



**Interaktionen für DNA-Nanoarchitekturen
auf Basis von Polyamiden, G-Quadruplexen
und lichtinduzierbaren Nukleinsäuren**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Thorsten-Lars Schmidt
aus Medias (Mediasch), Rumänien

Frankfurt am Main, 2010
(D30)



What I cannot create, I do not understand
(Richard P. Feynman)

The inverse is not necessarily true
(Nadrian C. Seeman)

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Eigene Publikationen/ own publications	I
Zusammenfassung	III
English summary	VII
1 Einführung	1
1.1 Nanotechnologie.....	1
1.2 DNA - Baumaterial für die Nanometerwelt.....	5
1.2.1 Doppelsträngige DNA.....	5
1.2.2 Tripelhelix	8
1.2.3 G-Quadruplexe.....	9
1.2.4 i-Motiv	11
1.2.5 Nicht-doppelsträngige Nukleinsäuren.....	12
1.2.6 Flexibilität von DNA und <i>minicircles</i>	15
1.3 Strategien für den Aufbau artifiziereller Strukturen aus DNA	17
1.3.1 Migrationsstabile Kreuzungen	17
1.3.2 <i>Double crossovers</i>	19
1.3.3 DNA- <i>tiles</i> für zweidimensionale Architekturen	20
1.3.4 DNA-Origami	21
1.3.5 <i>Bundles</i> und Nanoröhren	22
1.3.6 Dreidimensionales DNA-Origami	23
1.4 Funktionelle Systeme aus DNA	25
1.4.1 Maschinen und Motoren.....	25
1.4.2 Nukleinsäure-basierte Sensoren.....	26
1.4.3 DNA-Computing.....	27
1.4.4 DNA als elektrischer Leiter.....	29
1.5 Dervan-Polyamide	30
1.5.1 Entwicklung	30
1.5.2 Die Paarungsregeln für Dervan-Polyamide	33
1.5.3 Anwendungen von Dervan-Polyamiden.....	33
1.5.4 Limitierungen von Dervan-Polyamiden.....	34

1.5.5	Synthese.....	34
1.6	Nachweismethoden für die Nanometerwelt	37
1.6.1	Rasterkraftmikroskopie.....	37
2	Zielsetzung.....	41
3	Eigene Arbeiten und Kooperationen.....	47
3.1	DNA- <i>minicircles</i>	47
3.1.1	<i>A-tracts</i>	47
3.1.2	Die Richtung der intrinsischen Krümmung von <i>A-tracts</i>	48
3.1.3	Synthesestrategien für DNA- <i>minicircles</i>	49
3.1.4	Kinasierung.....	51
3.1.5	Hybridisierung.....	52
3.1.6	Ligation.....	52
3.1.7	DNA- <i>minicircle</i> -Synthese über einzelsträngige Ringe.....	53
3.1.8	Aufreinigung der <i>minicircles</i>	54
3.1.9	Sequenzdesign von DNA- <i>minicircles</i>	62
3.2	Eine Polyamid-Stütze als sequenzspezifischer DNA-Kleber.....	70
3.2.1	Design und Synthese	71
3.2.2	Varianten der Polyamid-Stütze	72
3.2.3	<i>Minicircle</i> -Design und -Synthese für die Dimerisierung mit der Polyamid-Stütze	74
3.2.4	SPR- und Love-Wellen-Bindungsstudien	75
3.2.5	Gelshift-Experimente (EMSA).....	77
3.2.6	Fluoreszenzpolarisation	79
3.2.7	FCS und FCCS.....	80
3.2.8	AFM-Aufnahmen der ternären Komplexe.....	83
3.2.9	Nachteile der Polyamid-Stütze.....	84
3.2.10	Bewertung und Ausblick.....	89
3.3	AFM von <i>minicircles</i>	90
3.4	LILBID-Massenspektrometrie von Komplexen mit DNA.....	96
3.4.1	Funktionsweise.....	96
3.4.2	LILBID-Massenspektrometrie von PA-DNA-Komplexen.....	97
3.4.3	LILBID von DNA-DNA-Komplexen	99
3.4.4	LILBID von Plasmid-DNA	100
3.4.5	LILBID von DNA-Protein Komplexen.....	101
3.5	Eine Röhre aus <i>minicircles</i> und Polyamid-Stützen.....	104
3.6	Polyamid-Anker	107
3.6.1	Elektrostatischen Abstoßungen in DNA-Nanoarchitekturen.....	108

3.6.2	Design des Polyamid-Anker- <i>minicircles</i>	109
3.6.3	Konjugation eines Polyamides an ein DNA-Oligonukleotid.....	111
3.6.4	Synthese des Polyamid-Anker-DNA- <i>minicircles</i>	117
3.6.5	Langzeitstabilität und Reversibilität der Dimerisierung.....	119
3.6.6	Höher geordnete Architekturen mit Polyamid-Ankern.....	120
3.6.7	Diskussion und Ausblick.....	121
3.7	Ein Catenan aus DNA <i>minicircles</i>	123
3.7.1	Versuch der Darstellung eines Catenans mit einer Polyamid-Stütze.....	123
3.7.2	Versuch der Darstellung eines Catenans mit Polyamid-Ankern.....	125
3.8	G-Quadruplex-Module.....	127
3.8.1	Einführung.....	127
3.8.2	Der Haarnadel- <i>minicircle</i>	128
3.8.3	Ein G-Quadruplex-Catenan.....	131
3.8.4	Der Stimmgabel- <i>minicircle</i>	133
3.9	„Gecagete“ Architekturen.....	136
3.9.1	Einführung.....	136
3.9.2	Design mehrerer gecageter <i>minicircles</i>	137
3.9.3	Synthesen der <i>minicircles</i> und Bestrahlungsexperimente.....	139
3.9.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	141
3.10	DNA-Rotaxane.....	142
3.10.1	Ein Rotaxan mit ringförmigem Stopper.....	142
3.10.2	Ein [3]Rotaxan.....	144
3.10.3	Rotaxan mit sphärischem Stopper.....	145
3.11	DNA-Superhelix.....	148
3.12	Eine Röhre aus DNA- <i>minicircles</i> mit <i>staple strands</i>	151
3.12.1	Entwurf von <i>staple strands</i>	151
3.12.2	Design mit einem einzigen <i>A-tract</i> -haltigen <i>minicircle</i>	153
3.12.3	Eine <i>half crossover</i> -Röhre.....	156
3.12.4	Ausblick.....	159
4	Experimenteller Teil.....	161
4.1	Darstellung und Aufreinigung der DNA- <i>minicircles</i>	161
4.2	Eine Polyamid-Stütze.....	166
4.3	AFM.....	168
4.4	LILBID-Massenspektrometrie.....	170
4.5	Röhre mit Polyamid-Stützen.....	171
4.6	Polyamid-Anker.....	171

4.7	Catenan	173
4.8	G-Quadruplex-Module	175
4.9	Gecagete Architekturen	176
4.10	DNA-Superhelix	177
4.11	DNA-Röhre mit <i>crossover</i>	177
4.12	Materialien und Geräte	179
4.12.1	Chemikalien, Enzyme	179
4.12.2	Geräte	180
4.12.3	Verbrauchsmaterial	181
4.12.4	Puffer	181
4.12.5	HPLC-Gradienten	182
4.12.6	Software	183
5	Anhang	184
5.1	Abkürzungsverzeichnis	184
5.2	Literatur	187
5.3	Danksagung	197
5.4	Lebenslauf Thorsten-Lars Schmidt	199
5.5	Eidesstattliche Versicherung	201

Eigene Publikationen/ own publications

- [i] Schmidt, T. L.; Nandi, C. K.; Rasched, G.; Parui, P. P.; Brutschy, B.; Famulok, M.; Heckel, A., Polyamide Struts for DNA Architectures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4382–4384.
- [ii] Morgner, N.; Barth, H. D.; Schmidt, T. L.; Heckel, A.; Scheffer, U.; Göbel, M.; Fucini, P.; Brutschy, B., Detecting Specific Ligand Binding to Nucleic Acids: A Test for Ultrasoft Laser Mass Spectrometry. *Z. Phys. Chem.* **2007**, *221*, 689-704.
- [iii] Rasched, G.; Ackermann, D.; Schmidt, T. L.; Broekmann, P.; Heckel, A.; Famulok, M. DNA Minicircles with Gaps for Versatile Functionalization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 967-970. (selected for cover)
- [iv] Nandi, C.; Parui, P.; Schmidt, T. L.; Heckel, A.; Brutschy, B. Binding of hairpin polyamides to DNA studied by fluorescence correlation spectroscopy for DNA nanoarchitectures. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 1595-1603.
- [v] Schmidt, T. L.; Heckel, A., Pyrrole/Imidazole-Polyamide Anchors for DNA Tertiary Interactions. *Small* **2009**, *5*, 1517-1520. (selected for cover)
- [vi] Hoffmann, J.; Schmidt, T. L.; Heckel, A.; Brutschy, B., Probing the limits of liquid droplet laser desorption mass spectrometry in the analysis of oligonucleotides and nucleic acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 2176-2180.
- [vii] Ackermann, D.; Schmidt, T. L.; Hannam, J. S.; Purohit, C. S.; Heckel, A.; Famulok, M., A double stranded DNA Rotaxane. *Nature Nanotechnol* **2010**, *5*, 436-442.
- [viii] Goncalves, D. P. N.*; Schmidt, T. L.*, Koepfel, M. B.; Heckel, A., DNA Minicircles Connected via G-Quadruplex Interaction Modules. *Small* **2010**, 1347-1352. (*=geteilte Erstau-torschaft/ shared first authorship)
- [ix] Kumar, J.; Sreeramulu, S.; Schmidt, T. L.; Richter, C.; Vonck, J.; Heckel, A.; Glaubitz, C.; Schwalbe, H., Structural rearrangement during amyloid fibril formation of the human prion protein. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1208-1213.
- [x] Ackermann, D.; Rasched, G.; Verma, S.; Schmidt, T. L.; Heckel, A.; Famulok, M. Assembly of dsDNA nanocircles into dimeric and oligomeric aggregates. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4154-4156.

Zusammenfassung

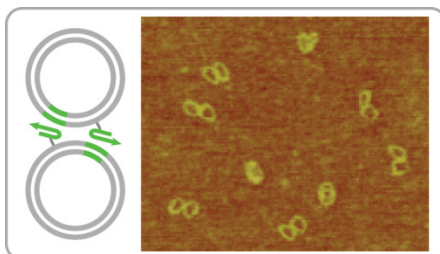
Um Materie mit Nanometergenauigkeit anzuordnen, ist Selbstorganisation die mächtigste Strategie. DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist hierfür ein hervorragendes Baumaterial, da sie ein billiges, programmierbares, biokompatibles und gut verstandenes Polymer ist. Aus diesen Gründen ist DNA zur Basis für ein schnell wachsendes Gebiet geworden: die DNA-Nanotechnologie.

Das Ziel dieser Arbeit war es, neue Interaktionsmöglichkeiten für die DNA-Nanotechnologie zu entwickeln und neuartige Strukturen aus DNA-*minicircles* aufzubauen, einem bislang vernachlässigten Konstruktionselement.



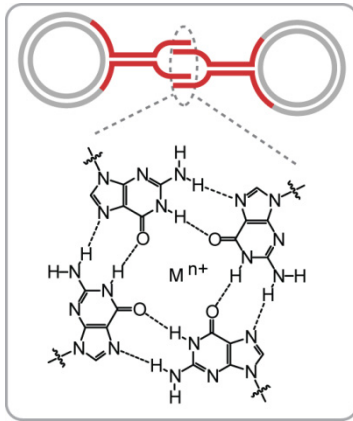
Migrationsstabile Holliday-Kreuzungen sind das zentrale Konstruktionselement für DNA-Nanoarchitekturen und erlauben unter anderem den Aufbau von DNA-*tiles* und DNA-Origami. Doch haben diese Kreuzungen den Nachteil, im Vergleich zur relativ steifen linearen B-DNA sehr weich zu sein. In dieser Doktorarbeit wurden zwei Konzepte entwickelt, um doppelsträngige DNA mit nahezu beliebigen Sequenzen durch DNA-bindende Polyamide zu verbinden.

Im ersten Ansatz wurden zwei dieser sequenzspezifischen *minor groove*-Binder durch einen langen, flexiblen Linker miteinander verknüpft. Wir nannten dieses heterobifunktionale Molekül die Polyamid-Stütze und sie hatte die Fähigkeit, zwei unmodifizierte B-DNA-Objekte von der Größe zweier 100 kDa schwerer *minicircles* zusammenzuhalten [i, in eigene Literatur]. Man kann sich vorstellen, dass die Polyamid-Stütze in Zukunft als ein nützliches Werkzeug für den Aufbau von Architekturen mit oder an B-DNA dienen könnte, möglicherweise sogar in einem biologischen Kontext.



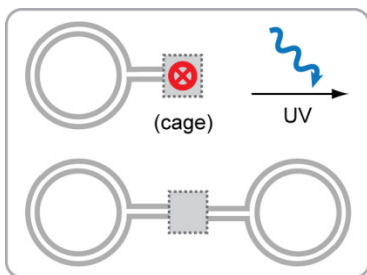
In einem verbesserten Konzept wurde ein Polyamid über einen Linker kovalent direkt mit einem Oligonukleotid verknüpft. Wir nannten diesen Ansatz den Polyamid-Anker. Dieses Hybridmolekül wurde dann in einen DNA-*minicircle* eingebaut. Der *minicircle* trug auch eine Bindungsstelle für das Polyamid in einem Abstand

zur Anknüpfungsstelle, dass keine Bindung an denselben Ring stattfinden konnte. Wurden diese *minicircles* in einem geeigneten Puffer inkubiert, so bildeten sie Homodimere, welche stabiler waren als die vergleichbaren Komplexe mit der Polyamid-Stütze [v].



Ein drittes Projekt basierte auf G-Quadruplex Interaktionen. G-Quadruplexe bestehen aus mehreren planaren Schichten von je vier Guaninen und können durch eine Reihe von Kationen induziert werden. Um diese Interaktion als ein salzinduzierbares Interaktionsmodul einsetzen zu können, haben wir DNA-*minicircles* mit G-reichen Apendices in der Form von Haarnadeln oder Stimmgabeln versehen. Wir fanden keine Komplexe bei den Haarnadel-*minicircles*, jedoch konnten wir in einer bestimmten Syntheseprozedur catenierte *minicircles* erzeugen, die folglich sogar unter denaturierenden

Bedingungen stabil waren. Die Stimmgabel-*minicircles* hingegen bildeten bereitwillig Komplexe. Überraschenderweise hing die Art der Komplexe sehr von der Art des zugegebenen Kations ab. Natrium induzierte Homodimere, während Kalium zu einer Aggregation der Ringe führte. Das von uns eingeführte G-Quadruplex-Modul könnte in Zukunft nützlich sein, um einwertige Kationen als ein Eingabesignal für den Zusammenbau oder eine Reorganisation einer Architektur oder eines DNA-Apparates zu nutzen.

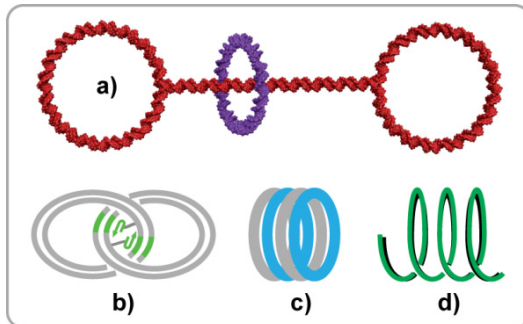


Nukleinsäuren mit *cages* (photolabilen Schutzgruppen) an den Nucleobasen wurden im Arbeitskreis Heckel entwickelt und sind vielversprechende Werkzeuge für die Molekularbiologie und vielleicht sogar für medizinische Anwendungen. Doch wurden solche Nucleinsäuren bislang nicht in der DNA-Nanotechnologie eingesetzt. Für dieses Projekt haben wir unterschiedliche gecagete Oligonukleotiden in *minicircles* ein-

gebaut. Vor der Bestrahlung mit UV Licht unterbanden die *cages* eine Dimerisierung der *minicircles* effektiv, nach der Bestrahlung erreichte die Dimerisierung die gleiche Effizienz wie nicht gecagete „Wildtyp“ *minicircles* [Manuskript in Vorbereitung]. Man kann sich vorstellen, dass gecagete Nucleinsäuren als temporäre Wegsperrern für DNA-Wanderer, als zusätzliches Kontrollelement im Aufbau von DNA-Kacheln und Origami dienen oder Licht als Eingabesignal für ein logisches Gerät oder Computer auf DNA-Basis nutzbar machen.

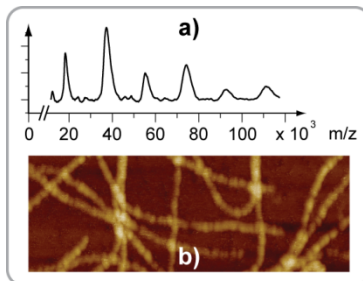
DNA-*minicircles* haben sich als nützlich Modellsystem zum Testen neuer Interaktionen herausgestellt, da sie einfach herzustellen, aufzureinigen und mit AFM abzubilden sind [iii, x]. Wir

wollten zirkuläre DNA aber auch als Motiv für den Aufbau von komplexeren Strukturen verwenden.



Mit einem mittleren Ring aus doppelsträngiger DNA und einer hantelförmigen Einheit mit *minicircles* als Stopperelementen wurde im Arbeitskreis von Prof. Famulok das erste DNA-Rotaxan synthetisiert und im Rahmen dieser Arbeit abgebildet (a) [vii]. In einem anderen Projekt sollten Polyamid-Stützen oder -Anker für die Präorganisation von C-förmigen DNA-

Fragmenten eingesetzt werden. Durch die Zugabe von Fragmenten, die einen Ringschluss ermöglichen, sollten DNA-Catenane dargestellt werden (b, Projekt in Bearbeitung). Durch Übereinanderstapeln von *minicircles* und Verkleben der Lagen durch Polyamid-Stützen, -Anker oder über *crossovers* sollte eine DNA-Röhre geschaffen werden (c, unabgeschlossenes Projekt). Über *rolling circle amplifikation* sollte aus einem einzelsträngigen *minicircle* ein langer *A-tract* reicher Strang synthetisiert werden. Wenn nun komplementäre Fragmente hinzugefügt werden, und deren Windungen durch Polyamid-Stützen, -Anker oder *crossovers* untereinander stabilisiert werden, sollte eine Spirale oder Superhelix entstehen (d, unbeeendetes Projekt).



In mehreren Kollaborationen wurden DNA-Polyamid-Interaktionen mittels LILBID-Massenspektrometrie und FCS untersucht [ii, iv]. Diese Versuche konnten die starke und sequenzspezifische Bindung bestätigen.

Des Weiteren wurden Experimente entworfen und Bedingungen optimiert, um DNA-Protein und DNA-DNA-Komplexe (a) und sogar ganze DNA-Plasmide mit LILBID-

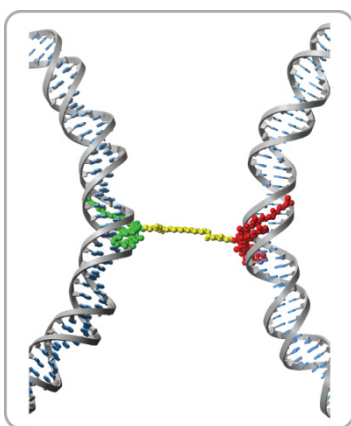
Massenspektrometrie zu messen [vi].

Andere Kollaboration hatten zum Ziel, Prionenprotein Fibrillen [b, ix], den mitochondrialen Komplex I oder Cph-1-Phytochrom-Komplexe mit AFM abzubilden.

English summary

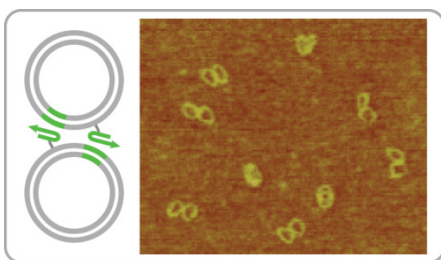
In order to arrange matter with nanometer precision, self organization is the most powerful strategy. For this, DNA is an outstanding material as it is a cheap, programmable, biocompatible and well understood polymer and therefore became the basis for a fast growing field: DNA-nanotechnology.

The aim of this thesis was to develop new types of interactions for DNA nanotechnology and to build up structures from DNA minicircles, a so far neglected construction element.

