
- [60] B. J. Tucker and R. R. Breaker. Riboswitches as versatile gene control elements. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(3):342–348, 2005.
- [61] S. M. Knudsen and A. D. Ellington. Aptazymes: Allosteric ribozymes and deoxyribozymes as biosensors. In S. Klussmann, Herausgeber, *The Aptamer Handbook*, p. 290–310, Wiley-VCH. Weinheim, 2006.

- [62] H. Porta and P. M. Lizardi. An allosteric hammerhead ribozyme. *Bio-Technology*, 13(2):161–164, 1995.
- [63] M. N. Stojanovic, P. de Prada, and D. W. Landry. Catalytic molecular beacons. *Chem-BioChem*, 2(6):411–415, 2001.
- [64] M. N. Stojanovic, T. E. Mitchell, and D. Stefanovic. Deoxyribozyme-based logic gates. *Journal of the American Chemical Society*, 124(14):3555–3561, 2002.
- [65] M. N. Stojanovic and D. Stefanovic. Deoxyribozyme-based half-adder. *Journal of the American Chemical Society*, 125(22):6673–6676, 2003.
- [66] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, and J. J. Storhoff. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382(6592):607–609, 1996.
- [67] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, and P. G. Schultz. Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. *Nature*, 382(6592):609–611, 1996.
- [68] J. J. Storhoff, A. A. Lazarides, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, and G. C. Schatz. What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies? *Journal of the American Chemical Society*, 122(19):4640–4650, 2000.
- [69] C. M. Niemeyer, W. Burger, and J. Peplies. Covalent DNA – streptavidin conjugates as building blocks for novel biometallic nanostructures. *Angewandte Chemie-International Edition*, 37(16):2265–2268, 1998.
- [70] D. Zanchet, C. M. Micheel, W. J. Parak, D. Gerion, and A. P. Alivisatos. Electrophoretic isolation of discrete Au nanocrystal/DNA conjugates. *Nano Letters*, 1(1):32–35, 2001.
- [71] Victor A. Bloomfield, Donald M. Crothers, and Ignacio Jr. Tinoco. *Nucleic acids structures, properties, and functions*. University Science Books, Sausalito, CA, 2000.
- [72] J. Howard. *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2001.
- [73] P. Schultze, R. F. Macaya, and J. Feigon. 3-dimensional solution structure of the thrombin-binding DNA aptamer D(GGTTGGTGTGGTTGG). *Journal of Molecular Biology*, 235(5):1532–1547, 1994.
- [74] E. Henderson, C. C. Hardin, S. K. Walk, I. Tinoco, and E. H. Blackburn. Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine guanine base-pairs. *Cell*, 51(6):899–908, 1987.
- [75] J. R. Williamson, M. K. Raghuraman, and T. R. Cech. Mono-valent cation induced structure of telomeric DNA - the G-quartet model. *Cell*, 59(5):871–880, 1989.
- [76] K. Phillips, Z. Dauter, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, and B. Luisi. The crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex at 0.95 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 273(1):171–182, 1997.

