

Bioanalytik

Molekulare Architektur: Nanosensoren mit DNA-Ankern

JUSTUS T. METTERNICH^{1,2}, JULIA ACKERMANN², SEBASTIAN KRUSS^{1,2}

¹ PHYSIKALISCHE CHEMIE, UNIVERSITÄT BOCHUM

² BIOMEDICAL NANOSENSORS, FRAUNHOFER INSTITUT FÜR MIKROELEKTRONISCHE SCHALTUNGEN UND SYSTEME, DUISBURG

Biosensors are crucial tools for research and diagnostics. Optical biosensors are easy to use, and light is non-invasive. Single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) are non-bleaching, near-infrared (NIR, 780–2400 nm) fluorescent materials that are extremely sensitive to their chemical environment. Modification of their surface makes them versatile fluorescent biosensors. Now, so-called guanine quantum defects serve as anchor structures and allow assembly of sensors with any recognition unit that is attached to DNA. This general design enables powerful novel biosensors.

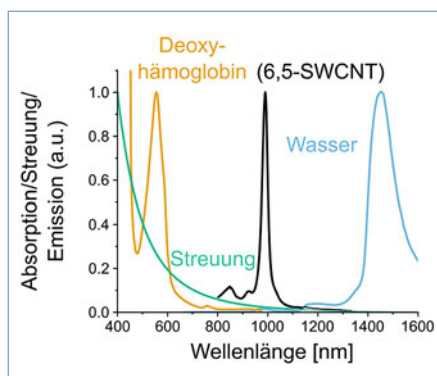
DOI: 10.1007/s12268-024-2130-0

© Die Autorinnen und Autoren 2024

■ Die SARS-CoV-2-Pandemie hat verdeutlicht, dass wir auf schnell anpassbare Sensorensysteme angewiesen sind, die etablierte Diagnosemethoden ergänzen. Leider ist die

Entwicklung und Anpassung von Sensoren auf neue Zielmoleküle meist aufwendig. Daher wären schnell anpassbare Systeme wünschenswert.

Für Messungen, die berührungsfrei und örtlich aufgelöst ausgelesen werden sollen, sind optische Sensoren aufgrund des einfachen, kontaktlosen Auslesens von Vorteil. Einwandige Kohlenstoffnanoröhren (*single-walled carbon nanotubes*, SWCNTs) eignen sich besonders für solche Messungen in komplexen biologischen Flüssigkeiten. Dies liegt daran, dass SWCNTs im nahen Infrarot-Bereich (NIR) fluoreszieren und nicht bleichen. Gegenüber dem Auslesen im sichtbaren Bereich ist der Hintergrund durch Autofluoreszenz, Absorption und Streuung im NIR (Gewebetransparenzfenster) reduziert (**Abb. 1**). Dies ermöglicht ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis, was sich bei Messungen oder der Bildgebung in einem hohen Kontrast äußert.



▲ **Abb. 1:** Eigenschaften von SWCNT-basierten Biosensoren. Die optischen Übergänge von *single-walled carbon nanotubes* (SWCNT) liegen im transparenten Bereich von biologischen Geweben (exemplarisch für eine Art von SWCNTs, schwarz). Hier ist beispielhaft die Lichtabsorption durch eine Blutkomponente (gelb) und von Wasser (blau) gezeigt. Außerdem sinkt mit steigender Wellenlänge die Streuung (grün). Dadurch erhöht sich bei Messungen das Signal-Rausch-Verhältnis. a. u. (= willkürliche Einheiten). Abbildung modifiziert aus [1], © 2023 die Autoren, Angewandte Chemie, Wiley-VCH GmbH.

Leuchtende Nanoröhren und DNA als programmierbare Bausteine

Strukturell sind SWCNTs eindimensionale Nanomaterialien mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern und einer Länge im Bereich von einigen hundert bis tausend Nanometern. Man kann sich SWCNTs als eine nahtlos aufgerollte einfache Lage aus

