

Bionanotechnologie

Biomolekulare Motoren als Nanoroboter

STEFAN DIEZ

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MOLEKULARE ZELLBIOLOGIE UND GENETIK, DRESDEN

Biomolekulare Motoren sind Mechanoenzyme, die chemische Energie in gerichtete Bewegung umsetzen. Sie könnten als molekulare Roboter in synthetischer Umgebung zum Aufbau von Nanostrukturen, zur hochsensitiven Detektion von Reagenzien oder zum Sortieren molekularer Komponenten eingesetzt werden.

Biomolecular motors are mechano-enzymes capable of converting chemical energy into directed motion. They could be used as molecule-sized robots that build up and manipulate nanostructures, detect chemicals or sort molecular reagents.

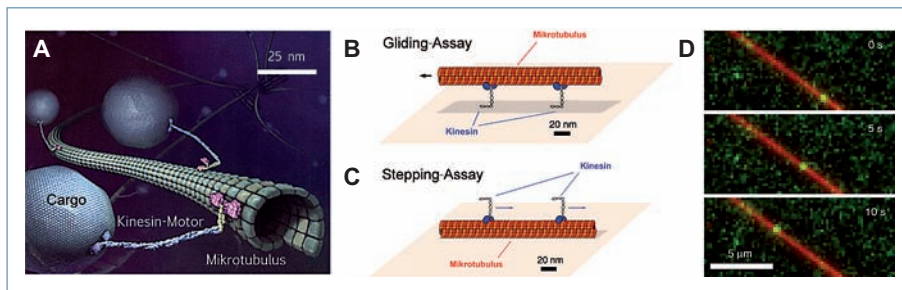
■ Biomolekulare Motoren sind die Arbeiter in unseren Zellen. Sie vermögen es, die aus ATP-Hydrolyse gewonnene chemische Energie hocheffizient in mechanische Arbeit umzuwandeln und dabei gerichtete Bewegungsprozesse auszulösen. Der wohl bekannteste Motor ist das Myosinprotein, welches durch seine Bewegung entlang von Aktinfilamenten die Grundlage für die Muskelkontraktion bildet. Jedoch sind Motorproteine nicht nur in spezialisierten Muskelzellen, sondern auch in allen anderen Zellen, anzutref-

fen. Dort sorgen sie für den aktiven Transport intrazellulärer Komponenten, wie z. B. Mitochondrien, neuronaler Vesikel und Chromosomen. Diese Motoren beinhalten Verwandte des Muskelmyosins (die sich ebenfalls entlang von Aktinfilamenten bewegen) sowie Vertreter der Kinesin- und Dyneinfamilien, welche sich entlang von Mikrotubuli bewegen (**Abb. 1A**). Zusätzlich zu den hier beschriebenen Motoren des Zytoskeletts existieren Motorproteine, die sich in linearer Weise entlang von DNA- und RNA-Filamen-

ten bewegen sowie Rotationsmotoren, die z. B. mittels Drehbewegungen ATP synthetisieren oder Bakterien fortbewegen.

Warum werden Motorproteine zum intrazellulären Transport überhaupt benötigt? Der Grund liegt darin begründet, dass Diffusion oftmals zu langsam ist, um Moleküle vom Ort ihres Ursprungs (typischerweise in der Nähe des Zellkerns) zu ihrem Bestimmungsort (oftmals in der Zellperipherie) zu transportieren. Beispielsweise würde die passive Diffusion eines kleinen Proteins durch ein Neuron mit der Länge von einem Meter ca. 1.000 Jahre in Anspruch nehmen. Kinesinmotoren, mit einer typischen Geschwindigkeit von 1–2 $\mu\text{m/s}$, können den Transport innerhalb einer Woche bewältigen [1]. Aktinfilamente und Mikrotubuli formen im Zellinneren ein dichtes Straßennetz, auf dem sich die Motorproteine gezielt von einem Punkt zum anderen bewegen. Darüber hinaus nutzen Zellen das Zusammenspiel von Zytoskelettfilamenten und Motorproteinen zum Aufbau hoch komplexer und aktiver Strukturen auf molekularer Ebene. Diese Beobachtungen legen es nahe, über die Anwendung von biomolekularen Motoren als Nanoroboter – auch außerhalb der Zelle, also in künstlicher Umgebung – nachzudenken.