- [77] Konrad Kopitzki. *Einführung in die Festkörperphysik*. B. G. Teubner, Stuttgart, 3. Auflage, 1993.
- [78] J. Aizpurua, P. Hanarp, D. S. Sutherland, M. Käll, Garnett W. Bryant, and F. J. García de Abajo. Optical properties of gold nanorings. *Physical Review Letters*, 90(5):057401, 2003.
- [79] U. Kreibig. Electronic properties of small silver particles: the optical constants and their temperature dependence. *Journal of Physics F: Metal Physics*, 4(7):999–1014, 1974.
- [80] H. Hövel, S. Fritz, A. Hilger, U. Kreibig, and M. Vollmer. Width of cluster plasmon resonances: Bulk dielectric functions and chemical interface damping. *Physical Review B*, 48(24):18178–18188, 1993.
- [81] S. L. Logunov, T. S. Ahmadi, M. A. El-Sayed, J. T. Khoury, and R. L. Whetten. Electron dynamics of passivated gold nanocrystals probed by subpicosecond transient absorption spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 101(19):3713–3719, 1997.
- [82] M. C. Daniel and D. Astruc. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104(1):293–346, 2004.
- [83] T. G. Schaaff, M. N. Shafiqullin, J. T. Khoury, I. Vezmar, R. L. Whetten, W. G. Cullen, P. N. First, C. GutierrezWing, J. Ascensio, and M. J. JoseYacaman. Isolation of smaller nanocrystal au molecules: Robust quantum effects in optical spectra. *Journal of Physical Chemistry B*, 101(40):7885–7891, 1997.
- [84] R. R. Chance, Prock A., and R. Silbey. Molecular fluorescence and energy transfer near interfaces. In I. Prigogine and S. A. Rice, Herausgeber, *Advances in Chemical Physics*, Band 38, p. 1–65, Hoboken, NJ, 1978. Wiley.
- [85] B. N. J. Persson and N. D. Lang. Electron-hole-pair quenching of excited-states near a metal. *Physical Review B*, 26(10):5409–5415, 1982.
- [86] C. S. Yun, A. Javier, T. Jennings, M. Fisher, S. Hira, S. Peterson, B. Hopkins, N. O. Reich, and G. F. Strouse. Nanometal surface energy transfer in optical rulers, breaking the FRET barrier. *Journal of the American Chemical Society*, 127(9):3115–3119, 2005.
- [87] E. Dulkeith, A. C. Morteani, T. Niedereichholz, T. A. Klar, J. Feldmann, S. A. Levi, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, M. Möller, and D. I. Gittins. Fluorescence quenching of dye molecules near gold nanoparticles: Radiative and nonradiative effects. *Physical Review Letters*, 89(20), 2002. 203002.
- [88] J. Gersten and A. Nitzan. Spectroscopic properties of molecules interacting with small dielectric particles. *Journal of Chemical Physics*, 75(3):1139–1152, 1981.
- [89] E. Dulkeith, M. Ringler, T. A. Klar, J. Feldmann, A. M. Javier, and W. J. Parak. Gold nanoparticles quench fluorescence by phase induced radiative rate suppression. *Nano Letters*, 5(4):585–589, 2005.
- [90] Z. Gueroui and A. Libchaber. Single-molecule measurements of gold-quenched quantum dots. *Physical Review Letters*, 93(16), 2004. 166108.

- [91] A. Fan, C. Lau, and J. Lu. Magnetic bead-based chemiluminescent metal immunoassay with a colloidal gold label. *Analytical Chemistry*, 77(10):3238–3242, 2005.
- [92] K. Padmanabhan and A. Tulinsky. An ambiguous structure of a DNA 15-mer thrombin complex. *Acta Crystallographica Section D*, 52(2):272–282, 1996.
- [93] K. Padmanabhan, K. P. Padmanabhan, J. D. Ferrara, J. E. Sadler, and A. Tulinsky. The structure of  $\alpha$ -thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded-DNA aptamer. *Journal of Biological Chemistry*, 268(24):17651–17654, 1993.
- [94] Maryan von Smoluchowski. Contribution à la théorie de l'endosmose électrique et de quelques phénomènes corrélatifs. *Bulletin de l'Académie des Sciences de Cracovie, Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles. Series A: Sciences Mathématiques*, 8:182–200, 1903.
- [95] Jean-Louis Viovy. Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms. *Reviews of Modern Physics*, 72(3):813–872, 2000.
- [96] J. Sambrook and D. W. Russell. *Molecular cloning - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, (N.Y.), 3. Auflage, 2001.
- [97] L. Stryer and R. P. Haugland. Energy transfer - a spectroscopic ruler. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(2):719–726, 1967.
- [98] J. R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer Academic/Plenum, New York, 2. Auflage, 1999.
- [99] Michel Daune. *Molekulare Biophysik*. Vieweg, Braunschweig, 1997.
- [100] B. K. Müller, E. Zaychikov, C. Bräuchle, and D. C. Lamb. Pulsed interleaved excitation. *Biophysical Journal*, 89(5):3508–3522, 2005.
- [101] D. Magde, W. W. Webb, and E. L. Elson. Thermodynamic fluctuations in a reacting system - Measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters*, 29(11):705–708, 1972.
- [102] E. L. Elson and D. Magde. Fluorescence correlation spectroscopy .1. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13(1):1–27, 1974.
- [103] M. Eigen and R. Rigler. Sorting single molecules - Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(13):5740–5747, 1994.
- [104] J. Widengren, U. Mets, and R. Rigler. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet-states in solution - a theoretical and experimental-study. *Journal of Physical Chemistry*, 99(36):13368–13379, 1995.
- [105] B. Rauer, E. Neumann, J. Widengren, and R. Rigler. Fluorescence correlation spectroscopy of the interaction kinetics of tetramethylrhodamin  $\alpha$ -bungarotoxin with Torpedo californica acetylcholine receptor. *Biophysical Chemistry*, 58(1-2):3–12, 1996.
- [106] P. Schwille. Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 34(3):383–408, 2001.