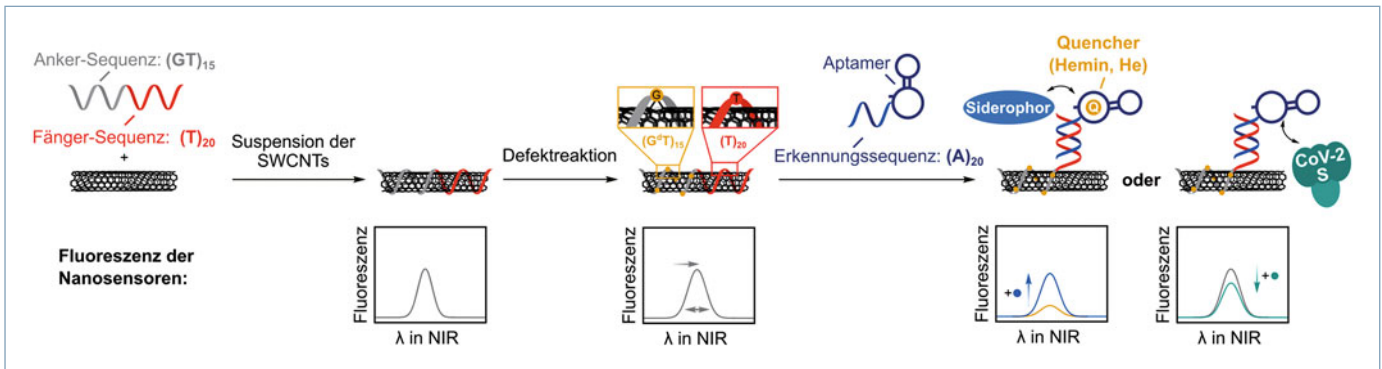
sp²-hybridisiertem Kohlenstoff (Graphen) vorstellen. Je nach Struktur (*roll-up vector*), kommt es so zu metallischen, halbleitenden oder halbleitenden Eigenschaften. Für optische Sensoren sind halbleitende SWCNTs aufgrund ihrer Fluoreszenz besonders von Interesse. Bei Anregung der SWCNT im sichtbaren Bereich entsteht ein Elektron-Loch-Paar (Exziton), das entlang der Nanoröhre diffundiert. Da alle Atome einer SWCNT auf deren Oberfläche liegen, wird das Exziton und somit auch die Fluoreszenz stark durch die chemische Umgebung (Corona-Phase) der SWCNT beeinflusst.

Durch die Sensitivität der SWCNTs für ihre chemische Umgebung lassen sich prinzipiell schnell adaptierbare Sensoren herstellen [1]. Für den Einsatz in biologischen Flüssigkeiten wird die Oberfläche der Nanoröhren modifiziert. Dies sorgt sowohl für die kolloidale Stabilität als auch für die molekulare Erkennung des Ziel-Analyten. Durch Adsorption verschiedener Polymere oder Biomoleküle lassen sich SWCNT-basierte Sensoren etwa für Neurotransmitter, Proteine und Viren oder Bakterien entwickeln [1]. Zudem eignen sich SWCNTs als Signalverstärker für etablierte Reaktionssysteme wie sie z. B. in den enzymatischen Reaktionen von ELISA-Assays zum Einsatz kommen [2].

Obwohl eine Vielzahl an verschiedenen Sensoren entwickelt wurde, ist die Oberflächenchemie häufig auf die jeweilige Zielstruktur abgestimmt und der Entwicklungsprozess durch das Fehlen eines einheitlichen Konzeptes aufwendig. Zudem können nicht beabsichtigte Interaktionen, wie die unspezifische Adsorption anderer Moleküle aus biologischen Proben, Änderungen der Fluoreszenz auslösen und die Stabilität der Sensoren beeinflussen. Diese Herausforderung lösten wir durch die Einführung von Guanin-Quantendefekten als Ankersystemen auf der SWCNT-Oberfläche [3].

Kohlenstoffsensoren schnell und einfach anpassen

Mithilfe von Guanin-Quantendefekten (G^d) ist es möglich, Guanin-Basen gezielt auf der



▲ **Abb. 2:** Guanin-Quantendefekte als Ankerstrukturen für Biosensoren. Zur Herstellung werden die Nanosensoren mit einer Nukleinsäure gemischt, die aus einer Fänger- (ohne Guanin) und einer Ankersequenz (mit Guanin) besteht, und danach mit Ultraschall beschallt. Guanin-Defekte werden durch Reaktion der DNA mit Singulett-Sauerstoff, z. B. durch Bestrahlung eines Photosensitizers erzeugt. Die kovalente Verknüpfung der DNA verändert die Fluoreszenz (Quanten-Defekt). Über die Fängersequenz lassen sich verschiedene Erkennungseinheiten an die Nanoröhre binden. Beispielfhaft ist ein System zum Sensing von bakteriellen Siderophoren und Proteinen (hier für das Spike-Protein des SARS-CoV-2) dargestellt. Die Zugabe der Analyten verändert die Fluoreszenz der Sensoren, indem z. B. der Quencher aus der Nähe der SWCNT entfernt wird oder sich die chemische Umgebung durch das Anbinden des Spike-Proteins ändert. Abbildung modifiziert aus [3], © 2023 American Chemical Society.