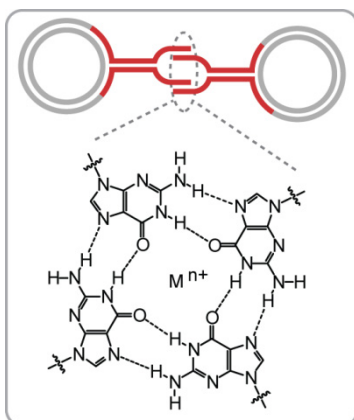


Migration stable Holliday junctions are the central construction element for DNA-nanoarchitectures and for example allow the assembly of DNA tiles as well as DNA origami. However, junctions have the drawback to be very flexible in comparison to the rather rigid linear B-DNA. In this thesis two concepts were developed to connect double stranded DNA of nearly arbitrary sequences by the means of DNA binding polyamides.

In the first approach, two of these sequence specific minor groove binders were connected with a long, flexible linker. We called the resulting heterobifunctional molecule the polyamide strut, which had the ability to hold together unmodified B-DNA objects as big as two 100 kDa minicircles [i, own literature]. The polyamide strut can be envisioned to be a valuable tool for the construction of architectures with or on B-DNA, maybe even in a biological context.

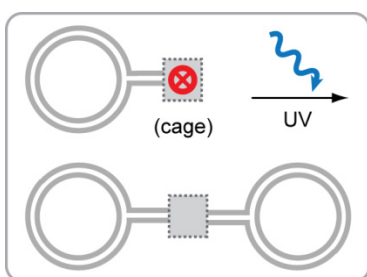


In a refined concept I covalently connected one polyamide with a linker directly to an oligonucleotide. We called this approach the polyamide anchor. This hybrid molecule was then incorporated in a DNA minicircle. The minicircle also carried a binding site for the polyamide in a suitable distance from the anchor to prevent binding to the same ring. Incubated in an appropriate buffer, these minicircles autonomously formed homodimeric complexes that were more stable than the complexes obtained with the strut [v].



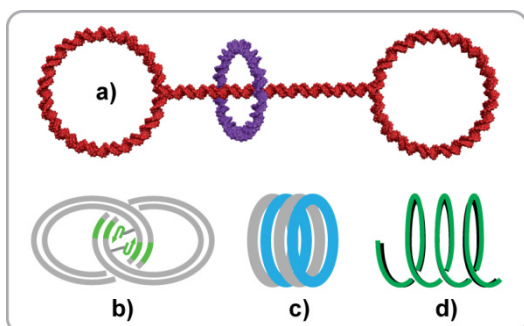
A third project was based on G-quadruplex interactions. G-quadruplexes are formed by stacks of four guanines in a plane and can be induced by a number of different cations. To use this interaction as a salt inducible interaction module, we equipped DNA minicircles with G-rich appendices in the form of a hairpin or a tuning fork. We found no complexes for the hairpin minicircles, but in a modified synthesis procedure we were able to produce catenated minicircles which thus were stable even under denaturing conditions. The tuning fork minicircles on the other hand readily formed complexes, but

the type of complexes strongly depended on the type of added cation. Sodium induced homodimeric complexes whereas potassium led to an aggregation of the minicircles. The G-quadruplex module introduced here might find an application in the use of monovalent cations as an input signal for the assembly or reorganization of a device or architecture.



Nucleic acids with “cages” (photolabile protecting groups) on the nucleobases were developed in the Heckel group and are highly promising tools for molecular biology or even medicine. However, they have not been introduced to the field of DNA-nanotechnology, yet. For this project we incorporated different sets of caged oligonucleotide into minicircles. Before irradiation with UV light, the cages effectively inhibited

the dimerization of the minicircles, after irradiation the dimerization efficiencies could be restored to the level of non-caged “wildtype” minicircles [manuscript in preparation]. Caged nucleic acids can be envisioned to act as temporary roadblocks for DNA walkers, as additional control elements in the assembly of DNA tiles and origami. Furthermore, light could be used as an input signal for logic or computational DNA devices.



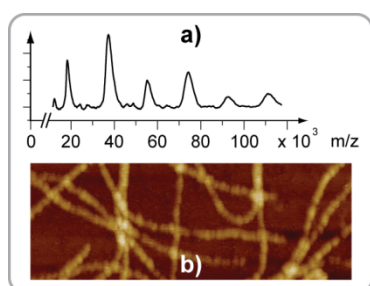
DNA minicircles proved to be a useful model system to test new interaction modes as they can easily be produced, cleaned up and imaged by AFM [iii, x]. We also were seeking to use circular DNA as structural motifs for more complex structures. With a central ring from double stranded DNA and a dumbbell shaped unit with minicircles as stoppers (a), the first

DNA rotaxanes were synthesized in the laboratory of Prof. Famulok and imaged by the author [vii].

In another project, polyamide anchors or struts should be used for the preorganization of two C-shaped DNA fragments. When fragments that complement a full circle are added, DNA catenanes should be produced (b, ongoing project).

Piling the DNA minicircles onto another and gluing them together with polyamide struts, anchors or with crossover strands, a DNA tube should be constructed (c, unfinished project).

Running rolling circle amplification on a single stranded minicircle, a long A-tract rich DNA strand should be produced. When adding the complementary sequences and connecting the neighboring turns with polyamide struts, anchors or crossovers, a spiral or superhelix could be produced (d, unfinished project).



In various collaboration projects DNA-polyamide interactions were investigated with LILBID mass spectrometry and FCS confirming the strong and sequence specific binding [ii, iv].

Moreover, experiments were designed and conditions optimized to measure DNA-Protein and DNA-DNA complexes (a) and even big DNA plasmids LILBID mass spectrometry

[vi]. Other collaborations focused on imaging prion protein fibrils [b, ix], the mitochondrial complex I and Cph-1 phytochrom complexes with AFM.

1 Einführung

1.1 Nanotechnologie

„Nano-“ ist in den Naturwissenschaften ein Präfix, das sich von griechisch *nannos*: (Zwerg) ableitet und für den milliardsten Teil ($= 1/1\,000\,000\,000 = 10^{-9}$) von etwas steht. In dem Begriff Nanotechnologie bezieht sich „nano“ auf einen Nanometer (10^{-9} m). Ein Nanometer ist die Länge, um die ein menschliches Haar wächst, während man das Wort „nano“ sagt. Ein Nanometer ist etwa 70.000-mal kleiner als die Dicke eines menschlichen Haares und immer noch einige 100-mal kürzer als die Wellenlänge des sichtbaren Lichtes. Dies sind die Größenordnungen von Objekten, mit denen sich die Nanotechnologie beschäftigt.

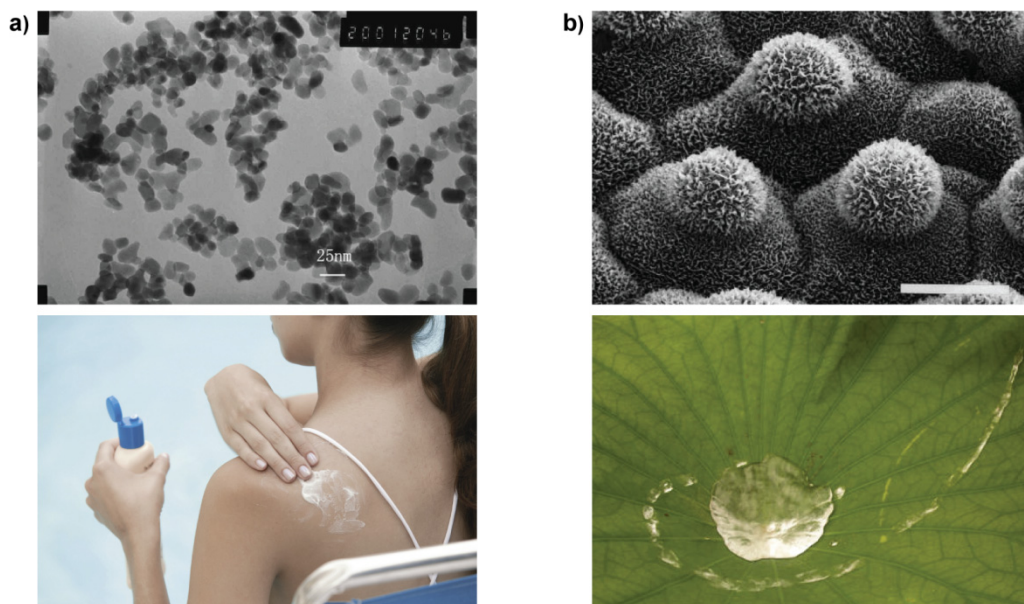


Abbildung 1: Zwei Beispiele von Nanotechnologie aus dem täglichen Leben: a) Oben: TEM Bild von Nanopartikeln aus Titandioxid, Bestandteil von Sonnencreme. b) Nanostrukturierte Oberfläche eines Kohlblattes (Balken= 20 µm). Diese Struktur ist verantwortlich für den Lotuseffekt.

Die Nanotechnologie ist eine fächerübergreifende Wissenschaft zwischen Physik, Chemie und Biologie und ist in den letzten Jahren ins Bewusstsein einer breiten Öffentlichkeit gerückt. Obwohl oder gerade weil der Begriff nicht scharf umrissen ist, weckt er doch bei vielen Hoffnungen.

gen oder Ängste.¹ Im Lichte des tatsächlichen Standes des noch jungen Wissenschaftszweiges erscheinen jedoch viele Hoffnungen und Ängste unbegründet.

Auch der Lotuseffekt wird gerne als ein Beispiel für Nanotechnologie herangezogen. Der Lotuseffekt wurde bei der Lotuspflanze entdeckt und ist dafür verantwortlich, dass bestimmte Oberflächen extrem schlecht benetzbar sind. Auf Lotusblättern und zahlreichen anderen Pflanzen finden sich 10-15 µm große Strukturen, sogenannte Papillen. Diese wiederum sind mit (hydrophoben) epikutikalen Wachsen überzogen, die auf den Papillen eine noch feinere Substruktur bilden (siehe Abbildung 1 b).² Die Kombination der Mikrostrukturierung und der hydrophoben Wachse sind dafür verantwortlich, dass die Adhäsionskräfte eines Wassertropfens mit der Blattoberfläche unter die Oberflächenspannung des Wassers sinken; als Folge perlt Wasser ohne die Oberfläche zu benetzen ab.³ Vom Lotuseffekt inspirierte Oberflächen werden seit einiger Zeit erfolgreich eingesetzt, um Fensterscheiben (beispielsweise in Autos oder ICE Zügen) schlechter benetzbar zu machen oder Kleidung zu fertigen, welche nicht so schnell schmutzig wird wie herkömmliche.

Um Objekte in der Nanometer Größenskala herzustellen gibt es zwei mögliche Herangehensweisen:

- *top down* (engl. „von oben nach unten“) und
- *bottom up*.(engl. von unten nach oben“).

Top down

Im *top down*-Ansatz wird versucht, etwa durch lithografische Methoden oder durch mechanische Manipulation größere Strukturen oder Objekte immer weiter zu verkleinern. Das *top down*-Prinzip ist in der Computertechnologie, und praktisch nur hier mit einem so weitreichenden kommerziellen Erfolg, erfolgreich angewandt worden. Durch immer kurzwelligere Strahlung und zahlreiche andere technische Fortschritte können heute Strukturen von wenigen 10 nm Größe photolithographisch hergestellt werden.⁴

Eine der wenigen Möglichkeiten der direkten Manipulation von Objekten in der Nanometer Größenskala bietet die Rastertunnelmikroskopie (STM für *scanning tunneling microscopy*) oder die Rasterkraftmikroskopie (engl. *atomic force microscopy*, AFM, siehe 1.6.1). Mit Hilfe von sehr feinen AFM- oder STM-Spitzen lassen sich auch einzelne Moleküle oder gar Atome bewegen (Abbildung 2). Bei diesen Manipulationen ist man aber weitgehend auf zweidimensionale Anwendungen beschränkt und damit ist der gezielte Aufbau von dreidimensionalen Objekten schwierig. Des Weiteren können nicht viele Strukturen parallelisiert aufgebaut werden.

Als Alternative für den Aufbau winziger Strukturen ist deshalb der *bottom up*-Ansatz die mächtigere Herangehensweise.

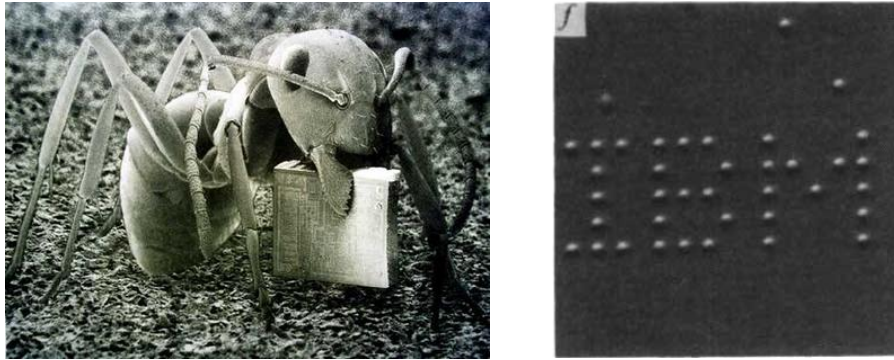


Abbildung 2 Links: Ameise, die einen Computerchip in ihren Mandibeln hält. Rechts: Xenon-Atome, die mit einem STM auf einer Nickel-Oberfläche angeordnet wurden.⁵

Bottom up

Im *bottom up*-Ansatz lagern sich kleine Objekte (z.B. Moleküle) durch Selbstorganisation zu größeren, komplexeren Strukturen zusammen. Von Selbstorganisation spricht man hier, da die Prozesse spontan unter Gleichgewichtsbedingungen und vor allem ohne Steuerung von außerhalb des Systems ablaufen.⁶

Die wichtigsten Kräfte, die in selbstorganisierenden Systemen eine Rolle spielen sind (nach Lit.⁶):

- reversible kovalente Bindungen
- elektrostatische Kräfte
- Metall-Ligand-Bindungen
- Wasserstoffbrückenbindungen
- hydrophil/ hydrophobe Wechselwirkungen
- π -stacking zwischen Aromaten
- Van-der-Waals-Kräfte

Anders als für den *top down*-Ansatz sind in der Natur Beispiele von Selbstorganisation allgegenwärtig.⁷ Ein wichtiger Prozess von Selbstorganisation ist die Kristallisation. Kristalle stellen ein energetisches Minimum dar, da hier die Anziehungskräfte der Atome oder Moleküle untereinander maximiert sind. Als Ergebnis ist in einem Kristall die Position jedes einzelnen Bausteins sehr genau bestimmt. Eine solche Präzision lässt sich mit dem *top down*-Ansatz nicht bewerkstelligen, da manipulativen Eingriffen in Systeme dieser Größenskala meist quantenmechanische Probleme im Weg stehen.

Das Prinzip der Energieminimierung steckt auch hinter der Faltung von Proteinen. Aus einer gegebenen Sequenz eines Peptides lassen sich theoretisch eine ungeheuer große Anzahl von Konformationen realisieren. Doch stabil sind nur sehr wenige hiervon, da interne Wechselwir-

kungen bestimmte Konformationen energetisch begünstigen.⁸ Dies hat zur Folge, dass Polypeptide durch Faltung definierte Strukturen bilden und als Proteine oder Enzyme eine Vielzahl von biologischen Funktionen übernehmen können.

Aber auch unter Proteinen kann man Selbstorganisation beobachten da Wechselwirkungen untereinander und mit anderen Molekülen und Komplexen entstehen können. Besonders eindrucksvoll und gut untersucht ist der selbstständige Zusammenbau von Viren, wie zum Beispiel dem Tabak-Mosaik-Virus.⁹ Dieses extrem einfach aufgebaute Virus besteht nur aus einer einzigen Art von Proteinen und seiner Erbsubstanz (Ribonukleinsäure, RNA). Doch diese Einzelteile sind so beschaffen, dass sie sich autonom zu funktionellen Viren zusammenbauen können. (Abbildung 3 a).

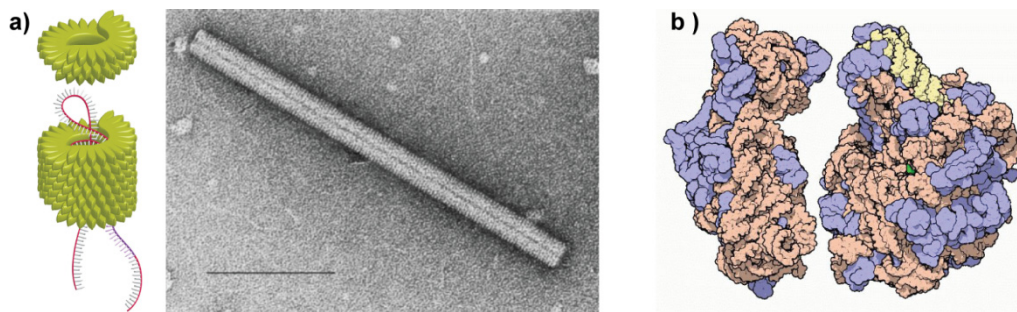


Abbildung 3 a) Schematische Darstellung des Tabak-Mosaik-Virus und transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (TEM). b) Schematische Darstellung der beiden ersten Untereinheiten eines Ribosoms.

Ein anderes Beispiel für durch Selbstorganisation entstandene Strukturen sind Ribosomen, welche aus zwei Untereinheiten bestehen und welche wiederum aus RNA und ribosomalen Proteinen zusammengesetzt sind.¹⁰ Durch Selbstorganisation aufgebaute Komplexe wie das Ribosom sind unerlässlich für alle Lebewesen. Man kann sogar so weit gehen zu sagen, dass Leben insgesamt ein Ergebnis von Selbstorganisation ist.¹¹ Zellen sind ein funktioneller Zusammenschluss von vielen molekularen Bestandteilen, höhere Lebewesen ein Zusammenschluss von vielen Zellen.

Die Natur hat in 2 Milliarden Jahren unzählige Beispiele für selbstorganisierte Strukturen hervorgebracht und viele Prinzipien und Strukturen sind bereits aufgeklärt. Doch ist die Wissenschaft noch weit davon entfernt, komplexe Strukturen wie Ribosomen *de novo* entwerfen und bauen zu können. Doch sind schon erste Schritte auf dem Weg zu diesem Ziel getan. Als Bau- und Funktionsmaterial für die Nanometerwelt etabliert sich mehr und mehr ein Polymer, das die Natur selbst hervorgebracht hat: Desoxyribonukleinsäure (engl. *desoxyribonucleic acid*, kurz DNA).

1.2 DNA - Baumaterial für die Nanometerwelt

Nukleinsäuren und Polypeptide (in Form von Proteinen) sind zweifellos die beiden wichtigsten Polymere für das Leben, so wie wir es kennen. In beiden Fällen handelt es sich um unverzweigte Polymere, die aus wenigen verschiedenen Einzelbausteinen aufgebaut sind. Wie oben beschrieben sind interne Wechselwirkungen in Polypeptiden für deren Strukturvielfalt verantwortlich. Des Weiteren bieten die verschiedenen Seitenketten der 21 proteinogenen Aminosäuren vielfältige Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Molekülen und Oberflächen. Diese Vielfalt ermöglicht es Proteinen, verschiedenste biologische Funktionen auszuüben. DNA hingegen erscheint auf den ersten Blick fast langweilig einfach aufgebaut. Meistens liegt sie als doppelsträngige B-DNA (s.u.) vor, deren Hauptaufgabe in der Biologie es ist, Informationen zu speichern. Grundlegende Eigenschaften und Prinzipien, die DNA dennoch zu einem der interessantesten Baumaterialien für die Nanowelt haben werden lassen, sollen im Folgenden besprochen werden.

1.2.1 Doppelsträngige DNA

Die Entdeckung der Struktur der DNA ist ein wissenschaftsgeschichtlich höchst interessanter Vorgang. Anfang der 1950-er Jahre war noch nicht geklärt, wie und wo der „Bauplan“ für das Leben abgespeichert wird und in welcher Form die Natur Informationen weitervererbt. Neben Proteinen wurden auch Nukleinsäuren als Träger der Erbinformationen diskutiert. Die chemische Zusammensetzung der DNA aus einem Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat und den vier Nucleobasen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin war bekannt. Auch gab es auch schon erste, nicht eindeutige Hinweise auf eine helikale Struktur, welche aus röntgenkristallografischen Daten aus DNA-Fasern abgeleitet wurden. So entdeckte Rosalind Franklin zwei unterschiedliche Formen von DNA, die sie A- und B- Form taufte. Auch war etwa nicht klar, aus wie vielen Strängen die DNA besteht, ob das Ribose-Phosphat-Rückgrat innen oder außen zu liegen kommt und welche Kräfte die Helix zusammenhalten.