- [107] O. Krichevsky and G. Bonnet. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Reports on Progress in Physics*, 65(2):251–297, 2002.
- [108] T. Liedl, S. Keller, F. C. Simmel, J. O. Rädler, and W. J. Parak. Fluorescent nanocrystals as colloidal probes in complex fluids measured by fluorescence correlation spectroscopy. *Small*, 1(10):997–1003, 2005.
- [109] D. Magde, E. L. Elson, and W. W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy .2. Experimental realization. *Biopolymers*, 13(1):29–61, 1974.
- [110] H. Schürer, A. Buchynskyy, K. Korn, M. Famulok, P. Welzel, and U. Hahn. Fluorescence correlation spectroscopy as a new method for the investigation of aptamer/target interactions. *Biological Chemistry*, 382(3):479–481, 2001.
- [111] N. Peyret and J. SantaLucia. HyTher<sup>TM</sup>, version 1.0. Website. Online verfügbar unter: <http://ozone.chem.wayne.edu/>; berechnet am 14. Januar 2005.
- [112] L. P. Reynaldo, A. V. Vologodskii, B. P. Neri, and V. I. Lyamichev. The kinetics of oligonucleotide replacements. *Journal of Molecular Biology*, 297(2):511–520, 2000.
- [113] B. H. Zimm. Theory of melting of the helical form in double chains of the DNA type. *Journal of Chemical Physics*, 33(5):1349–1356, 1960.
- [114] T. Förster. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften*, 33(6):166–175, 1946.
- [115] T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437(1-2):55–75, 1948.
- [116] J. D. Jackson. *Classical electrodynamics*. Wiley, New York, 1963.
- [117] J. Perrin. Fluorescence et induction moléculaire par résonance. *Comptes rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 184:1097–1100, 1927.
- [118] D. L. Dexter. A theory of sensitized luminescence in solids. *Journal of Chemical Physics*, 21(5):836–850, 1953.
- [119] R. M. Clegg. *Fluorescence resonance energy transfer*, p. 179–252. In Wang, X. F. and Herman, B., Herausgeber, Chemical Analysis 137. Wiley, New York ; Chichester, 1996.
- [120] A. A. Deniz, M. Dahan, J. R. Grunwell, T. J. Ha, A. E. Faulhaber, D. S. Chemla, S. Weiss, and P. G. Schultz. Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Förster distance dependence and subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7):3670–3675, 1999.
- [121] N. K. Lee, A. N. Kapanidis, Y. Wang, X. Michalet, J. Mukhopadhyay, R. H. Ebright, and S. Weiss. Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation. *Biophysical Journal*, 88(4):2939–2953, 2005.

- [122] A. N. Kapanidis, N. K. Lee, T. A. Laurence, S. Doose, E. Margeat, and S. Weiss. Fluorescence-aided molecule sorting: Analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(24):8936–8941, 2004.
- [123] W. J. Kim, T. Ishihara, T. Akaike, and A. Maruyama. Comb-type cationic copolymer expedites DNA strand exchange while stabilizing DNA duplex. *Chemistry - A European Journal*, 7(1):176–180, 2001.
- [124] W. U. Dittmer, A. Reuter, and F. C. Simmel. A DNA-based machine that can cyclically bind and release thrombin. *Angewandte Chemie-International Edition*, 43(27):3550–3553, 2004.
- [125] Y. Liu, C. X. Lin, H. Y. Li, and H. Yan. Protein nanoarrays – Aptamer-directed self-assembly of protein arrays on a DNA nanostructure. *Angewandte Chemie-International Edition*, 44(28):4333–4338, 2005.
- [126] D. R. Lide and H. V. Kehiaian. *CRC handbook of thermophysical and thermochemical data*. CRC Press, Boca Raton, 1994.
- [127] B. Tinland, A. Pluen, J. Sturm, and G. Weill. Persistence length of single-stranded DNA. *Macromolecules*, 30(19):5763–5765, 1997.
- [128] P. J. Anderson. A dimeric form of prothrombin on membrane surfaces. *Biochemical Journal*, 336:631–638, 1998. Part 3.
- [129] J. A. Huntington. Molecular recognition mechanisms of thrombin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8):1861–1872, 2005.
- [130] O. Markovitch and N. Agmon. Structure and energetics of the hydronium hydration shells. *Journal of Physical Chemistry A*, 111(12):2253–2256, 2007.
- [131] E. Friedrichs and F. C. Simmel. Controlling DNA polymerization with a switchable aptamer. *Wird in Kürze veröffentlicht*.
- [132] C. Buranachai, S. A. McKinney, and T. Ha. Single molecule nanometronome. *Nano Letters*, 6(3):496–500, 2006.
- [133] J. D. Le, Y. Pinto, N. C. Seeman, K. Musier-Forsyth, T. A. Taton, and R. A. Kiehl. DNA-templated self-assembly of metallic nanocomponent arrays on a surface. *Nano Letters*, 4(12):2343–2347, 2004.
- [134] L. P. Feng, S. H. Park, J. H. Reif, and H. Yan. A two-state DNA lattice switched by DNA nanoactuator. *Angewandte Chemie-International Edition*, 42(36):4342–4346, 2003.
- [135] S. Beyer, W. U. Dittmer, and F. C. Simmel. Design variations for an aptamer-based DNA nanodevice. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 1:96–101, 2005.
- [136] W. B. Sherman and N. C. Seeman. A precisely controlled DNA biped walking device. *Nano Letters*, 4(7):1203–1207, 2004.