Motorproteine sind ungewöhnliche Maschinen, die es vermögen, chemische Energie direkt – also ohne den allen technischen Maschinen der Gegenwart innewohnenden Umweg über Wärme oder Elektrizität – in mechanische Arbeit umzuwandeln. Damit fungieren sie als Energiewandler hocheffizient. Die chemische Energie, die aus der Hydrolyse eines ATP-Moleküls (unter physiologischen Bedingungen mit 1 mM ATP, 0,1 mM ADP und 1 mM Phosphat) gewonnen werden kann, beträgt $100 \times 10^{-21} \text{ J} = 100 \text{ pN} \times \text{nm}$. Mit dieser Energie kann beispielsweise ein Kinesinmotor einen 8 nm-Schritt gegen eine Kraft von 6 pN vollführen. Die Energieeffizienz dieses Prozesses liegt damit bei ca. 50 Prozent. Für ATPase-Rotationsmotoren wurden sogar höhere Werte zwischen 80 und 100 Prozent berichtet. Neben



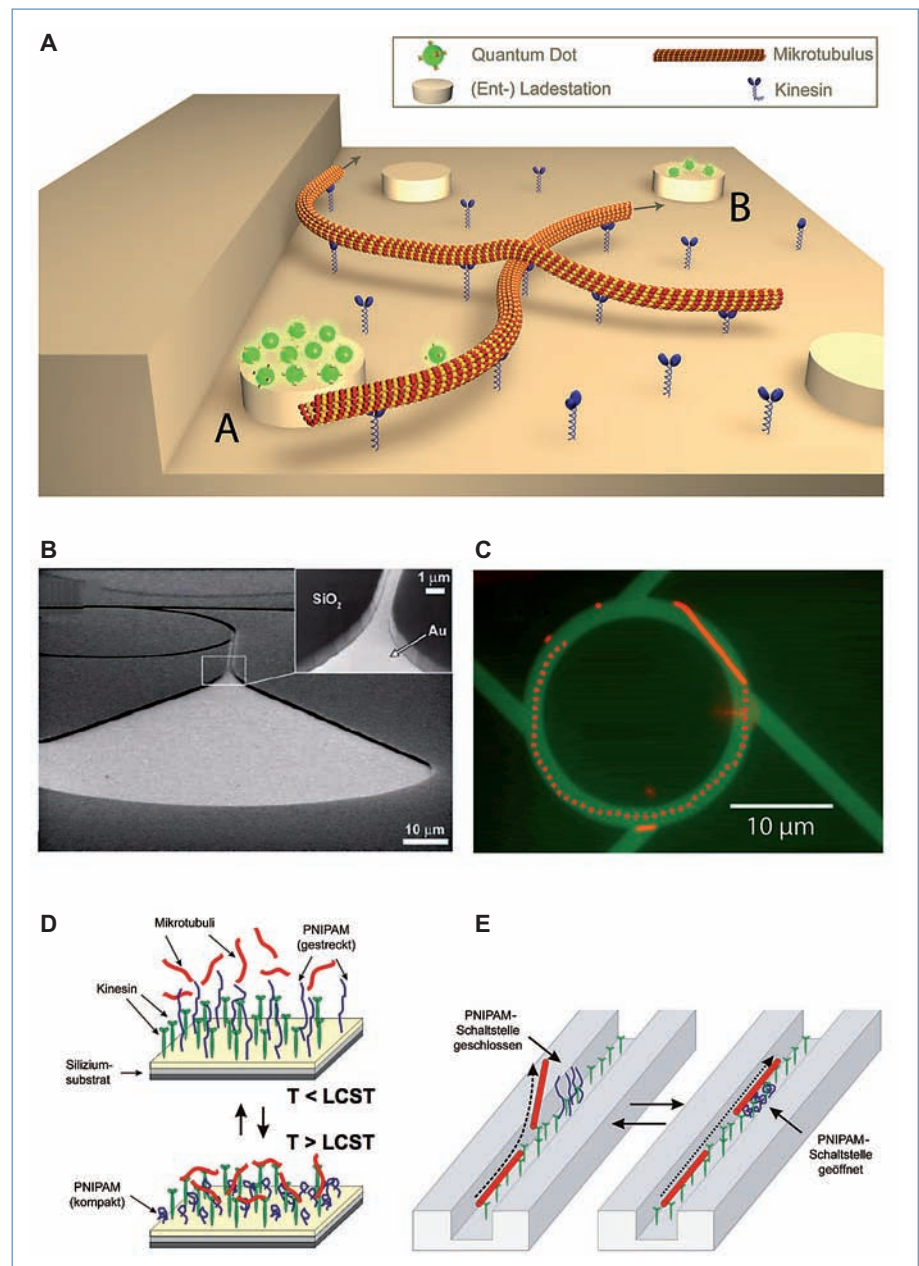
▲ **Abb. 1:** Kinesin-Mikrotubuli-Assays. **A**, In zellulärer Umgebung transportieren Kinesinmotoren Cargo, z. B. Membranvesikel, entlang von Mikrotubuli-Schienen (Bild: Graham Johnson, www.fivth.com, The Scripps Research Institute). Die Bewegung molekularer Motoren kann *in vitro* auf verschiedene Weise untersucht werden: **B**, Gliding-Assays, wobei die Filamente durch Substrat-gebundene Motoren über die Oberfläche bewegt werden; **C**, Stepping-Assays, wobei die Filamente auf dem Substrat immobilisiert sind und sich die Motoren entlang der Filamente bewegen. **D**, Sequenz von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, die die Bewegung eines einzelnen, GFP-markierten Kinesinmotors (grün) entlang eines Rhodamin-markierten Mikrotubulus (rot) zeigt. Die Bilder wurden mittels Total-Reflektions-Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen.