Der Durchbruch gelang schließlich James Watson und Francis Crick durch drei Faktoren. Erstens nahmen die beiden an, dass die Phosphate außen liegen müssten, da dies elektrostatisch am plausibelsten erschien. Zweitens legten sie ihrem Modell entgegen der damals vorherrschenden Lehrmeinung die Keto-Tautomere der Nucleobasen statt der Enol-Form zugrunde. Erst durch diese Annahme konnten sie erkennen, dass Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin und Thymin bzw. Cytosin und Guanin für den Zusammenhalt der Helix verantwortlich sein können. Diese Annahme war im Einklang mit von Erwin Chargaffs gefundenen Verhältnissen der Nucleobasen zueinander.¹² Der letzte entscheidende Schritt war die richtige Interpretation, dass die C₂-

Symmetrie der Röntgenreflexe von einer Doppelhelix (und nicht wie zuvor von Linus Pauling postuliert¹³ von einer Dreifachhelix) stammen muss.

Ohne eigene Experimente gemacht zu haben und nur gestützt auf einen kurzen Blick¹⁴ auf eine röntgenographische Aufnahme von Rosalind Franklin postulierten Watson und Crick 1953 eine bestechend einfache und letztlich als richtig erkannte Struktur.¹⁵ Demnach liegt DNA (in der Regel) als helikal gewundener Doppelstrang in der von Franklin so benannten „B-Form“ vor. Die Stränge verlaufen antiparallel und die Nucleobasen liegen innen, wobei immer A gegenüber von T und C gegenüber von G zu liegen kommt (Abbildung 4 Mitte). Die beiden antiparallelen Stränge können jeweils für den anderen Strang als „Negativ“ dienen, was für die Replikation der DNA (und für die vorliegende Arbeit) von ungeheurer Bedeutung ist.¹⁶

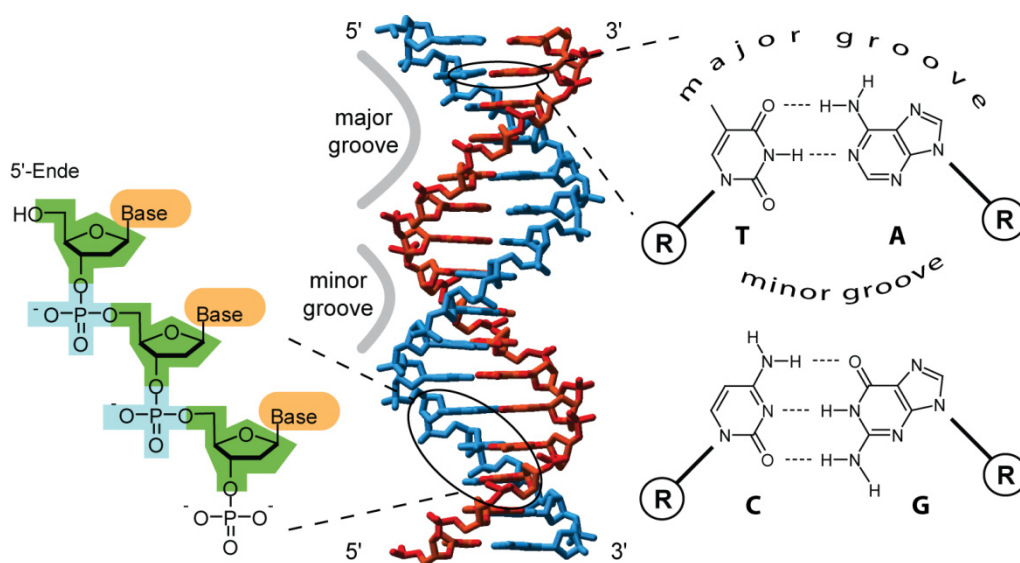


Abbildung 4: Mitte: Eine DNA-Doppelhelix, hier die häufigste B-Form, ist aus zwei antiparallelen Strängen aufgebaut. Links: Das Rückgrat besteht aus einem Phosphorsäure (blau) Desoxyribose (grün) Polymer. An Position 1 der Ribose sind die Nucleobasen (orange) verknüpft. Rechts: Die Nucleobase Thymin (T), bildet zwei Wasserstoffbrücken mit Adenin (A) aus, Cytosin (C) mit Guanin (G) drei Wasserstoffbrücken. Die Nucleobasen liegen in Stapeln übereinander vor. Durch eine asymmetrische Verknüpfung der Basenpaare mit dem Rückgrat beider Stränge entstehen zwei unterschiedlich große Furchen, die große Furche (engl. major groove) und die kleine Furche (minor groove).

Neben der häufigsten B-Form gibt es noch weitere Formen der DNA. Hierunter die häufigsten und biologisch relevanten sind die A-Form und die Z-Form. Die wichtigsten Eigenschaften der drei Formen sind in Abbildung 5 und Tabelle 1 aufgeführt.

RNA-Doppelstränge bilden typischerweise die im Vergleich zur B-Form kompaktere aber breitere A-Form aus. Aber auch DNA kann bei niedrigen Wassergehalten in die A-Form übertreten,¹⁷ wie schon 1953 (kurz nach Watson und Cricks Strukturvorschlag) von Franklin und Gosling gezeigt werden konnte.¹⁸

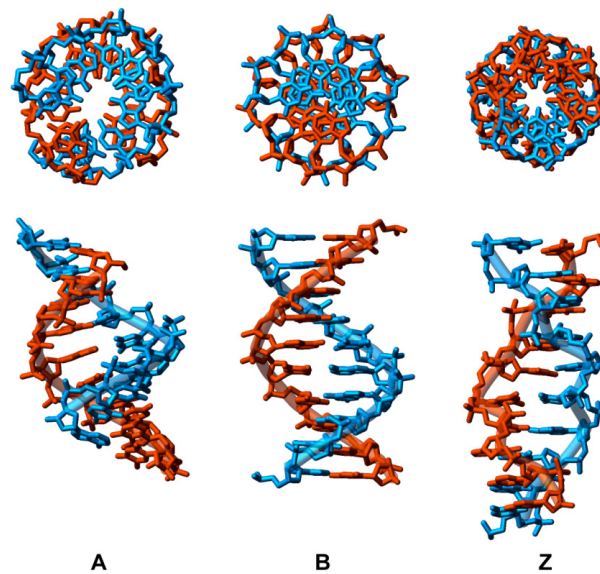


Abbildung 5: DNA-Decamere in den drei wichtigsten Formen von DNA. Links: A-Form, Mitte: B-Form, rechts: Z-Form. Obere Reihe: Sicht parallel zur Helixachse, untere Reihe: Sicht senkrecht zur Helixachse.

Parameter	A-Form	B-Form	Z-Form
Helix Händigkeit	rechtshändig	rechtshändig	linkshändig
Basen pro Windung	11	10,5	12
Ganghöhe/ Windung	23 Å	33,2 Å	45,6 Å
Durchmesser	23 Å	20 Å	18 Å
Neigung der Base zur Helixachse	19°	-1,2°	-9°
Ribose-Konformation (engl. pucker)	C3'-endo	C2'-endo	C: C2'-endo G: C2' exo

Tabelle 1: Die wichtigsten Eigenschaften von A-, B- und Z-Form von DNA. ¹⁹

Im Jahr 1979 war die Fähigkeit künstliche DNA zu synthetisieren so weit fortgeschritten, dass man erstmals Einkristalle aus DNA herstellen konnte. Überraschenderweise zeigte die erste Kristallstruktur mit atomarer Auflösung (von der Sequenz d(CGCGCG)) aber nicht die B-Form sondern eine linksgängige Form, die sogenannte Z-Form.²⁰ Die Z-Form wird nur von speziellen Sequenzen, wie abwechselnden Purinen und Pyrimidinen²¹, bei hohen Salzkonzentrationen²² oder unter Zugabe von Übergangsmetallsalzen wie Cobalt²³ gebildet. Man dachte zunächst, dass A-DNA und Z-DNA ohne biologische Relevanz sind. Doch sowohl für die A-¹⁷ als auch für die Z-Form²⁴ konnten Proteine gefunden werden, die mit hoher Affinität und Spezifität an die je-

weilige Form binden. Dies legt den Schluss nahe, dass diese Formen auch unter biologischen Bedingungen und nicht nur *in vitro* eine Rolle spielen.

Neben den in Abbildung 4 gezeigten „kanonischen“ Basenpaarungen nach Watson und Crick, die für den Großteil der DNA-Strukturen verantwortlich sind, gibt es dutzende alternative Möglichkeiten für Wasserstoffbrückenbindungen der Nukleobasen miteinander oder mit dem Ribosückgrad.²⁵ Die große Fülle der nicht kanonischen Basenpaarungen soll hier nicht weiter erörtert werden. Stellvertretend werden im Folgenden einige wenige strukturell und biologisch interessante Strukturen vorgestellt, die nicht aus linearer B-DNA bestehen und in denen teilweise auch nicht-kanonische Basenpaarungen eine Rolle spielen. Hierzu gehört die DNA-Tripelhelix, G-Quadruplexe und das i-Motiv.

1.2.2 Tripelhelix

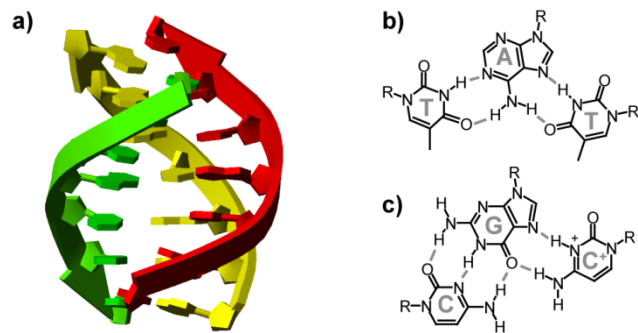


Abbildung 6 a) DNA-Tripelhelix nach Lit.²⁶; b) TAT-Interaktion; c) CGC⁺-Interaktion.

Die Tripelhelix ist eine Struktur, in der in die große Furche eines Doppelstranges ein weiterer Einzelstrang eingelagert ist (siehe Abbildung 6). Entdeckt wurde diese Struktur an poly-A und poly-U Strängen an RNA,²⁷ finden sich aber auch bei DNA. Dabei bilden sich in Anwesenheit von Magnesiumsalzen TAT-Basentriplets nach Hoogsteen aus. Daneben können auch CGC⁺-Triplets, in denen ein Cytosin protoniert ist, zu Tripelhelices führen. Ob Tripelhelices eine biologische Relevanz haben ist nicht ganz klar,²⁸ doch für manche Anwendungen sind sie interessant. Hierzu gehört die Möglichkeit, DNA nach Tripelhelix-Bildung von einem DNA-Doppelstrang mit einem Eisenkomplex-modifizierten Strang sequenzspezifisch zu schneiden²⁹ oder zur Bildung von Catenanen und Pseudorotaxanen.³⁰

1.2.3 G-Quadruplexe

G-Quartette sind Komplexe, in denen vier in einer Ebene liegende Guanine über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind und von einem zentralen, meist einwertigen Metallion stabilisiert werden. G-Quadruplexe werden von G-reichen DNA-Strängen gebildet, in denen mehrere Ebenen von G-Quartetten übereinander liegen (siehe Abbildung 7)³¹ und können von Strängen in verschiedenen Stöchiometrien gebildet werden. Faltet sich ein einzelner Strang (wie in Abbildung 7), spricht man von einem intramolekularen G-Quadruplex. Es gibt aber auch bi-, tetra- und multimolekulare Komplexe (siehe Abschnitt 3.8).

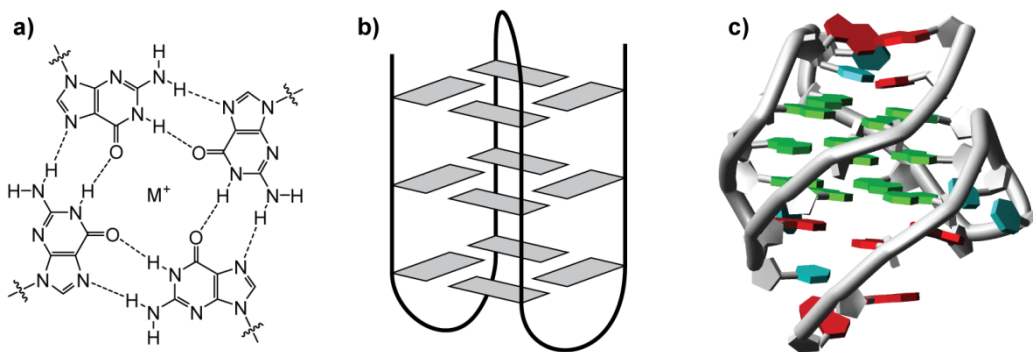


Abbildung 7 a) ein G-Quartett. Vier Guanine bilden eine planare Struktur um ein zentrales Metallatom. b) schematische Darstellung eines intramolekularen G-Quadruplex, aufgebaut aus drei Ebenen von G-Quartetts. Jedes graue Rechteck repräsentiert ein Guanin. c) Modell aus einer NMR-Struktur eines intramolekularen G-Quadruplexes. Guanine sind grün eingefärbt.

Ein und dieselbe Probe kann abhängig von der Probenpräparation und Analysemethode (NMR- oder Kristallstruktur) unterschiedliche Formen annehmen. Dabei können schon kleine Änderungen des Milieus, der Temperatur, der Konzentration und anderen Faktoren Änderungen der Struktur hervorrufen. Man spricht dann von Polymorphismus. G-Quadruplex Strukturen neigen stark zu Polymorphismus: Ein intramolekularer G-Quadruplex kann theoretisch 26 Topologien annehmen, von denen immerhin neun tatsächlich gefunden wurden.³² Selbst wenn man exakt dieselbe Sequenz betrachtet, beispielsweise die humane Telomer-Sequenz $d(\text{GGGTTA})_n$, finden sich immerhin noch vier verschiedene Topologien.³³ Und auch in multimolekularen Komplexen kann Polymorphismus beobachtet werden (siehe Abbildung 96).

Für die Stabilität von G-Quartetten und -Quadruplexen sind Metallsalze unerlässlich. Die Metallionen werden von den freien Elektronenpaaren des Sauerstoffes an Position 6 des Guanins komplexiert. Dabei können die Metallionen sowohl in einer Ebene mit den Guaninen liegen, als auch zwischen zwei Ebenen eines G-Quadruplexes.

Die Stabilität der Quadruplexe (meist ausgedrückt durch die Schmelztemperatur) ist stark vom jeweiligen Kation abhängig und folgt in der Regel dem Trend $\text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$,

Cs^+ und $\text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$.³⁴ Einwertige Kationen stabilisieren die Komplexe meist besser als zweiwertige, sogar eine Destabilisierung von Quadruplexen durch $\text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ wird berichtet.³⁵

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Stabilität von G-Quadruplexen ist die Länge der verbrückenden Schleifen. Ein Vergleich der thermischen Stabilität von teilweise randomisierten Bibliotheken G-reicher Sequenzen zeigt, dass G-Quadruplexe mit kurzen (1-2 nt) Loops stabiler sind als solche mit langen (>2).³⁶

Die biologische Relevanz von G-Quadruplexen war lange umstritten,³⁴ doch mehren sich die Hinweise, dass G-Quadruplexe auch *in vivo* eine Rolle spielen.³⁷ Ein direkter Nachweis von einer G-Quadruplex-Struktur *in vivo* gelang in der Promotor-Region von *c-Myc*.³⁸ Hier fungiert die G-Quadruplex-Struktur als Repressorelement für die Transkription. Hunderttausende potentielle G-Quadruplex-Sequenzen finden sich über das komplette menschliche Genom verteilt, verstärkt aber in oder vor Promotor-Regionen von Genen.^{36,39}

Nicht nur innerhalb des Genoms finden sich Sequenzen, die G-Quadruplexe ausbilden könnten, sondern gerade auch an den Enden der Chromosomen⁴⁰ von Eukarioten und einiger Prokarioten. Dort finden sich hoch konservierte doppelsträngige G-C-reiche Sequenzen in Längen von 300-600 Nukleotiden (nt) in Hefen und mehreren Kilobasen beim Menschen. Das 3'-Ende ist zudem um etwa 12 bis 200 Nukleotide (nt) verlängert.³⁷

Diese Endstücke von Chromosomen wurden Telomere nach griechisch „*telos*“ (=Ende) und „*meros*“ (=Teil) benannt. Telomere dienen dem Schutz der chromosomalen DNA während der Vervielfältigung der Chromosomen bei Zellteilungen. Bei diesem Vorgang geht immer ein Stück vom Ende des Chromosoms verloren. Die Telomer-Sequenz dient gleichsam als Opfer, damit nicht auch codierende Bereiche des Genoms verloren gehen. Um einen vollständigen Abbau der Telomere zu verhindern, sorgen Spezielle Enzyme, die Telomerasen, für die Verlängerung bzw. Reparatur der Telomere. Die Steuerung der Telomerasen kann in Tumorzellen gestört sein, so dass Telomerasen zur Unsterblichkeit von Tumorzellen beitragen. Das macht sie zu einem möglichen Ziel für Tumorbehandlung. Es gibt mittlerweile hunderte von Verbindungen, die als Telomerase-Inhibitoren untersucht werden.³⁴

Telomer-Sequenzen können potentiell G-Quadruplexe bilden,⁴¹ allerdings ist hier noch umstritten, ob auch *in vivo* G-Quadruplexe vorliegen. Die Untersuchungen werden dadurch erschwert, dass Telomere als Komplexe mit verschiedenen Proteinen auftreten. Immunofluoreszenz-Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern für G-Quadruplexe weisen aber darauf hin, dass die Sequenzen auch *in vivo* G-Quadruplexe bilden.⁴²

G-Quadruplexe finden sich auch in anderen Kontexten. Zahlreiche Aptamere (vgl. Abschnitt 1.2.5), wie das Thrombin-Aptamer^{43,44} und das HIV-1 Integrase-Inhibitor-Aptamer enthalten einen G-Quadruplex.^{45,46}

Die salzinduzierte Bildung von G-Quadruplexen lässt sich auch für den Aufbau von Nanostrukturen oder den Betrieb von Nanomaschinen nutzen, wie weiter unten besprochen werden soll (Abschnitt 1.4.1).

1.2.4 i-Motiv

Das sogenannte i-Motiv kann von den C-reichen Gegensträngen von potentiellen G-Quadruplex-Strängen gebildet werden (siehe Abbildung 8).^{47,48} Anders als G-Quadruplexe braucht das i-Motiv zur Stabilisierung keine monovalenten Kationen, sondern einen sauren bis gerade noch neutralen pH-Wert. Grund dafür ist, dass für C-C⁺-Interaktionen wie in Abbildung 8 a gezeigt eines der beiden Cytidine protoniert sein muss. Dadurch können sich DNA-Stränge zu einer reißverschlussartig interkalierenden Struktur zusammenlagern, bei denen die Basenpaare kreuzweise übereinander liegen.

Ähnlich wie bei G-Quadruplexen sind bei i-Motiven verschiedene Topologien und Stöchiometrien möglich. Es gibt sowohl intra- als auch bi- und tetramolekulare i-Motive.

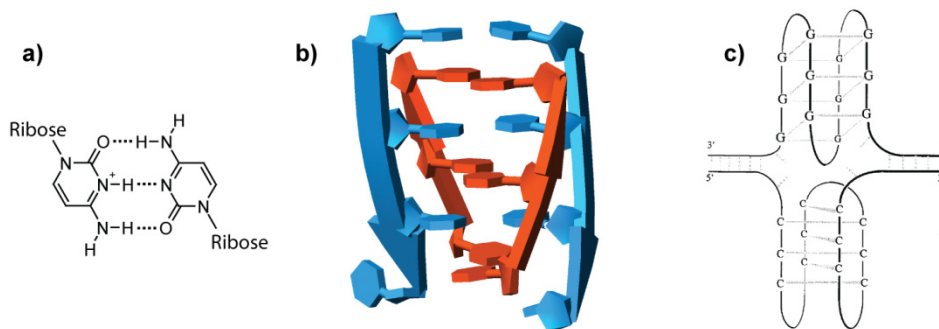


Abbildung 8 a) C-C⁺-Paare können sich zu einem sogenannten i-Motiv zusammenlagern; b) reißverschlussartige Struktur eines i-Motivs. c) Da gerade die C-reichen Gegenstränge von G-Quadruplex-Sequenzen potentiell i-Motive bilden können, wird über deren gleichzeitiges Vorhandensein spekuliert.⁴⁷

Wie auch bei G-Quadruplexen nährt die Existenz von Proteinen, welche selektiv mit i-Motiven interagieren, Spekulationen, dass die jeweilige Struktur auch eine biologische Relevanz haben könnte.⁴⁹

In der DNA-Nanotechnologie kann die pH-Wert-abhängige reversible Bildung von i-Motiven ausgenutzt werden, um DNA-Maschinen zu bauen (siehe hierzu Abschnitt 1.4).