SWCNT zu fixieren [4, 5]. Bei der Reaktion wird mithilfe eines Photosensibilisators (hier: Bengalrosa) Singulett-Sauerstoff (¹O₂) hergestellt. Da ¹O₂ selektiv mit Guanin reagiert, ist es möglich, Guanin-haltige Bereiche einer ssDNA (einzelsträngige DNA) kovalent mit der SWCNT-Oberfläche zu verknüpfen [4–6].

Nun konnten wir erstmals zeigen, dass sich die neuartige Oberflächenmodifikation dazu nutzen lässt, einfach adaptierbare Nanosensoren herzustellen [3]. Dazu konstruierten wir ssDNA-SWCNT-Hybride, bei

denen die ssDNA auf der Nanoröhre aus einer Anker-Sequenz (mit Guanin) und einer Fänger-Sequenz besteht (**Abb. 2**). Durch die Reaktion der Guanin-Basen mit der SWCNT und der damit verbundenen Fixierung der Ankerstrukturen auf der Oberfläche ist es möglich, die Fluoreszenzänderungen von unspezifischen Interaktionen zu reduzieren. Zudem ist die Stabilität der Nanosensoren in Zellpuffern deutlich erhöht. So sind die Nanosensoren auch nach mehreren Wochen im Zellmedium funktional und können über mehrere Monate in Puffer gelagert wer-

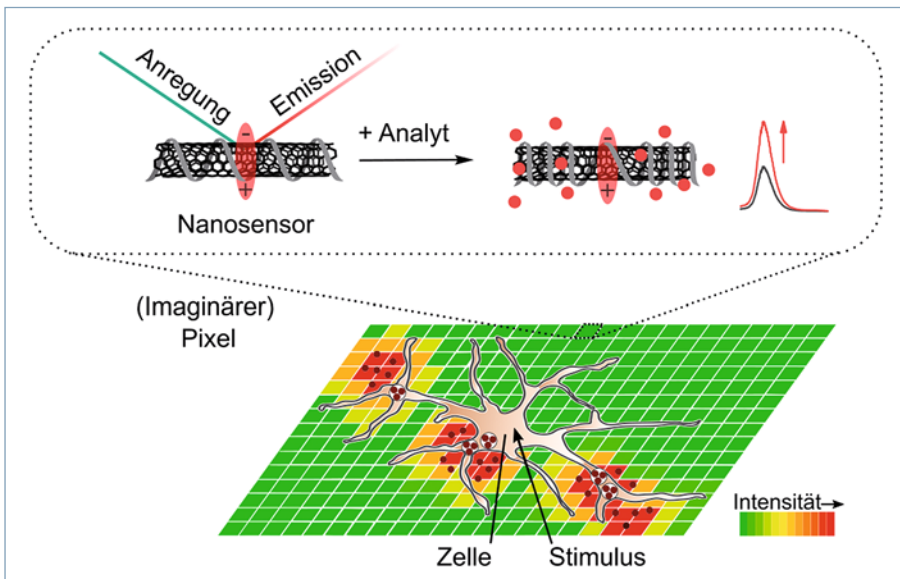
den. Durch die Verwendung einer mit dem Guanin-Anker verknüpften Fänger-Sequenz lassen sich SWCNTs mit verschiedenen Erkennungseinheiten schnell und einfach für unterschiedliche Anwendungen funktionalisieren (**Abb. 3**).

Dies bedeutet eine deutliche Vereinfachung, da die Sensorantworten selektiver auf einen Analyten angepasst werden können. Dabei gewährleistet die Ankersequenz kolloidale Stabilität, und Erkennungseinheiten lassen sich modular über eine DNA-basierte Konjugationsstrategie austauschen (**Abb. 2**). Dies ermöglicht eine Nutzung der Sensoren für Anwender:innen, die keine synthetische Expertise haben, aber die Sensoren für ihre Forschung anpassen wollen.