der hohen Energieeffizienz gibt es jedoch eine Reihe weiterer Vorteile, die biomolekulare Motoren für nanotechnologische Anwendungen attraktiv erscheinen lassen:

- Sie sind klein und können daher auf engem Raum in hoher Anzahl eingesetzt werden.
- Eine Vielzahl biochemischer Werkzeuge steht für ihre Maßanfertigung zur Verfügung.
- Sie sind in bakteriellen Expressionssystemen kostengünstig herstellbar.

Die experimentellen Anordnungen zum Studium von Motorproteinen außerhalb von Zellen, die sogenannten *in vitro*-Motilitätsassays, sind in **Abbildung 1B–D** dargestellt. Sowohl Gliding- als auch Stepping-Assays werden in wässriger Lösung, mit ähnlichen Eigenschaften wie die Lösungen im Zellinneren, durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der Bewegungsvorgänge einzelner und mehrerer Motoren ermöglicht die Aufklärung der biophysikalischen Funktionsweise dieser Proteine [2–5]. Da Fehlfunktionen von Kinesin-, Dynein- und Myosinmotoren zu einer Reihe von Krankheiten führen können, erlaubt das bessere Verständnis der molekularen Funktionsweise dieser Motoren die Entwicklung spezifischer Wirkstoffe zur Vermeidung der Fehlfunktionen. In diesem Sinne profitiert bereits jetzt die medizinische Forschung von der Untersuchung biomolekularer Motoren in künstlicher Umgebung.