1.2.5 Nicht-doppelsträngige Nucleinsäuren

Wie erwähnt, kommt DNA meist als Doppelstrang in der B-Form vor. In vielen biologischen und biochemischen Prozessen tauchen aber auch einzelsträngige Nucleinsäuren auf, dazu gehören beispielsweise die mRNA bei der Translation oder auch die tRNA.

Einzelsträngige DNA und RNA wird schematisch oft als lineare Polymerkette dargestellt. Dies ist aber eine sehr vereinfachte Darstellung, da ein gestreckter Einzelstrang, in dem keine internen Wechselwirkungsmöglichkeiten ausgenutzt werden, ein enthalpisches und entropisches Maximum darstellt. Interne Wechselwirkungen können, wie bei Proteinen auch, zu Faltungen und Sekundärstrukturen führen. Zwar kann die Vielfalt der chemischen Interaktionsmöglichkeiten von Nucleinsäuren nicht mit der von Peptiden konkurrieren, dennoch können auch gefaltete Nucleinsäuren erstaunliche Aufgaben erfüllen. Einige davon sollen hier vorgestellt werden.

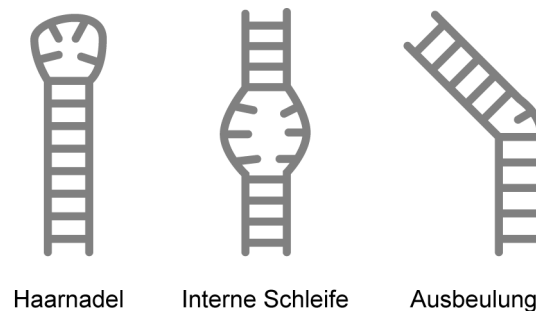


Abbildung 9: Einige alternative Struktur motive von Nucleinsäuren, die Teil einzel- oder doppelsträngiger Strukturen sein können.

tRNA

Ein wichtiges Beispiel für eine biologisch relevante einzelsträngige Nucleinsäure ist tRNA (Transfer RNA),^{50,51} welche eine wichtige Rolle für die in der Proteinbiosynthese in Ribosomen spielt.⁵² Die tRNA besteht aus 75-85 Nucleotiden, welche teilweise intern paaren können. Dadurch bildet sich eine dreidimensionale Struktur mit Schleifen und gepaarten Elementen aus (vgl. Abbildung 10).

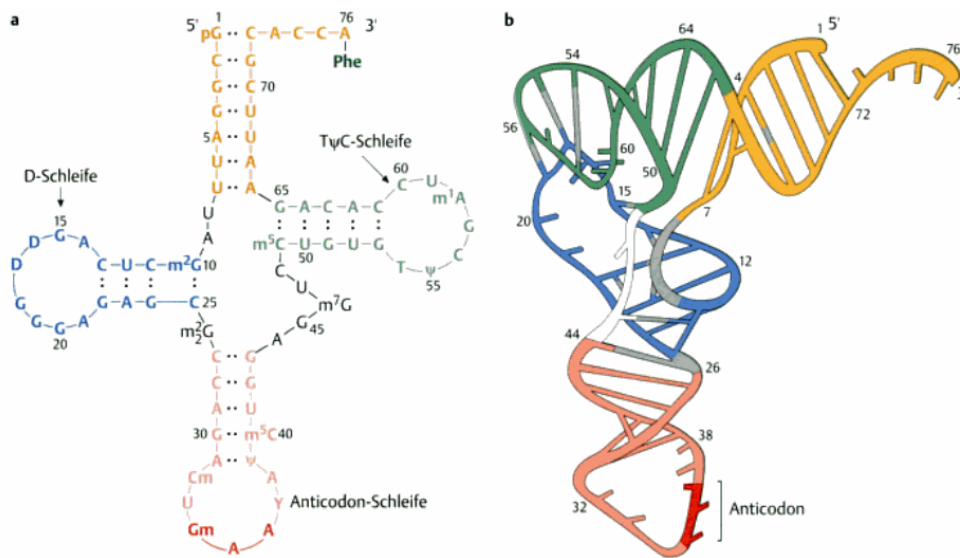


Abbildung 10 links: Kleeblattstruktur einer tRNA für Phenylalanin. Zahlreiche Basen sind chemisch modifiziert. Rechts: Schematische dreidimensionale Struktur (aus Lit.⁵²)

Aptamere

Ein weiteres Beispiel für einzelsträngige Nucleinsäuren sind Aptamere, welche sowohl aus DNA als auch aus RNA aufgebaut sein können und in der Lage sind, Moleküle spezifisch zu erkennen und zu binden. Aptamere werden in einem SELEX genannten Prozess⁵³ aus teilrandomisierten Nucleinsäure-Bibliotheken von bis zu 10^{15} unterschiedlichen Sequenzen selektiert und vervielfältigt.⁵⁴

Aptamere wurde gegen eine Vielzahl von Molekülen, Proteinen, Liganden und Oberflächen entwickelt,^{55,56} zum Beispiel gegen einzelne Nucleotide wie AMP, gegen Antibiotika, Drogen wie Cocain⁵⁷ und einzelne Aminosäuren oder Proteine wie Thrombin⁴³. Dabei werden eine verschiedene potentielle Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken-Bindungen, π - π -Interaktionen, hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen u. ä. genutzt. Die Sekundärstruktur der Aptamere und das damit generierte Muster der präsentierten Wechselwirkungen machen sie sehr spezifischen und festen Bindern und bringen sie daher als potentielle Therapeutika für verschiedene Krankheitsbilder im Gespräch. Vor einigen Jahren ist mit MacugenTM erstmals ein Aptamer-basierter Wirkstoff gegen altersabhängige Makular-Degeneration – einer Sehstörung - auf den Markt gekommen.

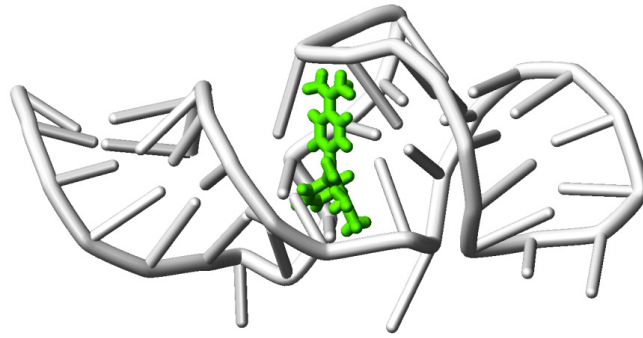


Abbildung 11: Schematisches Modell eines RNA-Aptamers (grau) gegen den Farbstoff Malachit grün (grün).⁵⁸

Katalytische Nucleinsäuren und die RNA-Welt-Hypothese

Bestimmte einzelsträngige Nucleinsäuren können nicht nur an Zielmoleküle binden, sondern auch katalytische Aktivitäten haben⁵⁹ und werden dann als Ribozyme bezeichnet. Ribozyme wurden in den Introns von mRNA entdeckt und haben u.a. die Fähigkeit, sich selbst - also ohne die Anwesenheit von Enzymen - herauszuschneiden (spleißen).⁶⁰

Das wohl am besten untersuchte Ribozym ist das Hammerhead-Ribozym (Hammerkopf-Ribozym). Dabei handelt es sich um einen katalytisch arbeitenden RNA Strang, welcher in pathogenbefallenen Zellen gefunden wurde.⁶¹ Das Hammerhead-Ribozym lagert sich an einen Substratstrang an und katalysiert die Hydrolyse einer Phosphoresterbindung (Abbildung 12).

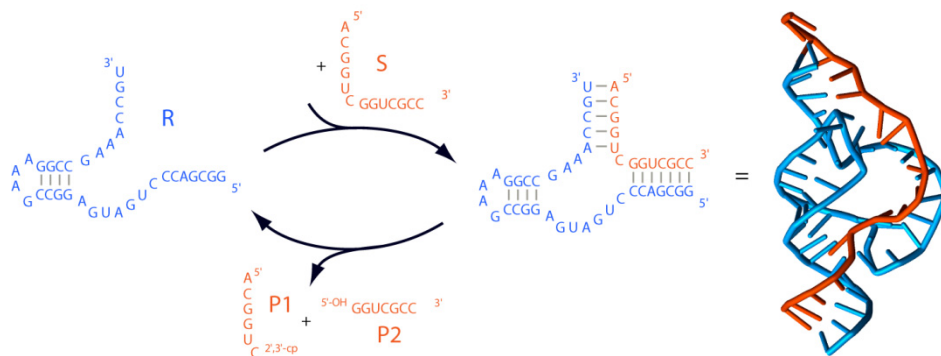


Abbildung 12: schematische Darstellung der Katalysefunktion und Struktur des Hammerhead Ribozyms (R, blau) mit Substratstrang (S, rot).⁶² Rechts: Struktur des katalytischen Komplexes.

Die Entdeckung der katalytischen Aktivität von RNA galt auch deshalb als Sensation, da sie einen ersten Beleg für die sogenannte RNA-Welt-Hypothese lieferte. Diese Hypothese besagt, dass RNA am Anfang alles Lebens auf der Erde gestanden haben könnte.⁶³ Eine Untermauerung dieser These gelang kürzlich mit einer Erklärung für die Entstehung von RNA auf der

präbiotischen Erde.⁶⁴ Für diese RNA Welt Hypothese spricht auch, dass RNA nicht nur chemische Reaktionen katalysieren,⁶⁵ sondern sich sogar selber vervielfältigen kann.^{66,67} Somit könnte RNA nicht nur der Vorläufer von DNA (als Speicherform von genetischer Information), sondern auch von Proteinen gewesen sein. Die ribosomale RNA (siehe oben) könnte so ein Überbleibsel aus der RNA Welt sein. Aber ob RNA wirklich das erste Molekül war, das Leben ermöglicht hat, oder ob vielleicht sogar ein Polymer auf der Basis eines anderen Zuckers (etwa Threose) oder ein peptidisches Rückgrat zuerst kam,⁶⁸ wird sich wohl nie mit Sicherheit beweisen können. Im Laufe der Evolution haben DNA und peptidische Enzyme ihre Vorläufer jedenfalls weitestgehend verdrängt.

1.2.6 Flexibilität von DNA und *minicircles*

B-DNA wird in der Regel als lineare Doppelhelix dargestellt, doch ist DNA längst nicht so steif, wie dieses Modell suggeriert. Die Steifigkeit von Makromolekülen wird meist durch deren Persistenzlänge (in nm oder μm) ausgedrückt. Darunter versteht man die Länge, in der die Richtung der Achse des Makromoleküls noch mit der Achsenrichtung an einem Startpunkt korreliert ist. Die longitudinale Persistenzlänge von DNA beträgt etwa 50 nm (entspricht etwa 150 Basenpaaren),⁶⁹ wie mit verschiedenen Methoden wie etwa Cryo-EM⁷⁰ belegt werden konnte; die torsionale Persistenzlänge liegt etwa bei 180 bp.⁷¹ Zwar gilt dieser Wert für die meisten Sequenzen mit mehr oder weniger statistischer Verteilung der Basenpaare, doch gibt es auch Abweichungen von diesem Wert. So sind Sequenzen bekannt, die DNA versteifen, andere Sequenzen bewirken ein „Aufweichen“ der Doppelhelix,⁷² wiederum andere Sequenzen zwingen der DNA eine Krümmung auf (z.B. *A-tracts*, s.u.).

Solche (lokalen) mechanischen Eigenschaften von DNA sind von hohem biologischem Interesse. Denn wäre DNA nicht biegsam (also streng linear), dann müsste ein Virus, um sein Erbgut in seinem Inneren unterbringen zu können, etwa 1000-mal größer sein als es der Fall ist. Das Erbgut jeder einzelnen menschlichen Zelle ist sogar über einen Meter lang. Hieran sieht man, dass die DNA in irgendeiner Form komprimiert oder aufgewickelt werden muss. Viele Viren lösen dieses Problem dadurch, dass bestimmte Proteine das virale Genom unter Energieverbrauch buchstäblich in die Proteinhülle hineinstopfen (siehe Abbildung 13 A).⁷³ Es wird angenommen, dass die dadurch gespeicherte mechanische Energie möglicherweise für die Injektion der viralen DNA in den Wirtsorganismus genutzt wird.⁷⁴ Bei Eukarioten wird die DNA erst um bestimmte Proteine (die Histone) gewickelt, und mit weiteren Gerüstproteinen schließlich sehr eng gepackt in Chromosomen angeordnet. Dadurch kann die DNA in Formen gezwungen werden, die kleiner als die Persistenzlänge der DNA sind.

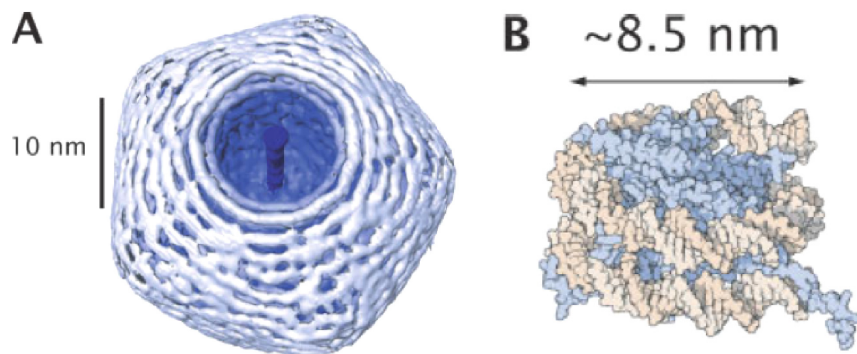


Abbildung 13 A) eine Cryo-EM-Aufnahme der DNA in einem $\epsilon 15$ Virencapsid.⁷⁵ B) Ein Nukleosom.

An diesen Beispielen wird ersichtlich, dass (lokale) mechanische Eigenschaften von großer Wichtigkeit sein können. Um Fragestellungen zum Einfluss von speziellen Sequenzen auf die lokale Krümmung und Flexibilität von DNA zu untersuchen, sind DNA-*minicircles* ein hervorragendes Testsystem.

DNA-*minicircles* bestehen aus einem Doppelstrang, der in erster Näherung in der B-Form vorliegt, und zyklisiert ist. *Minicircles*, manchmal auch Miniplasmide (engl. *miniplasmids*) genannt, sind künstlich erzeugte, bis zu wenige hundert Basenpaare große Ringe und tragen im Gegensatz zu natürlichen in Prokarioten vorkommenden ungleich größeren DNA-Plasmiden in der Regel keine genetischen Informationen. Für die Synthese von DNA-*minicircles* werden häufig intrinsisch gekrümmte DNA-Sequenzen eingesetzt, wie zum Beispiel *G-tracts* (was sich etwa mit G-Abschnitt übersetzen lässt)⁷² und *A-tracts* (siehe Kapitel 3.1.1).

1.3 Strategien für den Aufbau artifizieller Strukturen aus DNA

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben ist die potenteste Strategie zum Aufbau von Strukturen auf der Nanometerskala der *bottom up*-Ansatz. Die Evolution hat in Milliarden von Jahren Proteine als die vielseitigsten funktionellen Nanoarchitekturen entstehen lassen. Für die Planung am Reißbrett und den Aufbau von artifiziellen Strukturen eignen sich Peptide aber bislang nur sehr eingeschränkt. Das größte Problem ist dabei weniger ein synthetisches, sondern dass die endgültigen gefalteten Strukturen von größeren künstlichen Aminosäure-Sequenzen bislang nur schwer vorhersagbar sind.⁷⁶ So finden sich in der Literatur erst wenige in weiterem Sinne als Nanoarchitekturen zu bezeichnenden artifizielle Polypeptide, deren vorausgesagte Strukturen experimentell bestätigt sind.⁷⁷ Kürzlich gelang es immerhin, ein katalytisches Zentrum für eine enantioselektive Diels-Alder-Reaktion am Reißbrett zu entwerfen und so in bekannte Sekundärstruktur-Elemente einzubauen, dass ein funktionierendes, künstliches Enzym entstand.⁷⁸

DNA hingegen verhält sich wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben viel vorhersagbarer. Gibt man einen DNA-Strang bekannter Sequenz in einem geeigneten Puffer zu dem passenden Gegenstrang, so wird sich mit größter Sicherheit ein B-DNA-Doppelstrang ausbilden, dessen Struktur genau vorherbestimmt ist. Kein anderes Polymer ist zugleich so gut verstanden und programmierbar. Desweiteren ist DNA immer billiger herzustellen und mit einer Vielzahl von molekularbiologischen Enzymen manipulierbar. Eine große Bandbreite an chemischen Nukleinsäure-Analoga und chemischen Modifikationsmöglichkeiten wie Biokonjugation erweitern das Einsatzspektrum. Ein weiterer Vorteil von DNA ist, dass sie biokompatibel ist und wässrige Medien bevorzugt, weswegen auch biologische und medizinische Anwendungen der DNA-Nanotechnologie denkbar sind.

1.3.1 Migrationsstabile Kreuzungen

Wie aber kann man aus einem linearen Molekül wie DNA eine komplexe zwei- oder gar dreidimensionale Struktur ausbilden? Inspiriert von Replikationsgabeln bei der Vervielfältigung von DNA schlug Nadrian Seeman 1982 in einem theoretischen Paper vor, migrationsstabile Kreuzungen (engl. *junctions*) von DNA zu synthetisieren.⁷⁹ Normalerweise sind die Sequenzen solcher bei der homologen Rekombination von Genen auftretenden *Holliday junctions* (benannt nach Robin Holliday)⁸⁰ symmetrisch. Daraus folgt, dass die Kreuzungsstelle wandern kann, weil für jede gelöste Watson-Cricksche Interaktion eine gleichwertige Interaktion entsteht und dieser Vorgang somit energieneutral ist (vgl. Abbildung 14).

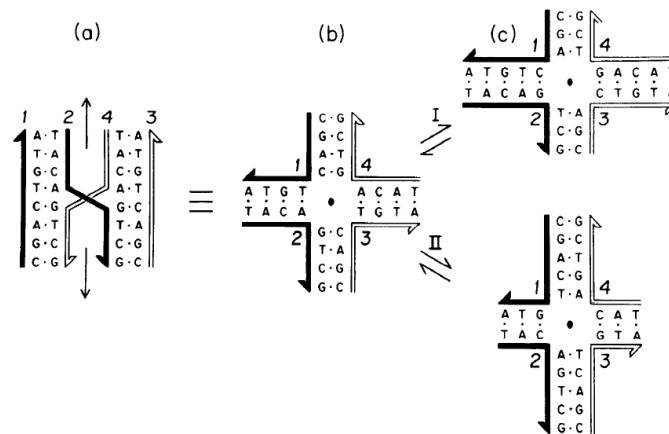


Abbildung 14: In natürlich vorkommenden Holliday junctions kann der Kreuzungspunkt aufgrund der Symmetrie der Stränge (1 und 3 bzw. 2 und 4 sind identisch) wandern. Der Punkt in der Mitte der Kreuzung in b und c symbolisiert eine zweizählige Symmetrieachse.⁷⁹

Lässt man aber nun Stränge miteinander hybridisieren, bei denen diese Symmetrie wie von Seeman vorgeschlagen gebrochen ist, ist die Anzahl der ausgebildeten Basenpaare nur dann maximal, wenn der Kreuzungspunkt an der durch die Sequenz festgelegten Stelle liegt. Das Ergebnis ist somit eine migrationsstabile Kreuzung,⁸¹ wie sie in der Natur nicht vorkommt und welche die Basis für die meisten seither publizierten DNA-Nanoarchitekturen ist (Abbildung 15).



Abbildung 15 links: eine migrationsstabile Kreuzung aus vier unterschiedlichen Strängen. Rechts: Nadrian (Ned) Seeman, der Begründer der DNA-Nanotechnologie.