Um das Potenzial der Nanosensoren zu demonstrieren, funktionalisierten wir die Sensoren für die Detektion bakterieller Siderophore und viraler Proteine [3]. Dazu nutzen wir Aptamere als Erkennungseinheiten, die mit den entsprechenden Analyten direkt oder indirekt interagieren. Die Aptamere sind zur Anbindung an die SWCNT mit einer der Fänger-Sequenz komplementären Sequenz ausgestattet.

Für bakterielle Siderophore wie Pyoverdin wählten wir ein Aptamer, das Hämin bindet und durch das Eisen im Hämin die Fluoreszenz der Nanoröhre quencht. Die Zugabe von Siderophoren wie Pyoverdin und Deferoxamin (DFO) führt zu einer Entfernung des Eisens aus der Nähe des Exzitons, was die NIR-Fluoreszenz der Sensoren wieder erhöht (**Abb. 2**).

Um zu zeigen, dass das System modular ist, verknüpften wir die Sensoren außerdem



▲ **Abb. 3:** Fluoreszente Nanosensoren auf Oberflächen (*smart slides*) zur hochauflösenden chemischen Bildgebung. Nanosensoren werden auf einer Oberfläche immobilisiert und Zellen darauf kultiviert. Die Freisetzung eines Analyten durch die Zellen (z. B. Neurotransmitterausschüttung) verändert die nahe NIR-Fluoreszenz der Nanoröhren; man erhält ein chemisches Bild der Moleküle. Abbildung modifiziert aus [1, 8], © 2023, Small und Angewandte Chemie Wiley-VCH GmbH.

mit verschiedenen Aptameren, die an das Spike-Protein des SARS-CoV2 binden (**Abb. 2**). Nach Zugabe des Spike-Proteins ist ein konzentrationsabhängiger Abfall der Fluoreszenz zu beobachten. Bemerkenswerterweise ist die Robustheit der Sensoren in künstlichem Speichel zudem erhöht.

Prinzipiell lassen sich SWCNT-basierte Sensoren sowohl im Assay-Format durch Inkubation mit der zu untersuchenden Probe als auch zur hochauflösenden chemischen Bildgebung (**Abb. 3**) nutzen. Letzteres kann man durch eine Beschichtung von Oberflächen mit den Sensoren realisieren. Mithilfe einer so modifizierten Petrischalen-Oberfläche lassen sich z. B. zelluläre Freisetzungprozesse, wie die Ausschüttung von Dopamin, durch eine lokale Änderung der SWCNT-Fluoreszenz räumlich und zeitlich messen [7, 8]. Dies ermöglicht neben der reinen Detektion des gewünschten Analyten auch ein besseres Verständnis komplexer biochemische Vorgänge und Wechselwirkungen. Diese Kombination aus Guanin-Quantendefekten mit speziell zugeschnittenen Oberflächenfunktionalisierungen wäre ein Schritt zu „smarten Oberflächen“.

Ein Nachteil von NIR-fluoreszenten Sensoren war bislang, dass das NIR über 1.000 nm einen erhöhten Geräteaufwand (NIR-Kameras und Nutzung eines Lasers zur Anregung der SWCNT) erforderte. Durch die Isolation von SWCNTs, die näher am sichtbaren Bereich fluoreszieren, konnten wir aber schon zeigen, dass diese Sensoren auch mit normalen Mikroskopen und Standard-Kameras (Smartphones) messbar sind [8].

Eine leuchtende Zukunft

SWCNT-basierte Nanosensoren sind eine Plattformtechnologie, die sich zur Untersuchung von Neurotransmittern, Proteinen, Viren und Bakterien eignet [1] und sich zur Signalverstärkung auch auf etablierte Systeme wie enzymatische Reaktionen in ELISAs übertragen lässt [2]. Durch neue Oberflächenmodifikationen wie den hier beschriebenen Guanin-Defekten lassen sich in Zukunft schnell und effizient fluoreszente Nanosensoren für einen gewünschten Analyt entwerfen und herstellen [3]. Neben dem synthetischen und diagnostischen Potenzial bilden die Studien wertvolle Einblicke in die Oberflächenchemie und photophysikalischen Eigenschaften solcher hybriden Bionanomaterialien.