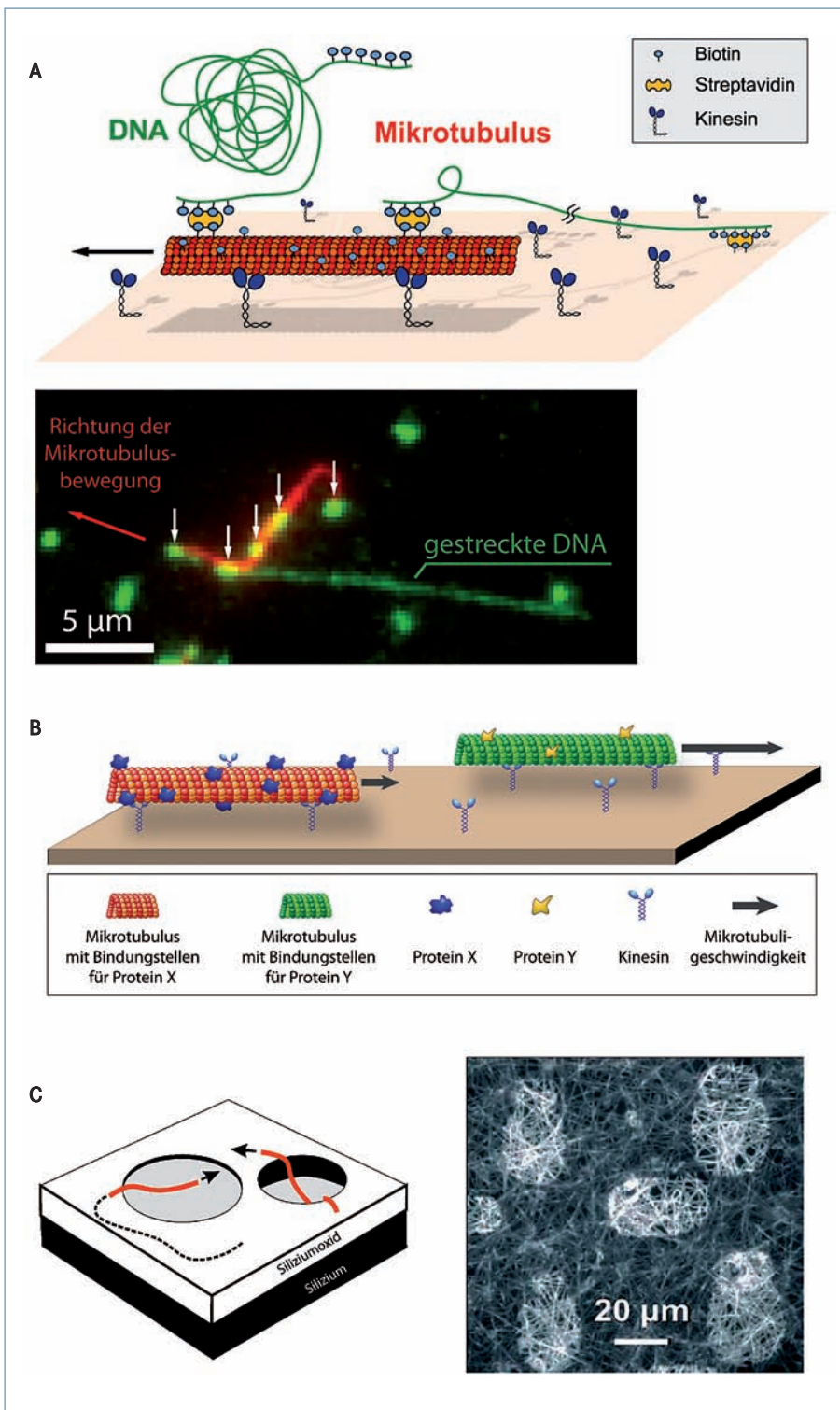
Für nanotechnologische Anwendungen ist die Geometrie des Gliding-Assays am vielversprechendsten, da mehrere Motoren beim Transport zusammenarbeiten und somit höhere Kräfte erzeugt werden können als dies durch einzelne Motoren möglich wäre. Das Grundprinzip eines Nanotransportsystems wird in **Abbildung 2A** dargestellt. Hier werden gleitende Mikrotubuli verwendet, um Cargo an einem Punkt A aufzunehmen, es entlang eines vorgegebenen Weges zu einem Punkt B zu transportieren und dort abzulegen. Um die Transportbewegung in kontrollierter Weise ablaufen zu lassen, sind sowohl räumliche Führungsstrukturen als auch zeitliche Steuerungsmechanismen notwendig. Während sich topografische Strukturierungen in Kombination mit chemischen Oberflächenmodifikationen zum Führen gleitender Mikrotubulitransporter entlang vorgegebener Bahnen als effektiv erwiesen haben (**Abb. 2B, C**), ist die dynamische Steuerung mittels externer Kräfte möglich. Da Aktinfilamente und Mikrotubuli leicht negativ geladen sind,