Seeman schlug außerdem vor, die Enden der künstlichen Kreuzungen einzelsträngig zu verlängern. Die so entstehenden *sticky ends* könnten sich dann in vorherbestimmter Weise zu größeren Netzwerken zusammenlagern. Seeman, von Haus aus Kristallograf,⁵⁴ sah eine mögliche Anwendung in der Einlagerung von Makromolekülen wie Proteine in ein regelmäßiges dreidimensionales Netzwerk aus DNA. Dadurch hoffte er, die Strukturbestimmung von schwer zu kristallisierenden Molekülen vereinfachen zu können. Aber erst 1991 gelang es, den ersten Schritt auf dem

Weg zur Verwirklichung dieser Vision zu tun - in Form eines Würfels aus DNA (Abbildung 16).⁸² Dieser Würfel ist allerdings kein starres Objekt, sondern an den Kreuzungsstellen sehr beweglich. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass er verkippt oder sogar platt gefaltet vorliegt. Erst 27 Jahre nach der Veröffentlichung seiner Vision eines 3D-Netzwerkes gelang es durch versteifte Bauelemente endlich, ein kristallisierbares, dreidimensionales Gerüst aus DNA aufzubauen.⁸³

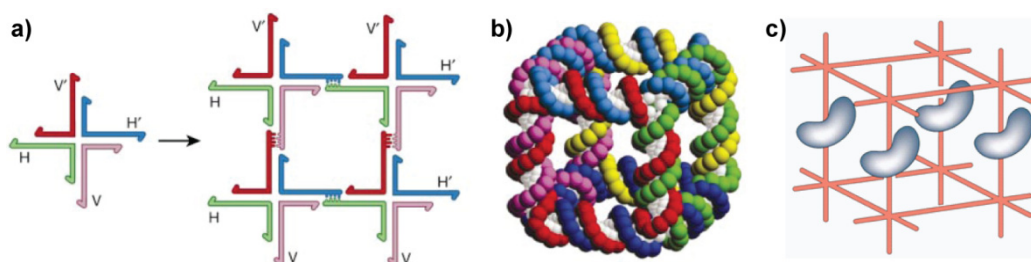


Abbildung 16 a) Eine vierarmige DNA-Kreuzung mit sticky ends lagert sich in einem mehrstufigen Prozess zu einem größeren Gebilde zusammen. b) Ein Würfel aus DNA als erstes prominentes Beispiel einer Nanoarchitektur. c) Vision eines DNA-Gerüsts zur Kristallisation von Makromolekülen.

Mit der gleichen Strategie wie der Würfel, also nur mit unversteiften Kreuzungen ist auch ein angeschnittener Oktaeder gemacht worden.⁸⁴ Die Ausbeuten dieser Strukturen lagen bei wenigen Prozent und erforderten einen sukzessiven Aufbau. Als solideste Struktur und effektivste Synthese mit unversteiften Kreuzungen darf wohl der Tetraeder aus der Gruppe um Andrew Turberfield gelten. In einem Eintopfverfahren mit annähernd quantitativen Ausbeuten wurden die Tetraeder in einem nur wenige Minuten dauernden Prozess hergestellt.⁸⁵ Diese Tetraeder waren gezielt dehn- und stauchbar⁸⁶ und wurden sogar dazu benutzt, einzelne *Cytochrom C* Moleküle einzuschließen.⁸⁷

1.3.2 Double crossovers

Die Gruppe um Seeman bemerkte, dass eindimensionale Konstrukte aus 3- und 4-armigen migrationsstabilen Kreuzungen zur Zyklisierung neigten und dass die daraus hergestellten Objekte in der Regel nicht rigide genug für den Aufbau größerer Strukturen waren. Als einen Ausweg aus diesem Dilemma schufen sie sogenannte *double crossovers* (kurz DX, englisch für doppelt gekreuzt).⁸⁸ Hierbei handelt es sich um zwei direkt nebeneinanderliegende Helices, in denen an zwei Punkten Stränge ausgetauscht werden.

Von diesen *double crossovers* gibt es verschiedene Arten (siehe Abbildung 17), für die sich folgende Kurzschreibweise eingebürgert hat: Der erste Buchstabe steht für die Anzahl der Kreuzungen. D steht für einen doppelten Austausch. Laufen die austauschenden Stränge nach dem Austausch in die gleiche Richtung weiter, liegt eine parallele (P) Kreuzung vor, wenn nicht, ist es ein antipa-

ralleler *crossover* (A). Der dritte Buchstabe bezeichnet die Anzahl der halben Helixwindungen zwischen den Kreuzungspunkten. O steht für *odd* (ungerade), E für *even* (gerade Anzahl, meist 2).

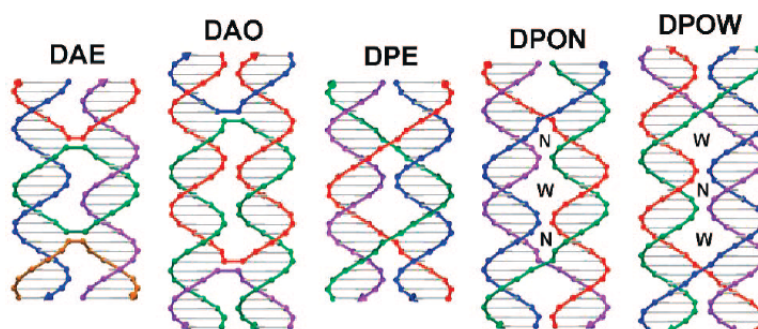


Abbildung 17: Die verschiedenen double crossover-Topologien (Erklärung der Kurzschreibweise im Text, aus Lit.⁸⁹).

Double crossovers stellen nicht die einzigen Möglichkeiten dar, parallele Stränge miteinander zu verbinden. Weitere Motive sind beispielsweise dreifache Kreuzungen (*triple crossovers*), oder auch *paranemic crossovers*.⁹⁰ Bei *paranemic crossovers* tauschen die beide Stränge an jedem möglichen Kreuzungspunkt aus (Abbildung 118 a). Solch eine Struktur kann aus einem einzelnen Strang aufgebaut werden und somit enzymatisch repliziert werden,⁹¹ und war nach Einklonieren in *E.coli* die erste *in vivo* erzeugte Nanoarchitektur.⁹²

1.3.3 DNA-tiles für zweidimensionale Architekturen

Verlängert man wie schon bei einfachen Kreuzungen in *double crossover*-Motiven einzelne DNA-Stränge um einige Nukleotide, entstehen *sticky ends*. Dadurch kann ein *double crossover*-Element gleich einer Kachel (eng. *tile*) als Bauelement für ein- und zweidimensionale Netzwerke dienen. Eric Winfree schlug vor, durch geschickte Auswahl von unterschiedlichen *sticky ends* zweidimensionale Kristalle über algorithmisch programmierbare Selbstorganisation zu erzeugen.⁹³ Durch kompliziertere Algorithmen eignen sich DNA-Kacheln sogar, um mathematische Aufgaben zu lösen (siehe Abschnitt 1.4.3).⁹⁴

Die Versteifung von DNA durch *double crossovers* wurde auch ausgenutzt, um Kreuzungen in größeren Strukturen stabiler zu machen. So wurden beispielsweise für eine versteifte Version eines Würfels⁹⁵ sowie für Tetraeder und Dodecaeder-Buckybälle das *three point star*-Motiv verwendet.⁹⁶

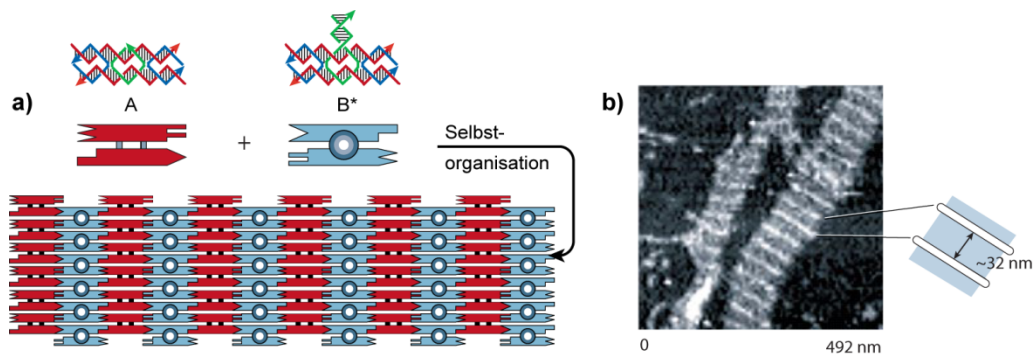


Abbildung 18: Algorithmischer Selbstaufbau von zweidimensionalen Kristallen. a) Die beiden double crossover-tiles A und B* (in unterschiedlichen Repräsentationen gezeigt) sind zueinander komplementär (angedeutet durch geometrische Muster an den Enden). b) Durch Selbstorganisation bilden sie einen 2D-Kristall aus, in dem sie sich regelmäßig abwechseln. Das Streifenmuster auf der rasterkraftmikroskopischen Aufnahme kommt von einer in B* eingebauten Haarnadel-Schleife, die aus der Ebene des Kristalls herausragt (modifiziert Abb. nach Lit.⁹⁷).

1.3.4 DNA-Origami

Das wohl vielseitigste und robusteste Konzept aus dem Feld der DNA-Nanoarchitekturen baut auf einen sehr langen DNA-Einzelstrang als Templat für die Ausbildung einer komplexen Struktur auf. Dieses Konzept stammt von John Reif⁹⁸ und Hao Yan⁹⁹ und sollte zunächst zur Anordnung von *tiles* dienen. William Shih griff diese Idee auf und faltete den Einzelstrang hauptsächlich über intramolekulare Paarungen zu einem Oktaeder.¹⁰⁰ Paul Rothemund gelang es dann, das Konzept auf beliebige zweidimensionale Strukturen zu erweitern (Abbildung 19). Hierzu wird der Einzelstrang (von Rothemund Gerüststrang (engl. *scaffold strand* genannt) mit Hilfe von bis zu 250 so genannten *staple strands* (engl. für Heftklammer Stränge) in die gewünschte Form gefaltet. Wie auch bei den *DX tiles* entstehen dabei antiparallele Kreuzungen, wobei der Gerüststrang auch in Schleifen gezwungen werden kann. Rothemund prägte für diese Technik den Namen „DNA-Origami“, welcher sich in der Fachliteratur auch durchgesetzt hat. Von der Gruppe um Shih ist das Konzept des DNA-Origami schließlich in die dritte Dimension erweitert worden.^{101,102}

Der Vorteil von Origami zu den *tiles* ist dabei, dass die Faltung des Gerüststranges ein intramolekularer Prozess ist, und somit entropisch und sterisch gegenüber konkurrierenden intermolekularen Prozessen begünstigt ist. Dadurch toleriert Origami auch einen deutlichen Überschuss an *staple strands* (Rothemund gab einen 10 bis 100-fachen Überschuss hinzu), während bei den *tiles* die molaren Verhältnisse der einzelnen Stränge genauestens eingehalten werden müssen. Darüber hinaus scheint die Reinheit der Oligonukleotide von geringer Bedeutung zu sein; Rothemund verwendete unaufgereinigte Oligonukleotide, während das Standardverfahren für *tiles* PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) -aufgereinigte Oligonukleotide erfordert.

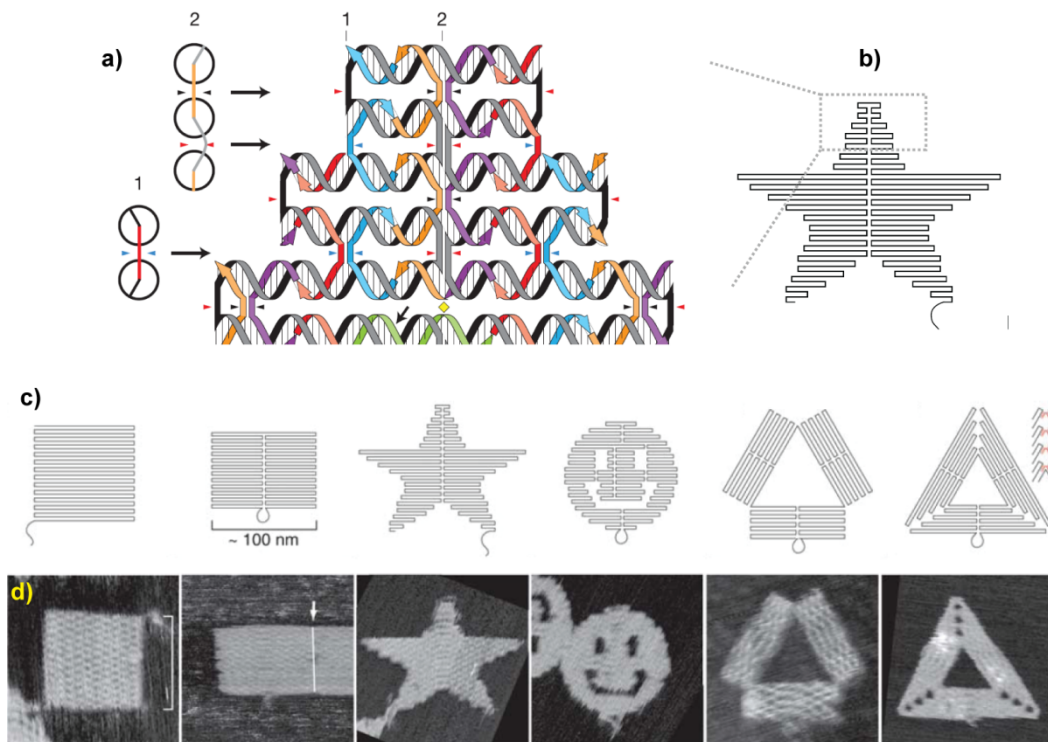


Abbildung 19: DNA-Origami nach Rothemund.¹⁰³⁰³

a) Ein einzelsträngiger DNA-Gerüststrang (schwarz) wird mithilfe kürzerer staple strands in Windungen gezwungen. Links ist eine schematische Darstellung dreier Kreuzungen in Blickrichtung der Helixachsen zu sehen. b) Darstellung des Faltungsmusters eines Sterne. c) Andere Beispiele für zweidimensionales 2D-Origami, darunter AFM-Bilder der jeweiligen Strukturen nach Hybridisierung (d).

1.3.5 Bundles und Nanoröhren

Bei dem Design von DNA-Architekturen muss immer die Helizität der DNA berücksichtigt werden (vgl. auch Abbildung 19 a) Bei den zweidimensionalen DX *tiles* und Origami sind die Verbindungsstellen zu den oberhalb bzw. unterhalb liegenden Helices jeweils Vielfache der halben Helixwindung voneinander entfernt, also meist 5 bzw. 6 Basen. Verlegt man die Kreuzungsstellen um wenige Basen, ist die entstehende Struktur nicht mehr planar. Verknüpft man sechs Helices in einem Winkel von 120° gegenüber der Ebene der benachbarten Helices miteinander, so erhält man ein dreidimensionales Bündel (engl. *bundle*) aus 6 Helices, ein *6-helix bundle*. Solche *6-helix bundles* wurden zunächst mit *double crossovers*,¹⁰⁴ dann auch mit der Origami-Technik aus einem langen Einzelstrang gefertigt.¹⁰⁵ Durch die Verknüpfung von 6 Strängen miteinander stieg die Persistenzlänge gegenüber einem einfachen Doppelstrang auf das 20-fache an. Röhren wurden zwar schon vorher von LaBean mithilfe von *tiles* erzeugt,¹⁰⁶ doch erlaubt das Konzept der *bundles* durch die gezielte Verlegung der Kreuzungspunkte mit den Nachbarhelices eine flexible

Steuerung der Anzahl der Helices, aus denen die *nanotubes* (engl. für Nanoröhren) bestehen. So wurden auch *8-helix bundles*,¹⁰⁷ und sogar *bundles* in einstellbaren Größen bis *20-helix bundles* (Siehe Abbildung 20) realisiert.¹⁰⁸

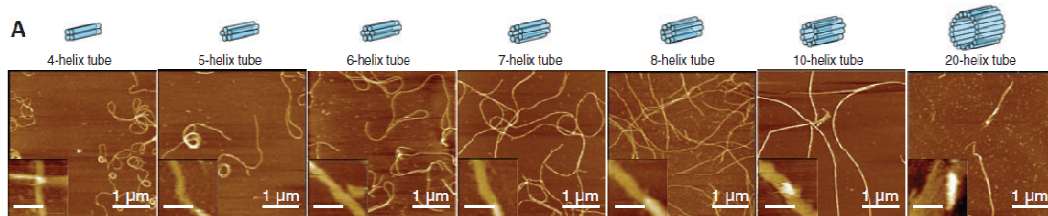


Abbildung 20: Verknüpft man parallel verlaufende DNA-Helices miteinander, entstehen Nanoröhren mit variablem Durchmesser.¹⁰⁸

1.3.6 Dreidimensionales DNA-Origami

Der wohl vielseitigste Ansatz für den Aufbau von finiten dreidimensionalen Strukturen wurde kürzlich in der Gruppe von William Shih entwickelt.^{101,102,105,109-111} Shih's Ansatz ist eine Kombination der Konzepte von *6-helix bundles* und von DNA-Origami. Wie in Rothemunds Origami dient ein langer Einzelstrang als Gerüst, die Faltung verläuft durch geschickte Verlegung der Kreuzungspunkte aber nicht zwei- sondern dreidimensional. Im Querschnitt ergeben die durch *staple strands* gefalteten Strukturen ein honigwabenartiges Muster, das den Strukturen eine hohe Steifigkeit verleiht. Beispiele von synthetisierten Strukturen sind in Abbildung 21 abgebildet.

Eine weitere dreidimensionale DNA-Origami-Struktur, wengleich aus flachen Bauelementen, ist eine Nano-Kiste, deren Deckel durch Zugabe eines Signalstranges geöffnet werden kann.¹¹²

Aus Platzgründen kann nicht die ganze Breite an DNA-Strukturen dargestellt werden, daher sei an dieser Stelle noch auf Übersichtsartikel hingewiesen, die DNA als Baumaterial zum Gegenstand haben.¹¹³⁻¹¹⁹

1.4 Funktionelle Systeme aus DNA

1.4.1 Maschinen und Motoren

Auf Basis von DNA sind nicht nur Architekturen entstanden, sondern auch eine große Vielzahl von molekularen Maschinen und Motoren.¹²⁰⁻¹²³ Trotz der großen Zahl von Beispielen beruht die Mehrzahl von ihnen auf nur drei Prinzipien (siehe Abbildung 22).¹²⁴

- 1) Hybridisierung: Es werden die üblichen Watson-Crick-Basenpaarungen ausgenutzt, um aus zwei Einzelsträngen einen Doppelstrang zu machen.
- 2) *Toehold overhang*: (einzelnsträngige Überhänge). Ein Strang eines Doppelstranges ist um einige Nukleotide verlängert (**b**). Dadurch entsteht ein *sticky end* welches aber nicht zur Hybridisierung mit einem anderen *sticky end* benützt wird. Stattdessen gibt man den Gegenstrang des längeren Stranges hinzu (**a-b**) und der kürzere Strang wird freigesetzt.
- 3) Entropiegetriebene Strangverdrängung: Besteht ein Doppelstrang aus einem langen Strang, der mit zwei kürzeren hybridisiert ist, so kann ein langer Gegenstrang (**a₁-b-c₁**) die beiden kürzeren Stränge verdrängen, da bei der Freisetzung zweier Stränge durch nur einen Strang die Entropie des Systems steigt. Das kann sogar dann noch funktionieren, wenn dabei ein paar Basenpaarungen weniger als im Ausgangszustand.