- [137] J. S. Shin and N. A. Pierce. A synthetic DNA walker for molecular transport. *Journal of the American Chemical Society*, 126(35):10834–10835, 2004.
- [138] P. Yin, H. Yan, Daniell X. G., A. J. Turberfield, and J. H. Reif. A unidirectional DNA walker that moves autonomously along a track. *Angewandte Chemie-International Edition*, 43:4906–4911, 2004.
- [139] Y. Tian and C. D. Mao. Molecular gears: A pair of DNA circles continuously rolls against each other. *Journal of the American Chemical Society*, 126:11410–11411, 2004.
- [140] Y. Tian, Y. He, Y. Chen, P. Yin, and C. D. Mao. Molecular devices - a dnazyme that walks processively and autonomously along a one-dimensional track. *Angewandte Chemie-International Edition*, 44(28):4355–4358, 2005.
- [141] J. Bath, S. J. Green, and A. J. Turberfield. A free-running DNA motor powered by a nicking enzyme. *Angewandte Chemie-International Edition*, 44(28):4358–4361, 2005.
- [142] Y. Chen, M. S. Wang, and C. D. Mao. An autonomous dna nanomotor powered by a dna enzyme. *Angewandte Chemie-International Edition*, 43(27):3554–3557, 2004.
- [143] Stuart L. Fine, Daniel F. Martin, and Peter Kirkpatrick. Pegaptanib sodium. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(3):187–188, 2005.
- [144] C. P. Rusconi, J. D. Roberts, G. A. Pitoc, S. M. Nimjee, R. R. White, G. Quick, E. Scardino, W. P. Fay, and B. A. Sullenger. Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo. *Nature Biotechnology*, 22(11):1423–1428, 2004.
- [145] L. Alberghina and H. V. Westerhoff. *Systems Biology: Definitions and Perspectives*. Springer, Berlin, 2005.
- [146] D. M. Kolpashchikov and M. N. Stojanovic. Boolean control of aptamer binding states. *Journal of the American Chemical Society*, 127(32):11348–11351, 2005.
- [147] W. U. Dittmer and F. C. Simmel. Transcriptional control of DNA-based nanomachines. *Nano Letters*, 4(4):689–691, 2004.
- [148] W. U. Dittmer, S. Kempter, J. O. Rädler, and F. C. Simmel. Using gene regulation to program DNA-based molecular devices. *Small*, 1(7):709–712, 2005.
- [149] S. Beyer and F. C. Simmel. A modular DNA signal translator for the controlled release of a protein by an aptamer. *Nucleic Acids Research*, 34(5):1581–1587, 2006.
- [150] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin. UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13):1605–1612, 2004.
- [151] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, and P. E. Bourne. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1):235–242, 2000.

## Eigene Veröffentlichungen und Vorträge

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden in den hier aufgelisteten Publikationen veröffentlicht und in Vorträgen präsentiert.

### Veröffentlichungen

W. U. Dittmer, A. Reuter und F. C. Simmel. A DNA-based machine that can cyclically bind and release thrombin. *Angewandte Chemie-International Edition*, 43(27):3550-3553, (2004).

Deutsche Version dieser Veröffentlichung:

Eine DNA-basierte Maschine, die Thrombin abwechselnd binden und wieder freigeben kann. *Angewandte Chemie*, 116(27):3634-3637, (2004).

B. K. Müller, A. Reuter, F. C. Simmel und D. C. Lamb. Single-pair FRET characterization of DNA tweezers. *Nano Letters*, 6(12):2814-2820, (2006).