▲ **Abb. 2:** Kontrollierte Kinesin-Mikrotubuli-Transportsysteme. **A**, Mikrotubuli werden durch immobilisierte Kinesinmotoren über eine Substratoberfläche bewegt. Cargo, wie z. B. Halbleiternanokristalle (Quantum Dots), soll von Punkt A zu Punkt B transportiert werden. **B**, Beispiel eines lithografisch strukturierten Siliziumchips, auf dem die Bodenflächen der 300 nm tiefen Kanäle zur gezielten Motoranbindung mit Gold beschichtet wurden. Die umgebenden Bereiche wurden zur Verringerung der Proteinanhaftung mit Polyethylenglykol funktionalisiert [8]. **C**, Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der gerichteten Bewegung (rote Punktlinie) eines Mikrotubulus (rot) in einem Führungskanal (grün). **D**, Einflussnahme auf die Mikrotubulibewegung durch schaltbare Polymere. Die Kinesinmotoren wurden in eine Schicht thermisch schaltbarer Poly(N-Isopropylacrylamid)-Moleküle (PNIPAM) eingebettet. Abhängig von der Umgebungstemperatur nehmen die Polymere einen gestreckten Zustand (unterhalb der kritischen Schalttemperatur, LCST) oder einen kompakten Zustand (oberhalb der LCST) ein. Entsprechend können die Mikrotubuli mit den Motorproteinen interagieren oder werden von der Oberfläche abgestoßen [6]. **E**, Vorschlag zur Einbringung schaltbarer Polymere in Führungskanäle. Durch externe Signale kann die Konformation der Polymere beeinflusst werden. Gleitende Mikrotubuli passieren die Schaltstellen dann entweder ungehindert oder „entgleisen“.

können elektrische Gleichfelder angewandt werden, um die Bewegungsrichtung der Filamente zu beeinflussen. Gleichermäßen eig-

nen sich Kräfte, die aus Dielektrophorese oder hydrodynamischen Feldern resultieren. Außerdem können die Motoren durch Zuga-



◀ **Abb. 3:** Beispiele erster nanotechnologischer Anwendungen des Kinesin-Mikrotubuli-Transportsystems. **A**, DNA-Nanoelektronik: Schemazeichnung gleitender Mikrotubuli (rot), die zum Transport und zur Streckung einzelner Lambda-DNA-Moleküle (grün) verwendet wurden (oben) [9]. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Transport- und Streckvorgangs (unten). Diese Technik kann angewandt werden, um mehrdimensionale DNA-Netzwerke, die später für nanoelektronische Anwendungen metallisiert werden, aufzubauen. **B**, Molekulare Detektion: Makromoleküle auf der Oberfläche von Mikrotubuli (Protein X, Y) behindern die Bewegung der Motorproteine. Die daraus resultierende Verlangsamung der Gleitbewegung kann zur quantitativen und hochsensitiven Bestimmung der Makromolekül-Konzentration in der Umgebungslösung verwendet werden [10]. **C**, Nanometrische Oberflächenvermessung: Interferenzeffekte auf spiegelnden Oberflächen führen dazu, dass die detektierte Intensität fluoreszenter Objekte stark von deren Abstand zur Oberfläche abhängt. Gleitende, fluoreszenzmarkierte Mikrotubuli können somit als mobile (und autonome) Nanosonden zur Erkundung von Oberflächenstrukturen im Nanometerbereich eingesetzt werden (links). Ein Abbild der Oberfläche erhält man z. B. durch die „Maximumprojektion“ vieler fluoreszenzmikroskopischer Einzelbilder, die während der Mikrotubulibewegung aufgenommen wurden (rechts).