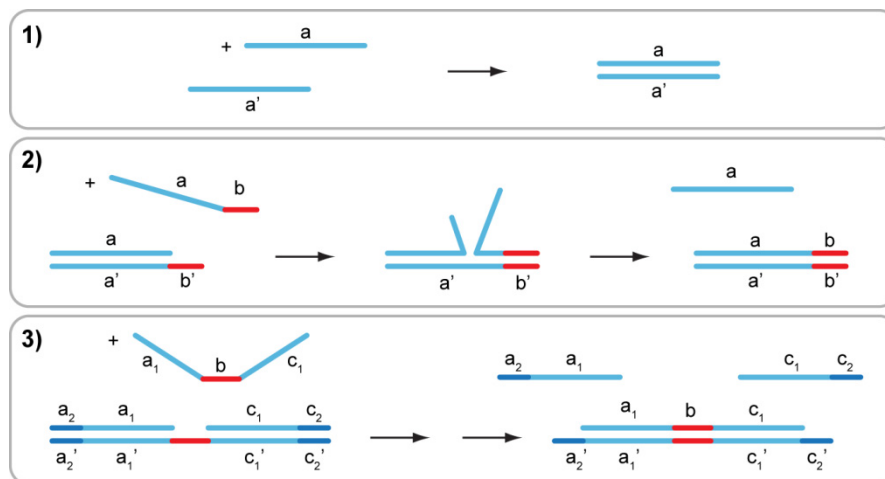


Abbildung 22: 1) Hybridisierung, 2) *toehold overhang* (b) Strangverdrängung und 3) entropiegetriebene Strangverdrängung

Diese Prinzipien ausnutzend sind einige Maschinen oder *walker* (Fußgänger) entstanden, welche entfernt an die Fortbewegung eines Myosins an einem Aktin-Filament erinnern. Das erste Bei-

spiel eines DNA-*walkers* erforderte noch die sukzessive Zugabe von Treibstoff-Strängen (*fuel strands*),¹²⁵ eine verbesserte Version kam ohne einen Experimentator aus.¹²⁶ Kürzlich gelang es sogar, eine Art Fließband zu erstellen, auf dem an einen DNA-*walker* vorherbestimmte Nanopartikel angehängt wurden.¹²⁷

Eine auf *nicking enzymes* (Enzyme, die nur einen Strang eines Doppelstranges schneiden) beruhende Maschine wurde von Turberfield vorgestellt.¹²⁸ In diesem Beispiel wird der Pfad des *walkers* gleichsam aufgefressen, so dass Bewegung nur nach vorne möglich ist. Ähnlich, nur statt mit *nicking enzymes* mit einem Ribozym, arbeitet eine spinnenartige Maschine, die ebenfalls verkürzte Einzelstränge auf ihren Pfad hinterlässt und sich daher nicht zurück bewegen kann.¹²⁹

Neben den auf B-DNA beruhenden Maschinen gibt es auch solche, die beispielsweise den B-Z-Form-Übergang von DNA oder die Faltung von G-Quadruplexen¹³⁰ oder i-Motiven nutzen. Im letzteren Fall wird die (reversible) Konformationsänderung eines C-reichen Stranges durch die Änderung des pH-Wertes induziert und dadurch beispielsweise Fluoreszenz ein- und ausgeschaltet.¹³¹ Die Konformationsänderung kann auch dazu ausgenutzt werden, eine hydrophobe Gruppe zu präsentieren und dadurch eine hydrophile Oberfläche in eine hydrophobe umzuwandeln.¹³² Um die Schaltbarkeit von i-Motiven auszunutzen, muss man aber nicht unbedingt direkt OH⁻ oder H⁺-Ionen zugeben, sondern kann diese auch lichtgesteuert *in situ* erzeugen. Dadurch erhält man einen lichtgetriebenen Schalter.¹³³

1.4.2 Nukleinsäure-basierte Sensoren

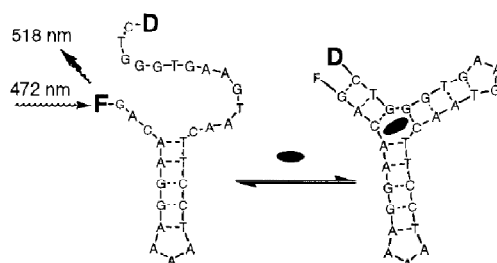


Abbildung 23: Ein Kokain-Aptamer-basiertes System wurde an seinen Enden mit einem FRET-Paar modifiziert (F= Fluorophor, D=Quencher-Molekül). Ohne die Anwesenheit von Kokain sind die Enden des FRET-Paares frei beweglich und somit ist Fluoreszenz bei 518 nm sichtbar. Bei der Zugabe von Kokain bindet das Kokain-Molekül an das Aptamer, wodurch D und F zusammengeführt werden und die Fluoreszenz ausgeschaltet wird.

Nukleinsäuren sind in letzter Zeit immer mehr als molekulare Sensoren für eine Vielzahl von Molekülen, für pH-Wert-Änderungen, für Temperatur¹³⁴ und viele weitere Anwendungen entwickelt worden.¹³⁵ Funktionsprinzip für viele dieser Sensoren ist eine durch einen chemischen oder physikalischen Reiz hervorgerufene Hybridisierungen oder Konformationsänderung, welche

dann wiederum in ein auslesbares Signal verwandelt wird. Als Auslesesignal kommen etwa Fluorophor-Quencher-Paare im FRET-Prozess (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) zum Einsatz. Sind Fluorophor und Quencher räumlich weit voneinander entfernt, ist Fluoreszenz sichtbar, sind die beiden Paare nah beieinander, wird die Fluoreszenz vom Quencher unterdrückt. Als Beispiel ist in Abbildung 23 die Funktionsweise von einem Kokain-Sensor dargestellt.

1.4.3 DNA-Computing

Für spezielle mathematische Probleme kann die Selbstorganisation von DNA als eine Art Computer verwendet werden. Das erste mit DNA angegangene Problem war das des *Handlungsreisenden* oder *hamiltonian path problem*, ein Problem der Graphentheorie.¹³⁶ Hierzu wurden Oligonukleotide so designt, dass verschiedene Stränge miteinander hybridisieren können und die Reihenfolge der hybridisierten Stränge dem Weg des Handlungsreisenden entspricht. Das Auslesen der Lösung des Problems erfordert aber Gelelektrophorese und PCR und ist somit sehr umständlich. Des Weiteren ist der Graph auf nur sechs Knotenpunkte beschränkt worden. Auch ein Schachproblem, nämlich die Positionierung von Springern auf einem Spielfeld, ohne dass die Springer sich schlagen, ist auf ähnliche Art mit Hilfe von RNA gelöst worden.¹³⁷

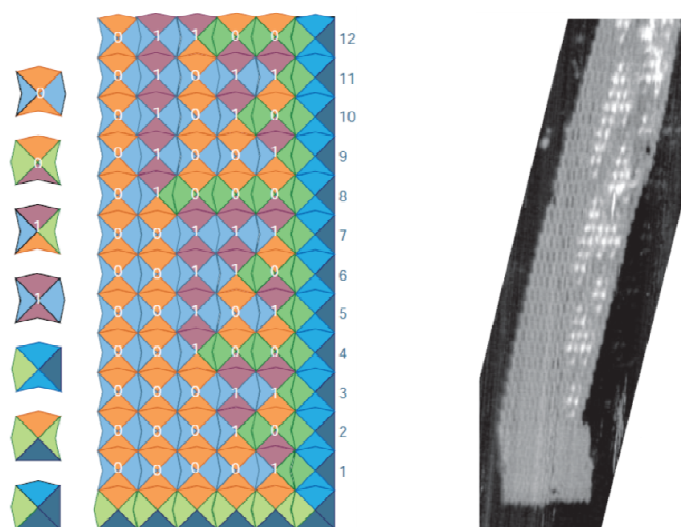


Abbildung 24: Binäres Zählen mit DNA-tiles. Links: sieben verschiedene DNA-tiles mit sticky ends sind so beschaffen, dass nur bestimmte Seiten der tiles miteinander hybridisieren können, was durch die Farben der Flächen symbolisiert ist. Die beiden tiles, die für 1 codieren haben eine aus der Ebene herausragende Haarnadel-Struktur. Rechts: AFM-Bild von an einem DNA-Origami-Rechteck gewachsenen tiles.⁹⁴

Mit einem auf einem Desoxyriboszym basierenden System konnte ein DNA-Computer gegen einen Experimentator im Drei-Gewinnt-Spiel (engl. *tic-tac-toe*) immer zumindest ein Unentschieden erreichen.¹³⁸ Die einzelnen Spielzüge bestanden in der Zugabe von Mg^{2+} zu den einzelnen Kompartimenten des Spielfelds, Entscheidungen des Automaten wurden in Form eines Fluoreszenzsignals ausgegeben.

Eric Winfree hat das Konzept der algorithmischen Selbstorganisation von DNA-*tiles* weiterentwickelt und ein System mit einem "Keim" (*seed*), bestehend aus einem DNA-Origami-Rechteck mit *sticky ends* an einer Seite geschaffen. An diesem Keim konnten nun geeignete *tiles* hybridisieren, so dass ein Binärcode entstand (siehe Abbildung 24).⁹⁴

Experimentell realisierten DNA-*computing*-Beispielen ist gemein, dass die Probleme und Operationen vom Experimentator genau geplant sein müssen. Allgemeine oder gar praxisrelevante Problemlösungen sind von DNA-Computern nicht zu erwarten, wenn nicht Revolutionen in den Schreib- und Auslesevorgängen sowie in der Fehlererkennung und Behebung bevorstehen. Daher gilt es als unwahrscheinlich, dass DNA in nächster Zukunft dem Silizium-basierten Rechnen ernsthafte Konkurrenz bieten wird.

1.4.4 DNA als elektrischer Leiter

Aufgrund der geringen Abmessungen von DNA wäre es für elektronische Anwendungen reizvoll, DNA als elektrischen Leiter verwenden zu können. Doch ist bislang noch umstritten, ob und wie gut DNA selbst elektrischen Strom leiten kann, besonders über längere Strecken hinweg. Ein vielversprechender Ansatz ist daher, DNA als Gerüstmaterial einzusetzen, an ihr Metalle abzuscheiden und so einen dünnen Nanodraht zu erzeugen. Hierzu bedient man sich einer alten Technik aus der Schwarzweißfotografie. Ein in den DNA-Doppelstrang eingebautes Reduktionsmittel, beispielsweise ein Aldehyd, wird bei Zugabe einer Silberionenlösung zur Säure oxidiert und es entstehen an der DNA Silberkeime, die durch Zugabe von Tollens Reagenz entwickelt werden und die DNA so mit einem Silbermantel umgeben.¹³⁹

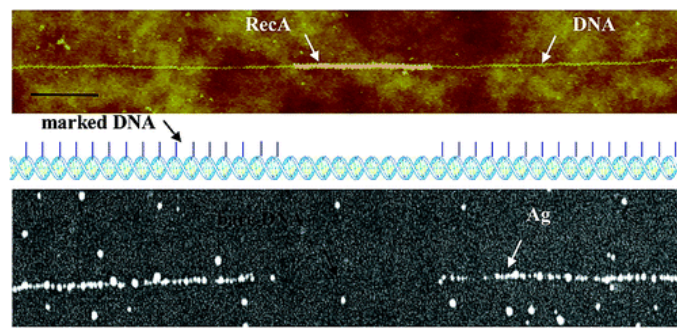


Abbildung 25: Die Abscheidung von Silber an einem Templat aus DNA. Die DNA ist links und rechts mit Aldehyd Gruppen modifiziert, in der Mitte sind keine Aldehyde. Oben ist ein AFM-Bild, in dem der nichtfunktionalisierte Bereich der DNA mit einem RecA-Protein-Komplex sichtbar gemacht wurde, unten eine elektronenmikroskopische Aufnahme nach der Silberabscheidung (Silber erscheint hell).¹³⁹

Bei der Reduktion von Silberionen durch Aldehyd werden jedoch nur 2 Elektronen frei, so dass nur ein Ag_2 Cluster entstehen kann, der selbst aber noch nicht stabil ist. Erst Ag_4 ist ein stabiles Cluster. Enthält die DNA daher als Reduktionsmittel zwei Aldehydgruppen in nächster Nachbarschaft, bilden sich Silberkeime mit höherer Effizienz.¹⁴⁰

1.5 Dervan-Polyamide

Oben wurden Beispiele beschrieben, wie maßgeschneiderte (meist einzelsträngige) DNA oder RNA an andere Moleküle binden kann (Abschnitte 1.2.5 und 1.4.2). Kehrt man die Perspektive um, kann man genauso gut davon sprechen, dass Moleküle an DNA binden. DNA liegt jedoch natürlicherweise als B-DNA-Doppelstrang vor und daher ist es eine Herausforderung, solch einen Doppelstrang sequenzspezifisch zu adressieren. Zwar gibt es auch eine Vielzahl von Proteinen, die doppelsträngige DNA sequenzspezifisch erkennen können (beispielsweise Restriktionsenzyme), doch sind diese nicht für alle beliebigen Sequenzen erhältlich und nur durch hohen Aufwand herzustellen. Auch die im Abschnitt 1.2.2 besprochenen Tripelhelices können nicht mit beliebigen Sequenzen gebildet werden, denn der dritte Strang erkennt nur Purin-Basen.

Ein wirklich modulares und nahezu universelles System, welches B-DNA spezifisch und sehr fest binden kann sind hingegen die DNA-bindenden Polyamide aus nicht-proteinogenen, stickstoffhaltigen, heterozyklischen Aminosäuren. Diese wurden maßgeblich in der Gruppe von Peter Dervan am California Institute of Technology (Pasadena, USA) entwickelt, und sollen der Einfachheit halber im Folgenden kurz „Dervan-Polyamide“ genannt werden.

1.5.1 Entwicklung

Den Anstoß zur Entwicklung der Dervan-Polyamide lieferten die beiden Naturstoffe Netropsin und Distamycin, welche an DNA binden.

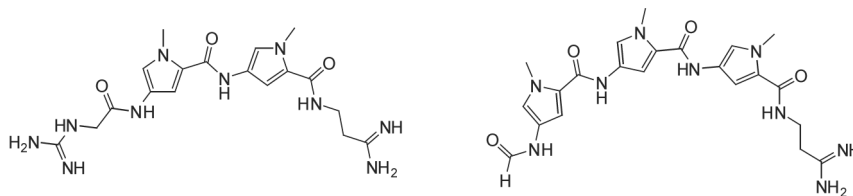


Abbildung 26: Netropsin (links) und Distamycin (rechts)

Die röntgenografische Untersuchung der Kristallstruktur eines (1:1)-Komplexes zeigte, dass Distamycin in der *minor groove* von T-A-reichen Sequenzen bindet,¹⁴¹ es fanden sich aber auch (2:1)-Komplexe (siehe Abbildung 27).

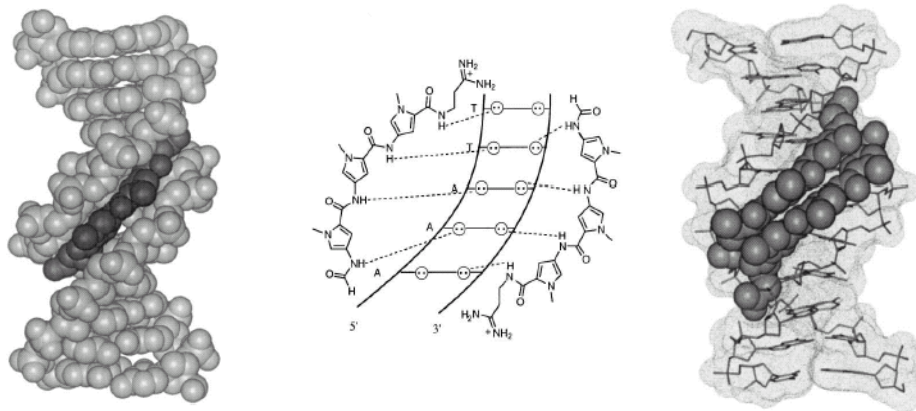


Abbildung 27: Kristallstruktur eines einfachen Netropsin-DNA-Komplexes (1:1, links) und eines 2:1 Distamycin-Komplexes (rechts). In der Mitte ist die Erkennung der Sequenz durch Wasserstoffbrückenbindungen dargestellt. Der Betrachter schaut auf die kleine Furche der aufgewundenen DNA-Helix. An den Nukleobasen sind die freien Elektronenpaare der Basen als Kreise dargestellt (Abb. aus Lit.¹⁴²)

Letztere Entdeckung, legte den Schluss nahe, dass die Assoziation durch die Verknüpfung zweier Polyamide durch γ -Aminobuttersäure (GABA) gestärkt werden könnte.¹⁴³ Durch Zurückfallen der GABA-Schleife falten sich die Polyamide unter Ausnutzung von π - π Wechselwirkungen so, dass jeweils zwei der Heterozyklen parallel übereinander zu liegen kommen und eine sichelförmige Struktur entsteht. Ein solcher Komplex hat eine etwa 300-fach höhere Affinität zu DNA als zwei nicht miteinander verbundene Polyamide, weshalb für synthetische Polyamide fast nur noch antiparallele Haarnadel-Polyamide wie jenes in Abbildung 28 zum Einsatz kommen.

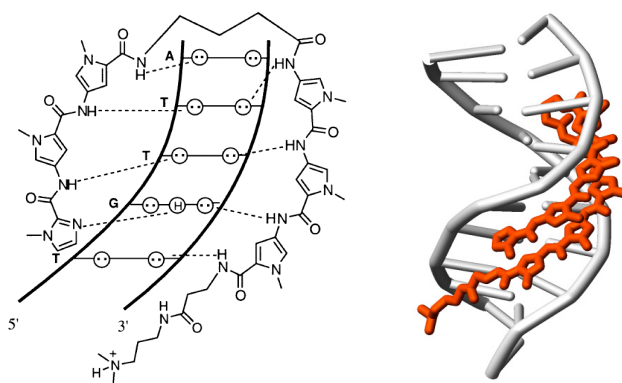


Abbildung 28: Komplex einer Polyamid-Haarnadel mit DNA. Links: eine schematische Darstellung des Komplexes. Die letzte Einheit am C-Terminus ist Imidazol. Das Paar Py/Im erkennt selektiv C/G. Rechts: Computermodell eines Dervan-Polyamids (rot).

Da Polyamide auf Pyrrol-Basis wie das Distamycin jedoch nur an T-A-reiche Sequenzen binden wurde nach Wegen gesucht, alle Basenpaarungen spezifisch erkennen zu können. Als erster Schritt wurde ein einziges Atom im Heterozyklus ausgetauscht: Man ersetzte Pyrrol (Py) durch Imidazol (Im). So gelang erstmalig die Erkennung des Basenpaares C-G, da der zweite Stickstoff des Imidazol-Heterozyklus eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem ungepaarten Wasserstoff der Aminogruppe des Guanins auszubilden vermag (siehe Abbildung 28 links).¹⁴⁴

Durch die Einführung des Imidazols ins System der Dervan-Polyamide war nun die Unterscheidung des Basenpaares C-G (erkannt von Py/Im) von G-C (erkannt durch Im/Py) möglich. Die letzte Hürde, um alle vier möglichen Basenpaarungen spezifisch ablesen zu können, bestand nun darin, A-T von T-A unterscheiden zu können, wozu das symmetrische Paar Py/Py nicht in der Lage ist. Diese Lücke im System schließt das Hydroxypyrrol (Hp),¹⁴⁵ weil die Hydroxylgruppe eine Wasserstoffbrücke mit O2 vom Thymidin ausbilden kann, aber gleichzeitig am Adenin mit dem freien Elektronenpaar an N3 sterisch kollidiert. Dadurch ist die Erkennung des richtigen Basenpaares (engl. *match*) um einen Faktor 10 stärker als die des falschen (*mismatch*).

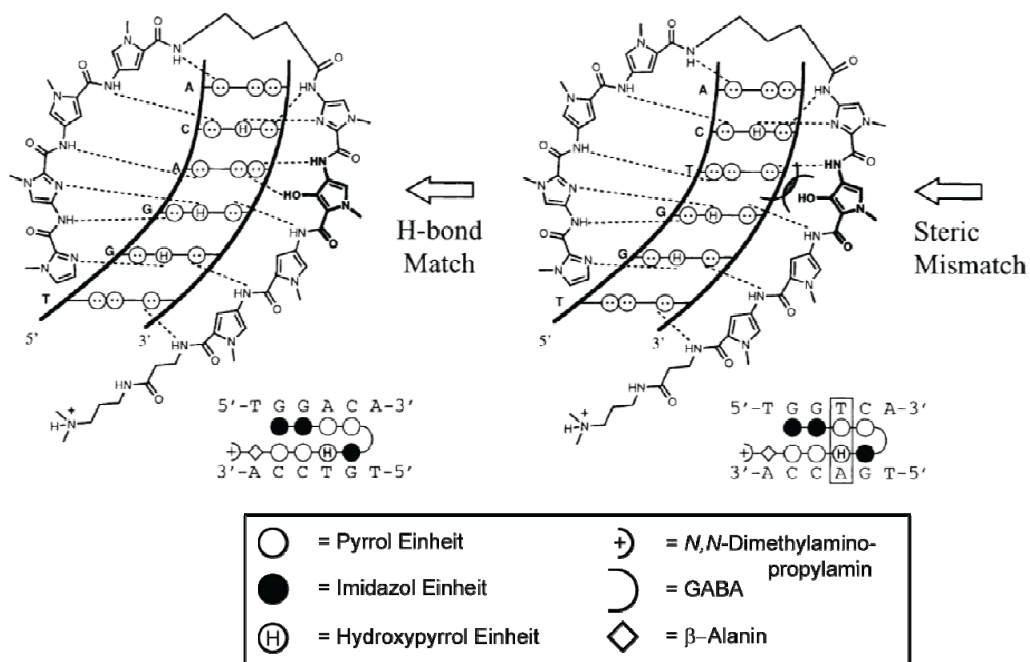


Abbildung 29: Ein Dervan-Polyamid mit Hydroxypyrrol (fett gedruckt). Links ist die DNA-Sequenz passend zum Polyamid (match-Fall), rechts passt sie nicht (mismatch-Fall). Bei der Darstellung von Polyamiden hat sich die die Piktogrammschreibweise (unten) durchgesetzt.