A. Reuter, W. U. Dittmer und F. C. Simmel. Kinetics of protein-release by an aptamer-based DNA nanodevice. *European Physical Journal E*, 22(1):33-40 (2007).

### Konferenzveröffentlichungen

E. Sackmann, A. Reuther und D. Heinrich. Micromechanics of Cells. In: *Mechanics of the 21st Century, Proceedings of the 21st International Congress of Theoretical and Applied Mechanics*, Warschau, Polen (2004)

W. U. Dittmer, A. Reuter und F. C. Simmel. An aptamer-based DNA nanomachine. *Proceedings of the Foundations of Nanoscience conference: Self-Assembled Architectures and Devices (FNANO)*, Utah, USA (2004).

F. C. Simmel, W. U. Dittmer und A. Reuter. Control and Function for DNA nanodevices. *4th IEEE Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO)*, München (2004).

S. Beyer, W. U. Dittmer, A. Reuter und F. C. Simmel. Controlled Release of Thrombin using Aptamer-based Nanodevices. *Advances in Science and Technology*, 53:116-121 (2006).

### Vorträge

Nanobioscience with DNA. Internal CeNS PhD-students'-workshop 2005, Hirschegg (Kleinalpsee).

DNA-switchable hybrid structures. 21st General Conference of the European Physical Society 2006, Dresden.



## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mir bei der Entstehung dieser Dissertation direkt und indirekt geholfen haben:

- Privatdozent Dr. Fritz Simmel für die Gelegenheit, an diesem aussichtsreichen Thema forschen zu können, seine geschätzte kritische aber konstruktive Art, mir zu verdeutlichen, wo es noch Verbesserungsmöglichkeiten gab (bei Experimenten, Auswertungen, Vorträgen und dieser Arbeit), für das angenehme Klima in der aufstrebenden NanoBio/Emmy-Noether/NIM-Gruppe und seinen persönlichen Einsatz für uns.
- Prof. Dr. Jörg Kotthaus, der mir und unserer Gruppe nahezu alle Freiheiten ließ, unserer nicht-Halbleiter-basierten Forschung nachzugehen.
- Dr. Stefan Beyer, Tim Liedl, Eike Friedrichs und Dr. Wendy Dittmer für nützliche Tips und Tricks im täglichen Kampf mit den Nukleinsäuren, Gelen, Proteinen usw. sowie gemeinsame Projekte und Messungen – vor allem aber viel Spaß während der gemeinsamen Doktorandenzeit.
- Andreas Fischer, Bernhard Heindl, Ralf Jungmann, Patrick Nickels, Michael Olapinski, Stefan Renner und Tom Sobey für die gute Atmosphäre in unserer Gruppe.
- Meinen Kooperationspartnern in der Physikalischen Chemie: Barbara Müller und Dr. habil Don Lamb für die gute Zusammenarbeit und das Ermöglichen der Einzelmolekülfluoreszenzmessungen an ihrem Aufbau mit "gepulster verschachtelter Anregung".
- Dr. Simon Keller und Dr. Johannes Bayer sowie Prof. Dr. Joachim Rädler dafür, dass sie mir ihren FCS-Aufbau ausführlich erklärt und anschließend zur Verfügung gestellt haben und jederzeit Fragen dazu beantwortet haben.
- Susi Kempfer und Gerlinde Schwake dafür, dass sie meine Fluorolog-Messungen in ihrem Büro erduldet haben und ich auch sonst die Rädler-Labore nutzen durfte.
- Den guten Seelen des Lehrstuhls: Martina Jüttner und Bert Lorenz sowie allen weiteren festangestellten Mitarbeitern für ihre Arbeit.
- Dr. Alexander Högele und Martin Kroner für Hilfestellungen bei Detail- und grundlegenden Fragen zur Optik.
- Unseren Lehrstuhl-Netzwerkadministratoren dafür, dass computertechnisch in der Regel alles wunderbar lief und Ausnahmefälle schnell behoben wurden.
- Allen ehemaligen und aktuellen „Bewohnern“ des Hinterzimmers für die dortige gute Stimmung. Es ist phantastisch in seinem Büro eine Einbauküche zu haben!
- Allen sonstigen Mitgliedern der Lehrstühle Kotthaus und Rädler für die freundliche Atmosphäre und den CeNS- und NIM-Mitarbeitern für ihr Engagement.
- Meinen Freunden, Eltern und Geschwistern für ihre große Unterstützung während des Studiums und während dieser Doktorarbeit.
- Katharina für alles, was Du für mich getan hast. Danke für das Korrekturlesen und dafür, dass Du mich auch in der Endphase ertragen hast!