Neben der Entwicklung der geschilderten Methoden zur Einflussnahme auf die gerichteten Transportprozesse in künstlicher Umgebung konnten bereits eine Reihe erster nanotechnologischer Anwendungen demonstriert werden [7]. Im Folgenden sollen drei Beispiele aus unserem Labor kurz dargestellt werden: (i) In Zusammenarbeit mit Materialwissenschaftlern der TU Dresden nutzten wir biotinylierte Mikrotubuli, um einzelne, an ihren jeweiligen Enden unterschiedlich funktionalisierte Lambda-DNA-Moleküle zu transportieren und von Goldkontakten auf der Oberfläche aus zu strecken (**Abb. 3**) [9]. Da diese Methode mittels vieler Mikrotubuli parallelisiert werden kann, besitzt sie das Potenzial zum effektiven Aufbau multidimensionaler DNA-Netzwerke zwischen vorgegebenen Kontakten auf einer Substratoberfläche. Nach Metallisierung der gestreckten DNA-Moleküle, z. B. durch Palladium in wässriger Lösung, kann das Netzwerk dann für nanoelektronische Anwendungen eingesetzt werden. (ii) Unsere Untersuchungen zur Ankopplung von artifiziellem Cargo an Mikrotubuli mittels Biotin-Streptavidin führten zu der Erkenntnis, dass eine hohe Dichte von Streptavidinmolekülen auf der Mikrotubulioberfläche zur signifikanten Verlangsamung der Gleitbewegung

be/Entzug von ATP oder spezifischen Inhibitoren gestartet und gestoppt werden. Ein weiterer Steuerungsmechanismus wird möglich, wenn die Motoren in eine Schicht thermisch schaltbarer Poly(N-Isopropylacrylamid)-Moleküle (PNIPAM) eingebettet werden, die abhängig von der Umgebungstemperatur eine kompakte (oberhalb von 32 °C) oder gestreckte (unterhalb von 32 °C) Konformation einneh-

men (**Abb. 2D**). Entsprechend können die Mikrotubuli bei hoher Temperatur mit den Motorproteinen interagieren bzw. werden bei niedriger Temperatur von der Oberfläche abgestoßen [6]. Dieser Prozess ist reversibel und kann mehrere Male wiederholt werden. Wir arbeiten derzeit daran, diesen Schaltmechanismus in örtlich lokalisierter Form anzuwenden (**Abb. 2E**).

führt. In Einzelmolekülexperimenten konnten wir zeigen, dass die Streptavidinmoleküle sowie andere angekoppelte Moleküle Hindernisse für die Kinesinmotoren darstellen [10]. Wir arbeiten derzeit daran, diesen Mechanismus zur hochsensitiven Detektion beliebiger Makromoleküle anzuwenden. Dazu sollen verschiedene Mikrotubulipopulationen eingesetzt werden, die sich jeweils durch ihre Fluoreszenzfarbe und Fähigkeit, bestimmte Moleküle an ihre Oberfläche zu binden, unterscheiden. Ihre Gleitgeschwindigkeit, die sich auf einfache Weise messen lässt, gibt dann Auskunft über das Vorhandensein der entsprechenden Makromoleküle in der umgebenden Lösung (**Abb. 3B**). (iii) Interferenzeffekte auf spiegelnden Oberflächen führen dazu, dass die detektierte Intensität fluoreszenter Objekte stark von deren Abstand zur Oberfläche abhängt. Gleitende, fluoreszenzmarkierte Mikrotubuli können somit als mobile (und autonome) Nanosonden zur Erkundung von Oberflächenstrukturen eingesetzt werden. Durch das nanometergenaue Verfolgen (*tracking*) der Mikrotubuli und der Zuordnung der Fluoreszenzintensität zu den Ortspunkten lässt sich die Oberfläche mit Nanometergenauigkeit in drei Dimensionen vermessen.