Mit SWCNTs, die am Anfang des NIR fluoreszieren, können solche maßgeschneiderten

Sensoren außerdem ohne spezielles Equipment gemessen werden [8]. Die Kombination mit einer modularen Funktionalisierungsstrategie wie den hier vorgestellten Guanin-Quantendefekten in Anker-Sequenzen könnten Sensoren ermöglichen, die ohne langwierige Sensorentwicklungen auf verschiedene Zielmoleküle angepasst werden. Dies eröffnet neue Perspektiven für die Forschung und Anwendung in Bereichen wie der Mikroskopie, der medizinischen Diagnostik, der Umweltüberwachung und vielen anderen Anwendungsgebieten.

Danksagung

Die Autor:innen bedanken sich bei den Mitgliedern der AG Kruss, die zur Entstehung der Arbeiten beigetragen haben. Die Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Exzellenzclusters RESOLV (EXC 2033-390677874), die VW Stiftung, das Fraunhofer Attract Programm (038-610097) und das Land Nordrhein-Westfalen im Rahmen von ZukunftBIO.NRW (IN-1-10B).

Literatur

- [1] Ackermann J, Metternich JT, Herberich S et al. (2022) Biosensing with Fluorescent Carbon Nanotubes. *Angew Chem Int Ed* 61: e202112372
 [2] Metternich JT, Hill B, Wartmann JAC et al. (2023) Signal Amplification and Near-Infrared Translation of

- Enzymatic Reactions by Nanosensors. *Angew Chem Int Ed*: e202316965
 [3] Metternich JT, Wartmann JAC, Sistemich L et al. (2023) Near-Infrared Fluorescent Biosensors Based on Covalent DNA Anchors. *J Am Chem Soc* 145: 14776-14783
 [4] Zheng Y, Bachilo SM, Weisman RB (2019) Controlled Patterning of Carbon Nanotube Energy Levels by Covalent DNA Functionalization. *ACS Nano* 13: 8222-8228
 [5] Lin Z, Beltran LC, de Los Santos ZA et al. (2022) DNA-guided lattice remodeling of carbon nanotubes. *Science* 377: 535-539
 [6] Galonska P, Mohr JM, Schrage CA et al. (2023) Guanine Quantum Defects in Carbon Nanotubes for Biosensing. *J Phys Chem Lett* 14: 3483-3490
 [7] Elizarova S, Chouaib AA, Shaib A et al. (2022) A fluorescent nanosensor paint detects dopamine release at axonal varicosities with high spatiotemporal resolution. *PNAS* 119: e2202842119
 [8] Ackermann J, Stegemann J, Smola T et al. (2023) High Sensitivity Near-Infrared Imaging of Fluorescent Nanosensors. *Small* 19: e2206856

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Sebastian Kruss
 Physikalische Chemie II
 Ruhr-Universität Bochum
 Universitätsstraße 150
 D-44801 Bochum
 sebastian.kruss@rub.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Justus T. Metternich

2014–2017 Biotechnologiestudium an der Hochschule Darmstadt. 2018 Aufenthalt am Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) in Madrid, Spanien. 2018–2020 Chemiestudium an der Universität Uppsala, Schweden. Seit 2020 Doktorand am Fraunhofer IMS und der Universität Bochum in der Gruppe von Prof. Dr. S. Kruss.



Julia Ackermann

2013–2020 Studium Nanotechnologie mit Fokus auf Optoelektronik an der Universität Duisburg-Essen. Seit 2020 Doktorandin in der Gruppe von Prof. Dr. S. Kruss am Fraunhofer-Institut für Mikroelektronische Schaltungen und Systeme IMS, Duisburg.



Sebastian Kruss

Studium Chemie und Biophysik an der Universität Heidelberg. 2011 Promotion in der Gruppe von Prof. Dr. J. Spatz an der Universität Heidelberg und dem Max-Planck-Institut für Intelligente Systeme. 2012–2014 PostDoc in der Gruppe von Prof. Dr. M. Strano am MIT, USA. 2015–2020 Unabhängiger Gruppenleiter an der Universität Göttingen. Seit 2020 Professor in Physikalischer Chemie an der Universität Bochum, Attract-Gruppenleiter am Fraunhofer IMS und Mitglied im Exzellenzcluster RESOLV.