1.5.2 Die Paarungsregeln für Dervan-Polyamide

Die drei Bausteine (Py, Im und Hp) erlauben es nun prinzipiell, Dervan-Polyamide für praktisch jede erdenkliche DNA-Sequenz zu synthetisieren. Die Dissoziationskonstanten sind im Vergleich zu anderen kleinen synthetischen Molekülen (*small molecules*) sehr niedrig. Sie liegen für Haarnadel-Polyamide mit sechs Heterozyklen bei 10^{-7} - 10^{-8} M,¹⁴⁶ für Polyamide mit 8 oder 10 Heterozyklen im niedrigen nanomolaren oder gar picomolaren Bereich. Dervan-Polyamide haften also sehr fest an DNA, weshalb man bildlich von einem sequenzspezifischen Kleber für DNA sprechen könnte.

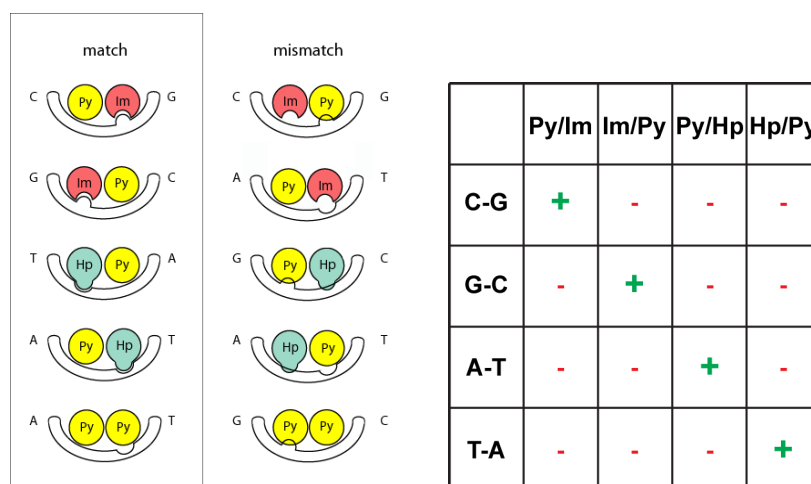


Abbildung 30: Die vollständigen Auswahlregeln zur sequenzspezifischen Erkennung von DNA durch Dervan-Polyamide. In dem linken Piktogramm ist die die kleine Furche der DNA und zwei daran gebundene Polyamid-Bausteine im Querschnitt dargestellt. Kleine Erhebungen und Vertiefungen deuten Wasserstoffbrücken Donoren bzw. Akzeptoren an. Im match-Fall passen die Polyamid Monomere zum jeweiligen DNA-Basenpaar, im mismatch-Fall kommt es zu Abstoßungen. Das symmetrische Paar Py/Py toleriert sowohl T-A als auch A-T, nicht jedoch ein G-C-Paar. In der rechten Tabelle ist das Erkennungsschema der Polyamide gezeigt. Ein Plus steht für einen match-Fall, ein Minus für den mismatch-Fall.

1.5.3 Anwendungen von Dervan-Polyamiden

Eine Anwendung fanden Dervan-Polyamide beispielsweise als sequenzspezifische Fluoreszenzmarker.^{147,148} Konjugate aus Polyamiden und einem Fluorophor zeigten in Abwesenheit von DNA eine sehr geringe Fluoreszenz, bei Zugabe von doppelsträngiger DNA mit der entsprechenden Bindestelle stieg die Fluoreszenz sprunghaft an.

Wegen der hohen biologischen und potentiellen medizinischen Relevanz ist es ein sehr vielversprechendes Ziel, mithilfe von Dervan-Polyamiden Genregulation zu betreiben. In der Tat ge-

lang es durch zwei Dervan-Polyamide zwei Bindestellen für Transkriptionsfaktoren zu blockieren, die für die Replikation von HIV wichtig sind.¹⁴⁹ Somit konnte in menschlichen Lymphozyten die Virusreplikation um über 99% unterdrückt werden, ohne dass dabei Zelltoxizität festgestellt werden konnte. In einer anderen Studie gelang durch zwei synthetische Polyamide auch eine Aktivierung der Genexpression, indem natürliche Transkriptionsaktivatoren nachgeahmt wurden.¹⁵⁰

Zeitgleich zu den eigenen Arbeiten wurde die Positionierung von Proteinen auf einem DNA-Gitter mithilfe von Dervan-Polyamiden berichtet.^{151,152}

1.5.4 Limitierungen von Dervan-Polyamiden

Um im genomischen Kontext immer noch spezifische Sequenzen adressieren zu können, müssten rechnerisch 16-17 Basenpaare erkannt werden. Doch kann dieser Sequenzraum mit Dervan-Polyamiden heute noch nicht adressiert werden. Zählt man die T-A-Präferenzen der GABA-Schleife und des β -Alanin-Schwanzes der Dervan-Polyamide der Erkennungssequenz hinzu, können maximal 7-8 Basenpaare erkannt werden. Zwar sollte es synthetisch möglich sein, ein Polyamid mit über 30 Heterozyklen aufzubauen, doch schon die Verlängerung von 8 auf 10 Heterozyklen brachte keine Zunahme der Affinität mehr,¹⁵³ während die Verlängerung von 6 auf 8 Heterozyklen die Affinität noch um eine Größenordnung verbesserte. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass bei Polyamiden aus über 8 Heterozyklen der Energiegewinn aus zusätzlichen Wechselwirkungen mit der DNA durch eine Überkrümmung der DNA nivelliert wird.¹⁵³ Des Weiteren wird eine höhere Affinität einer Wechselwirkung meist durch eine geringere Selektivität erkauft, so dass es zu fehlerhafter Erkennung kommen kann.¹⁵⁴

Ein weiteres Problem ist, dass - vermutlich aufgrund der sequenzabhängigen Mikrostruktur - nur geschätzte 50% aller 7-mer-Sequenzen adressierbar sind. Auch ist in Eukarioten die DNA um ein Chromatingerüst gerollt (vgl. Abbildung 13) und somit schwer zugänglich.

Vor einer weiteren Verwendung in der Medizin muss die zelluläre Aufnahme und besonders der Transport in den Zellkern besser verstanden werden, da Dervan-Polyamide scheinbar nur bis ins Zellplasma vordringen.¹⁴² Trotz aller Schwierigkeiten sind Dervan-Polyamide aber dennoch eines der am vielseitigsten und am besten verstandenen Systeme zur molekularen Erkennung doppelsträngiger DNA.

1.5.5 Synthese

Die Synthese der Dervan-Polyamide erfolgt üblicherweise in einer Festphasensynthese, nur bei größeren Ansätzen auch in Lösung.¹⁵⁵ Bei diesem von Merrifield in den 60er Jahren entwickelten Verfahren zur Synthese von Polypeptiden¹⁵⁶ wird die Synthese in sich wiederholenden Schritten

an einem festen, unlöslichen Material durchgeführt, welches unterschiedlich funktionalisiert sein kann.

Es haben sich zwei Strategien mit temporären Schutzgruppen für Amine etabliert: die *tert*-Butoxycarbonyl (Boc)- und die Fluorenyl-9-methoxycarbonyl—Strategie (Fmoc-Strategie).

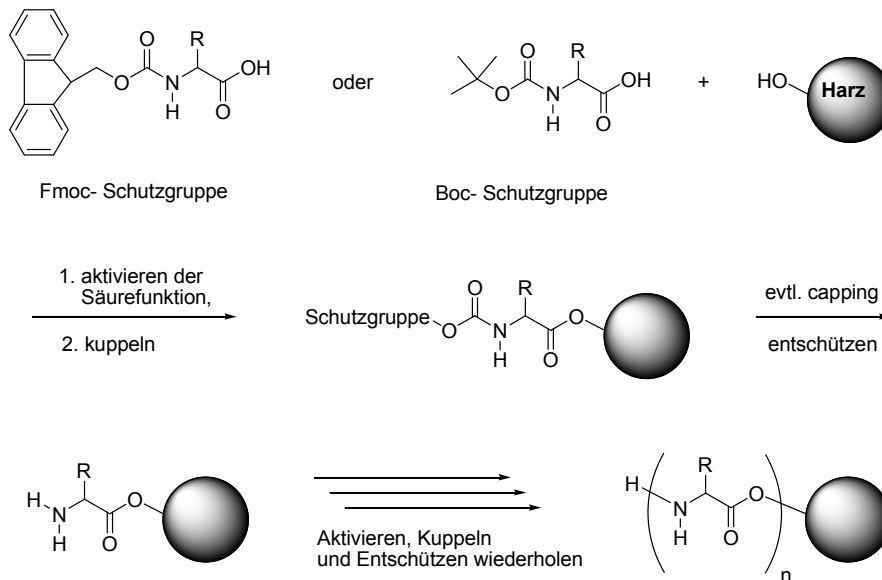


Abbildung 31: Schematischer Ablauf einer Festphasensynthese eines Polypeptids. Der Aufbau von Polyamiden gelingt in gleicher Weise. Durch eine Abspaltung von der festen Phase wird das fertige Produkt freigesetzt.

Ein Zyklus bei der Festphasensynthese besteht aus 3 Schritten:

- Aktivierung der Säurefunktion
- Kuppeln des Monomers
- Entschützung des N-Terminus

Diese Schritte werden wiederholt, bis das Polyamid vollständig am Harz aufgebaut ist.

Die Aktivierung der Säurefunktion ist notwendig, da Amine und Säuren ohne Aktivierung oder die Hilfe von Katalysatoren nur unter Salzbildung miteinander reagieren, nicht aber wie gewünscht die Peptidbindung knüpfen. Für die Aktivierung gibt es zwei Strategien: die Verwendung eines bereits voraktivierten Monomers (z.B. eines Anhydrids, Säurechlorids, Aktivesters etc.) oder die Aktivierung *in situ*.

Das Kuppeln ist ein entscheidender Schritt in der Synthese. Da Polyamide sequenziell aufgebaut werden, ergibt sich die Ausbeute der Gesamtreaktion nach n Kupplungsschritten aus dem Produkt der Einzelausbeuten. Bei einer Einzelausbeute von 90% erhielte man nach $n=10$ Kupp-

lungsschritten bereits nur noch rund 35 % des gewünschten Produktes, nach n=20 Schritten gar nur noch 12 %. Daher gelten bei Festphasenreaktionen Einzelausbeuten erst ab 96-98% als befriedigend. Um trotz guter Ausbeuten nicht reagiertes Amin vor einer Reaktion mit der dann nächsten Einheit zu hindern und damit ein um eine Einheit verkürztes Produkt zu erhalten, kann es durch Reaktion mit Essigsäureanhydrid acetyliert und somit unreaktiv gemacht werden. Diesen Schritt nennt man „*capping*“.

Die Entschützungsbedingungen sind für die beiden Schutzgruppen unterschiedlich. Die Boc-Schutzgruppe wird sauer abgespalten, beispielsweise durch Salzsäure oder Trifluoressigsäure. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt unter milderer Bedingungen und setzt das Amin bei Behandlung mit geeigneten Basen wie z.B. Morpholin, 2-Aminoethanol oder Piperidin frei. Die Boc-Strategie eignet sich also nur für Synthesen, bei denen keine säurelabilen Monomere eingebaut werden. Die Synthesen der in dieser Arbeit verwendeten Polyamide sind bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit beschrieben worden.¹⁵⁷

1.6 Nachweismethoden für die Nanometerwelt

Es gibt eine große Anzahl von Möglichkeiten, (makro-) molekulare Komplexe nachzuweisen.¹⁵⁸ Einige davon sind im Rahmen dieser Arbeit erprobt worden, z.B. Massenspektrometrie (siehe Kapitel 3.4), Fluoreszenzpolarisation (3.2.6), Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie (3.2.7), Oberflächenplasmonresonanz (3.2.4), gelbasierte Methoden wie EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay* 3.2.5) und native Anionen-Austauschchromatographie (3.1.8.5). Diese Methoden haben ihre Vor- und Nachteile, die an entsprechender Stelle im Hauptteil diskutiert werden sollen. Manche der Methoden liefern keine oder unzureichende Aussagen über die Ausbeute entsprechender Komplexe oder Nanoarchitekturen. Allen Methoden ist aber gemein, dass die Konnektivität, Topologie und strukturelle Integrität der Komplexe nicht oder nur unzureichend nachgewiesen werden können. Genau dies ist jedoch bei großen Komplexen wie Nanoarchitekturen von entscheidender Bedeutung. Daher ist die Aussagekraft von Bildern mit entsprechender Auflösung meist stärker als die Daten die mit anderen Methoden generierbar sind.

Als bildgebende Verfahren kommt Lichtmikroskopie nicht in Frage, da die Auflösung der Bilder von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes auf einige 100 nm begrenzt ist. Mit Elektronenmikroskopie (EM) und Kryoelektronenmikroskopie gelingt die Auflösung von Makromolekülen, jedoch müssen Moleküle mit einer geringen Streukraft für Elektronen (wie DNA) meist mit Kontrastreagenzien angefärbt werden. Des Weiteren sind die Bilder von sehr kleinen Objekten meist von geringem Kontrast und müssen häufig aufwendig nachbearbeitet werden.

Ein anderes bildgebendes Verfahren, das im Rahmen dieser Arbeit häufig zum Einsatz kam, ist die Rasterkraftmikroskopie.

1.6.1 Rasterkraftmikroskopie

Zusammen mit der Elektronenmikroskopie ist Rasterkraftmikroskopie (AFM, für *atomic force microscopy*) das gebräuchlichste Verfahren, mit dem Strukturen in der Nanometerskala abgebildet werden. Das AFM ist eine Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskops (STM, für *Scanning Tunnel Microscope*), mit welchem jedoch nur elektrisch leitende Proben abgebildet werden können.¹⁵⁹ Wie der Name vermuten lässt, wird beim AFM eine Probe Zeile für Zeile abgerastert und somit ein Bild erzeugt. Das Funktionsprinzip ähnelt dabei dem eines Plattenspielers: Mit der Spitze einer feinen Nadel wird die Oberfläche eines Objektes abgetastet und die Auslenkung der Spitze aufgrund von Interaktionen mit der Oberfläche detektiert. Die Spitze beim AFM ist freilich ungleich feiner, ist aber analog zu Plattenspielnadeln an einem flexiblen Arm, dem sogenannten Cantilever angebracht (siehe Abbildung 32). Dieser kann rechteckig sein wie in der

schematischen Zeichnung oder auch dreieckig wie im oberen EM-Bild. Während die Cantilever mit dem bloßen Auge gerade noch zu erkennen sind (typische Längen sind einige 10 μm), kann man die Spitze nicht mehr sehen. Einer oder mehrere Cantilever sind auf einer Basis befestigt. Die gesamte Einheit aus Basis, Cantilever und Spitze nennt man Sonde (englisch *probe*, nicht zu verwechseln mit der Probe, also dem Objekt, welches abgebildet werden soll).

Die Sonde wird am Scannerkopf des Mikroskops befestigt, der mithilfe von Piezo-Elementen subnanometergenau in allen Raumrichtungen positioniert werden kann. Auslenkungen des Cantilevers in z-Richtung können mithilfe eines Lasers registriert werden, welcher auf die spiegelnde Oberseite des Cantilevers justiert wird. Verbiegt sich der Cantilever, so ändert sich die Richtung der Reflektion und somit der Punkt, auf dem der Laserstrahl auf einer 4-Segment-Photodiode auftrifft. Die Spitze wird nun zeilenweise über die Probe gerastert (die Probe wird „gescannt“) und mit den Veränderungen des Lasersignals an der Photodiode wird ein Bild der Probe erstellt.

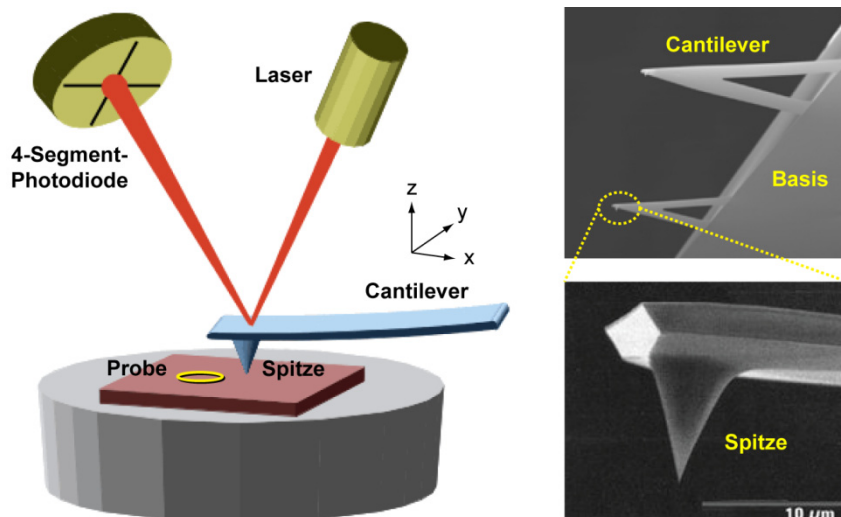


Abbildung 32 links: Schematische Darstellung eines AFMs (Erklärungen siehe Text).
Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von AFM-Spitzen.

Es gibt zwei wichtige Messmodi: Den Kontakt-Modus und den intermittierenden oder „*tapping*“-Modus. Harte Proben, z.B. aus Halbleitermaterial können im Kontakt-Modus gemessen werden, bei weichen Proben, wie zum Beispiel Biomolekülen empfiehlt sich der *tapping*-Modus, da hierbei die Kräfte auf die Probe minimiert werden. Für den *tapping*-Modus wird der Cantilever durch den z-Piezo oder alternativ ein magnetisch beschichteter Cantilever durch ein magnetisches Feld, welches unter der Probe erzeugt wird, in Schwingung versetzt. Aus den Änderungen der Amplitude, Phase und Frequenz der Schwingung kann nun eine Höheninformation, aber auch einige physikalische Eigenschaften wie die Weichheit der Probe ermittelt werden.

Die Kontrolleinheit des AFM führt den Scanner den Konturen des Objektes nach, so dass Erhebungen der Probe nicht stärker mechanisch beansprucht werden als tiefer liegende Regionen. Es ist prinzipiell möglich, mit AFM atomar aufgelöste Bilder des Objektes zu erstellen. So wurden kürzlich einzelne Pentacen-Moleküle auf einer Oberfläche gescannt (siehe Abbildung 33).¹⁶⁰

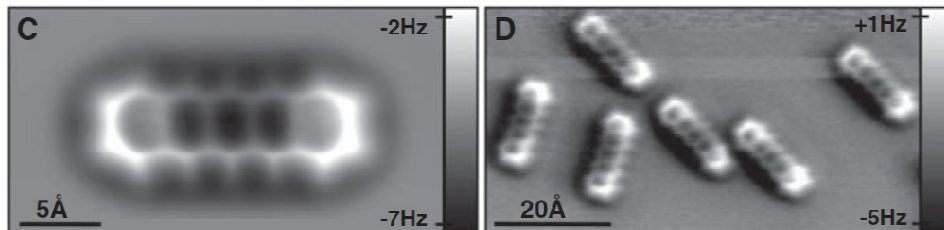


Abbildung 33: AFM-Aufnahmen von Pentacen-Molekülen.¹⁶⁰

Bilder mit solch hervorragender Auflösung sind jedoch nur mit hohem Aufwand und mithilfe von mit einzelnen Molekülen funktionalisierten Spitzen zu erhalten. In der Praxis ist die Auflösung des Bildes vom Radius der verwendeten Spitze abhängig. Kommerziell erhältliche Spitzen haben Radien von bestenfalls 4 nm, typischerweise jedoch 10-40 nm, was keine atomaren Auflösungen mehr zulässt. Auch die geometrische Form der Spitze beeinflusst das entstehende Bild, denn ein Punkt des Objektes wird immer mit der tatsächlichen Form der Spitze abgebildet. Bei einer Doppelspitze beispielsweise kann es zu sogenannten Doppelspitzen-Artefakten kommen, in denen jeder Punkt der Oberfläche zweimal erfasst wird.

Ein Vorteil von AFM gegenüber der Elektronenmikroskopie ist, dass Proben ohne Kontrastgebende Reagenzien wie Uranylacetat auskommen. Ein Nachteil ist, dass nur die Oberflächen des Objekts zu sehen ist, während man bei der Durchsicht durch ein Objekt unter Umständen weitere Informationen über sein Inneres erhalten kann.