Erste Schritte zur Anwendung biomolekularer Motoren außerhalb ihrer zellulären Umgebung konnten erfolgreich unternommen werden. Dennoch sind bis zum Einsatz der Motorsysteme für nanotechnologische Anwendungen eine Reihe weiterer Fortschritte nötig. Eine vordergründige Aufgabe wird es sein, die örtliche und zeitliche Steuerbarkeit der Transportsysteme weiter zu verbessern. Durch eine Kombination von innovativen Oberflächenmethoden und externen Feldern sollte es in nicht allzu ferner Zukunft möglich sein, molekulare Reaktionssysteme und Sortierapparate zu realisieren. Darüber hinaus sei angemerkt, dass der hohe Ordnungsgrad von DNA, Aktinfilamenten und Mikrotubuli diese biologischen Filamente dazu prädestiniert, als Template-Materialien für dreidimensionale Nanostrukturen mit vielfältigen materialwissenschaftlichen Anwendungen eingesetzt zu werden. Langfristig ist die Entwicklung robusterer Motormolekü-

le notwendig. Widerstandsfähigere Motoren könnten beispielsweise aus extremophilen Bakterien gewonnen und/oder mittels genetischer Screens identifiziert werden. Während es nicht möglich sein wird, Protein-basierte Motoren in Luft oder Vakuum arbeiten zu lassen, wäre es zweifelsohne attraktiv, die grundlegenden Designprinzipien biologischer Motorproteine zu nutzen, um vollständig künstliche Nanomotoren zu konzipieren.

Danksagung

Ausdrücklicher Dank gilt allen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe sowie den Kooperationspartnern, die an gemeinsamen Projekten mitwirkten. Die geschilderten Arbeiten wurden vom BMBF (Nachwuchswettbewerb Nanotechnologie) sowie der Max-Planck-Gesellschaft unterstützt. ■

Literatur

- [1] Howard J (2001) Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA
- [2] Helenius J, Brouhard G, Kalaidzidis Y. et al. (2006) The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends. Nature 441:115–119
- [3] Kerssemakers J, Howard J, Hess H et al. (2006) The distance that kinesin-1 holds its cargo from the microtubule surface measured by fluorescence interference contrast microscopy. Proc Natl Acad Sci USA 103:15812–15817
- [4] Leduc C, Ruhnnow F, Howard J et al. (2007) Detection of fractional steps in cargo movement by the collective operation of kinesin-1 motors. Proc Natl Acad Sci USA 104:10847–10852
- [5] Fink G, Hajdo L, Skowronek KJ et al. (2009) The mitotic kinesin-14 Ncd drives directional microtubule-microtubule sliding. Nat Cell Biol 11:717–723
- [6] Ionov L, Stamm M, Diez S (2006) Reversible switching of microtubule motility using thermoresponsive polymer surfaces. Nano Lett 6:1982–1987
- [7] van den Heuvel MG, Dekker C (2007) Motor proteins at work for nanotechnology. Science 317:333–336
- [8] van den Heuvel MGL, Butcher CT, Smeets RMM et al. (2005) High rectifying efficiencies of microtubule motility on kinesin-coated gold nanostructures. Nano Lett 5:1117–1122
- [9] Diez S, Reuther C, Dinu C et al. (2003) Stretching and transporting DNA molecules using motor proteins. Nano Lett 3:1251–1254
- [10] Korten T, Diez S (2008) Setting up roadblocks for kinesin-1: mechanism for the selective speed control of cargo carrying microtubules. Lab Chip 8:1441–1447

Korrespondenzadresse:



Dr. Stefan Diez
Max-Planck-Institut für
Molekulare Zellbiologie
und Genetik
Pfortenhauerstraße 108
D-01307 Dresden
Tel.: 0351-210-2521
Fax: 0351-210-2020
diez@mpi-cbg.de

www.mpi-cbg.de/~diez