AFM hat sich in den vergangenen Jahren als ein unschätzbares Hilfsmittel auch in den Biowissenschaften entwickelt. Mithilfe von nichtdestruktiven Messungen im *tapping*-Modus, der sogar in wässrigen Puffern funktioniert, lassen sich beispielsweise Proteine und Proteinkomplexe,^{161,162} DNA-¹⁶³ und DNA-Protein-Komplexe¹⁶⁴ und sogar ganze lebende Zellen¹⁶⁵ abbilden.

Da AFM und STM letztlich mechanische Techniken sind, kann man gezielt Kraft auf eine Probe ausüben oder über den Grad der Biegung des Cantilevers Kräfte messen. Die erste und immer noch eine der spektakulärsten Anwendungen in dieser Richtung war das genaue Positionieren von Xenon-Atomen in Form des IBM-Schriftzuges auf einer Nickel-Oberfläche (siehe Abbildung 2 rechts).⁵ Indem unterschiedliche Moleküle an einem Substrat respektive an einer AFM-Spitze kovalent befestigt werden, kann man die Kräfte messen, die die beiden Moleküle zusammenhalten. Auf diese Weise wurde beispielsweise bestimmt, dass die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung mit 1000 pN immerhin halb so stark ist wie die ionische NaCl-

Wechselwirkung.¹⁶⁶ Die Kräfte, die zwei komplementäre DNA-Oligomere (entlang ihrer Achse) zusammenhalten liegen etwa in der gleichen Größenordnung.¹⁶⁷ Aber auch intramolekulare Kräfte können mithilfe eines AFM gemessen werden, wenn man die zwei Enden eines Makromoleküls an eine Basis bzw. an die AFM-Spitze knüpft. Zieht man nun das Molekül (beispielsweise ein Protein) auseinander, so kann man über die Änderung der Kräfte beim Auseinanderziehen Aussagen über seine Faltung treffen.⁶⁸

Mittlerweile können nicht nur Kräfte zwischen einzelnen Molekülen (in der Literatur wird der Begriff SMFS für *single molecule force microscopy* gebraucht), sondern auch Kräfte zwischen ganzen Zellen mit AFM gemessen werden (SCFS für *single cell force microscopy*).¹⁶⁹

Eine andere Anwendung für AFM wurde in dem Labor von Chad Mirkin entwickelt, die sogenannte *Dip Pen-Lithographie*.¹⁷⁰ Hierbei handelt es sich um eine Technik, die dem Gebrauch eines Füllfederhalters ähnelt und mit der man mit Molekülen auf einer Oberfläche schreiben kann (siehe Abbildung 34). Wie auch anderer Lithographie-Methoden ist diese Technik eines der wenigen Beispiele für die Erzeugung von Strukturen mit einem *top-down*-Ansatz.

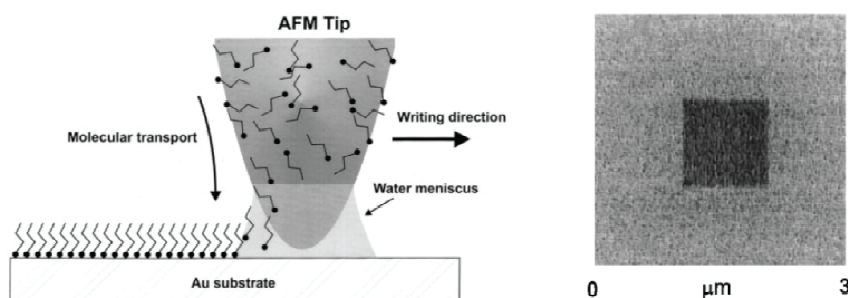


Abbildung 34: Dip Pen-Lithographie. Eine AFM-Spitze wird in eine Lösung mit Thiol-modifizierten Molekülen getaucht und mit der so präparierten Spitze können auf einem Goldsubstrat beliebige Muster aufgebracht werden. Rechts: AFM-Aufnahme eines so geschriebenen Quadrates.¹⁷⁰

2 Zielsetzung

Durch ein immer besseres Verständnis molekularer Vorgänge in der Biologie und Medizin, aber auch in den Materialwissenschaften gibt es einen Bedarf, Strukturen in der Nanometer-Größenordnung gezielt zu erzeugen und zu manipulieren. Dies kann, wie in der Einführung dargestellt, durch zwei grundsätzlich verschiedene Ansätze erfolgen, den *top down*- oder den *bottom up*-Ansatz. Aufgrund von technischen und physikalischen Problemen beim *top down*-Ansatz ist die Selbstorganisation von geeigneten Molekülen die mächtigste Methode zur Erzeugung von Strukturen im Nanometerbereich. In Jahrmilliarden der Evolution hat die Natur Proteine als vielfältigste Struktur- und Funktionsmoleküle perfektioniert. Für den Aufbau künstlicher Strukturen und Funktionseinheiten eignen sich Proteine jedoch (noch) nicht, da eine Vorhersage der Struktur und Funktion von Polypeptiden und damit ein künstliches Design sehr schwierig sind.

Ein anderes in der Biologie sehr wichtiges Makromolekül ist DNA, welche in der Natur jedoch meist nur die Rolle eines Informationsspeichers hat. Die Struktur und andere physikalische und chemische Eigenschaften von DNA sind im Gegensatz zu denen von Proteinen verhältnismäßig leicht vorhersagbar. Da zudem DNA immer billiger zu synthetisieren ist, hat sich DNA als vielfältiges Bau- und Funktionsmaterial in der Nanotechnologie etablieren können (siehe Kapitel 1.3). Durch den Einsatz von DNA ist es nun möglich, Moleküle oder Nanopartikel subnanometergenau anzuordnen und sogar gezielt zu bewegen.¹²⁷

Die Projekte dieser Arbeit lassen sich grob in zwei Felder unterteilen, zum einen sollten neuartige Strukturen auf der Basis von DNA-*minicircles* aufgebaut werden (Catenane, Rotaxane und Röhren), zum anderen sollten alternative Interaktionsmöglichkeiten zu Watson-Crick Basenpaarungen entwickelt werden. Dabei sollten *minicircles* als Testsysteme dienen, um die gewünschte Interaktion (Polyamid-Stütze, Polyamid-Anker, G-Quadruplex-Modul und lichtinduzierter Zusammenbau) zu testen. All diese Projekte haben zum Ziel, Werkzeuge oder neue Strukturen zu entwickeln, die den Einsatzbereich der DNA-Nanotechnologie weiter erweitern könnten.

DNA-*minicircles* (Kapitel 3.1)

Ringe sind - nicht nur für DNA - die einfachsten geometrischen Strukturen, doch sind sie bislang kaum für den Aufbau von DNA-Architekturen verwendet worden. In frühen Arbeiten zu DNA-*minicircles* wurden meist identische, kurze Segmente oligomerisiert und zyklisiert, mit dem Nachteil, dass Ringe unterschiedlicher Größe entstehen (siehe Abschnitt 3.1.3). In dieser Arbeit sollte dieser Nachteil durch den Einsatz von einzigartigen Segmenten und mit Hilfe von vorgekrümmten *A-tract*-Sequenzen ausgeglichen werden und Ringe mit diskreter Größe zusammengesetzt werden. Die hierfür nötigen Designprinzipien und experimentellen Vorgehensweisen sollten entwickelt und verfeinert werden (siehe Kapitel 3.1).

Polyamid-Stütze (Kapitel 3.2)

Ein Nachteil der DNA-Architekturen auf Basis von migrationsstabilen Kreuzungen ist, dass solche Strukturen nur mithilfe von Oligonukleotiden aufgebaut werden können, die exakt zu diesem Zweck designt worden sind (Abschnitt 1.3.1). Eine Anordnung oder ein Aufbau von Strukturen mit natürlicherweise doppelsträngig vorkommender DNA ist bislang kaum möglich gewesen. Desweiteren haben Kreuzungen den Nachteil, dass sie im Vergleich zur steifen, doppelsträngigen DNA sehr weich sind.

Hier sollten darum Möglichkeiten entwickelt und getestet werden, die auch den Aufbau von Strukturen mit doppelsträngiger DNA erlauben. Der erste von zwei Ansätzen sah vor, zwei Dervan-Polyamide (Kapitel 3.2) durch einen langen, flexiblen Linker miteinander zu verbinden. Das neu entstandene heterobifunktionale Molekül habe ich bereits in meiner Diplomarbeit synthetisiert und sollte Polyamid-Stütze genannt werden.¹⁵⁷ Es sollte in der Lage sein, zwei verschiedene DNA-Doppelstränge zu einem ternären Komplex zu verbinden. Damit könnte die Polyamid-Stütze als sequenzspezifischer Kleber für DNA-Nanoarchitekturen fungieren (Abbildung 35). Als Testsystem sollten nun zwei DNA-*minicircles*, die jeweils eine Bindungsstelle für eine Seite der Polyamid-Stütze mitbringen, synthetisiert und miteinander verbunden werden

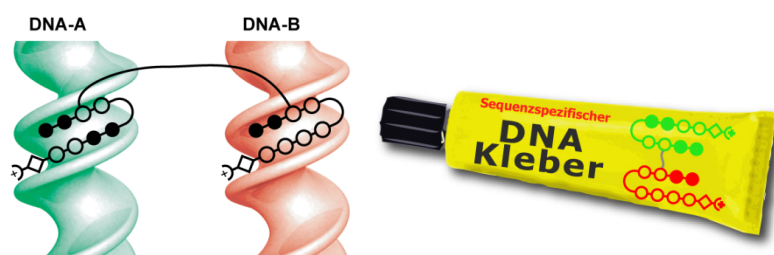


Abbildung 35: Konzept eines sequenzspezifischen Klebers für doppelsträngige DNA auf der Basis von Dervan-Polyamiden. Das heterobifunktionale Molekül aus zwei durch einen Linker miteinander verbundenen Polyamiden hält zwei DNA-Stränge zusammen und vermittelt so einen ternären Komplex.

Der Nachweis des erfolgreichen Aufbaus der Komplexe sollte primär über AFM erfolgen. Aufgrund von anfänglichen technischen Schwierigkeiten und aus Mangel an Erfahrung mit der Rastertkraftmikroskopie (Kapitel 3.3) sollten für dieses System auch alternative Nachweismethoden etabliert werden, wie etwa FCS und FCCS (3.2.7), LILBID-Massenspektrometrie (3.4), Fluoreszenzpolarisation (3.2.6) und Gelelektrophorese (3.2.5).

Polyamid-Anker (Kapitel 3.6)

Da sich im Laufe der Experimente mit den Polyamid-Stützen experimentelle und konzeptionelle Probleme zeigten (Abschnitt 3.2.9), sollte das System verbessert werden, indem eines der Polyamide kovalent an einen DNA-Strang gekuppelt werden sollte. Dieser Hybrid sollte dann in einen DNA-*minicircle* eingebaut werden, welcher die Bindungsstelle für das Polyamid trägt. Das Polyamid in dieser Struktur erinnert an einen Anker an einem Seil; daher sollte diese Art der Anknüpfung „Polyamid-Anker“ genannt werden. Ist die entsprechende Bindungsstelle weit genug vom Anknüpfungspunkt des Ankers entfernt und der Linker kurz genug gewählt, so sollte es zur Bildung von Homodimeren kommen. Diese Homodimere sollten stabiler als die ternären Komplexe sein, da nun zwei Bindungen mit jeweils nur noch einer vordefinierten Sollbruchstelle den Komplex kooperativ zusammenhalten.

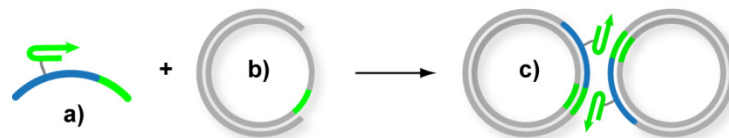


Abbildung 36: Konzept des Polyamid-Anker-Zwillings. a) Ein Polyamid (grüner Pfeil) sollte kovalent mit einem Oligonukleotid verknüpft werden, welches dann in einen minicircle mit Bindungsstelle für das Polyamid eingebaut werden sollte (b). c) Dimerisierung des Polyamid-substituierten minicircles.

In weiterführenden Experimenten sollte versucht werden, aus mit mehreren Polyamid-Ankern versehenen *minicircles* Ketten oder zweidimensionale Gitter aufzubauen.

G-Quadruplex-Module (Kapitel 3.8)

G-Quadruplexe gehören zu den vielfältigsten Strukturmotiven aus DNA. Sie bestehen aus Schichten von G-Quartetten, welche ein zentrales Metallion (meist Na^+ oder K^+) komplexieren und kommen in einer Vielzahl von Topologien vor. In Zusammenarbeit mit Dr. Diana Gonçalves und Dr. Martin Koeppel sollte die salzabhängige Bildung von G-Quadruplexen dazu genutzt werden, zwei DNA-*minicircles* zu Dimeren zu verbinden. Dazu sollten die Ringe über eine 3-armige Kreuzung mit einzelsträngigen, G-reichen Anhängen versehen werden. Das erste Design sah eine haarnadelartige G-reiche Sequenz vor, das zweite Design erinnert an eine Stimmgabel.

Diese G-Quadruplex-Module sollten in Zukunft zum salzabhängigen Zusammenbau von Architekturen oder zum Schalten einer molekularen Maschine Verwendung finden.

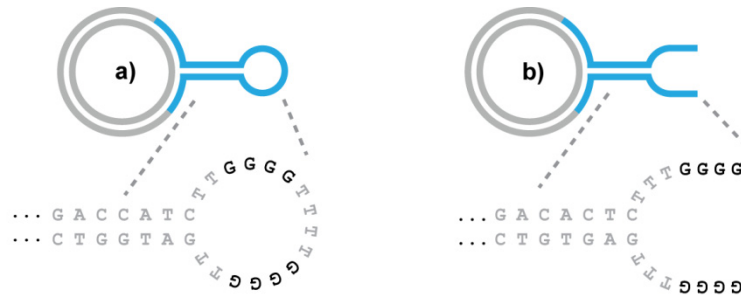


Abbildung 37 a) Der Haarnadel-minicircle und der der Stimmgabel-minicircle (b).

Gecagete Architekturen (Kapitel 3.9)

Mit photolabilen Schutzgruppen (*cages*) versehene Nukleinsäuren sind das Markenzeichen des Arbeitskreises Heckel. Allerdings sind *cages* bislang nicht in der DNA-Nanotechnologie eingesetzt worden. Deren Einsatz würde jedoch Anwendungsmöglichkeiten in praktisch allen Teildisziplinen der DNA-Nanotechnologie, angefangen von DNA-Nanoarchitekturen über molekulare Motoren bis hin zu logischen Schaltern, eröffnen.

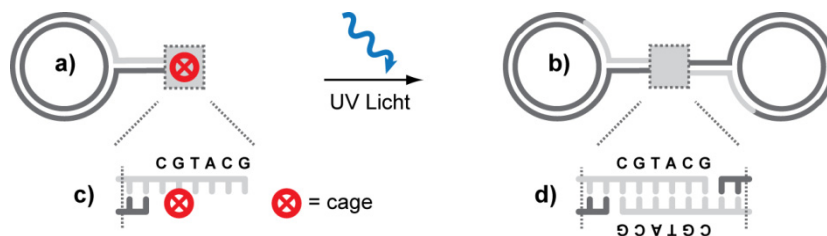


Abbildung 38: Schema der lichtinduzierten Nanoarchitektur-Bildung. a) Ein mit gecagetem Appendix versehener minicircle soll nach Bestrahlung mit UV-Licht dimerisieren (b). c) Ein selbstkomplementäres sticky end, als ein Beispiel der geplanten Interaktionen. Nach Entcagen sollte sich ein Homodimer ausbilden (d).

Daher sollten in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Koeppel, Julie Thevarpadam und Dr. Diana Gonçalves gecagete Oligonukleotide in ein größeres Testsystem eingebaut werden. Wir entschieden uns abermals für die bewährten *minicircles*, welche mit verschiedenen gecageten *sticky ends*, aber auch mit gecageten G-reichen Appendixen versehen werden sollten. Alle Systeme sollten vor der Bestrahlung keine Interaktionen untereinander eingehen und nach Bestrahlung Dimere bilden.

Architekturen auf Basis von *minicircles* oder *A-tracts*

Rotaxane sind eine Klasse von mechanisch zusammengehaltenen Molekülen, bei denen sich ein Makrozyklus frei auf der Achse eines hantelartigen Moleküls bewegen kann, und nur durch die Enden der Hantel (Stopper) auf der Achse gehalten wird. In einer Kollaboration sollten von Dr. Damian Ackermann aus der Gruppe von Prof. Famulok synthetisierte Rotaxane (Abbildung 39 a) aus *ds*DNA nachgewiesen werden (Kapitel 3.10). Als Nachweis für die strukturelle Integrität und korrekte Topologie der Strukturen sollte AFM zum Einsatz kommen. Ein solches Rotaxan aus DNA könnte in Zukunft als Teil einer molekularen Maschine dienen. Möglicherweise kann der mittlere Ring auch zwischen zwei Zuständen hin und her geschaltet werden und das Rotaxan somit als Schalter oder Informationsspeicher genutzt werden.

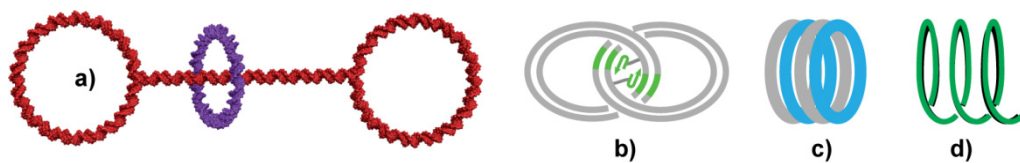


Abbildung 39: Strukturen auf Basis von *minicircles*: a) Rotaxan, b) Catenan, c) Röhre, d) Spirale bzw. Superhelix

Mit *minicircles* als Bauelementen sollte des Weiteren versucht werden, ein **Catenan** herzustellen, indem zwei nicht geschlossene Ringe durch Polyamid-Stützen oder Polyamid-Anker so angeordnet werden, dass sie bei einem nachfolgenden Ringschluss cateniert vorliegen (Abbildung 39 b). Dafür müssten die Bindungsstellen für die Polyamide anders als beim Verkleben zu Dimeren im Inneren des Torus liegen. Der Ringschluss könnte durch die Zugabe von einem oder zwei Oligonukleotiden erfolgen (Kapitel 3.7).

Durch Übereinanderstapeln von *minicircles* ließen sich theoretisch **Röhren** aus DNA bauen (Abbildung 39 c). Die Verbindung der Ebenen der Röhren könnte einerseits durch Polyamid-Stützen oder -Anker gelingen, andererseits aber auch durch das bewährte Überkreuzen von DNA-Strängen (siehe Abschnitt 1.3.2). Beide Varianten sollten im Zuge dieser Arbeit ausgetestet werden (Kapitel 3.5 bzw. 3.12). Dieses wäre die erste Röhre aus DNA, in der die Helixachsen quer zur Röhrenachse liegen. Möglicherweise haben solche Röhren eine höhere Kompressionsstabilität als publizierte längsgestreifte Architekturen.

Die Krümmung der *A-tracts* ausnützend sollte es weiterhin möglich sein, aus einem sehr langen *A-tract*-haltigen DNA-Doppelstrang eine Art **Superhelix** aufzubauen (Abbildung 39 d). Dies könnte über einen langen, repetitiven Einzelstrang gelingen, den man enzymatisch durch *rolling circle amplification* darstellen könnte. Die Windungen der Superhelix könnten über Polyamid-

Anker, Polyamid-Stützen oder über *crossovers* miteinander verbunden werden (Kapitel 3.11). Eine solche Röhre könnte sehr robust sein, da die Organisation des einzelsträngigen Templates wie bei DNA-Origami ein intramolekularer Prozess ist. Damit sollte die Bildung der Struktur Überschüsse von *staple strands* oder *staple strands* von minderer Qualität tolerieren.

3 Eigene Arbeiten und Kooperationen

3.1 DNA-*minicircles*

In vielen der hier vorgestellten Projekte wurden DNA-*minicircles* verwendet. Ein Ring ist die einfachste denkbare geometrische Form und kann auch zum Aufbau von Architekturen verwendet werden. Dazu könnten beispielsweise mehrere Ringe übereinander gestapelt werden, wodurch eine Röhre entstünde. Ein Vorteil der Ringe ist, dass sie relativ einfach zu synthetisieren und aufzureinigen sind. Darüber hinaus sind Ringe auf AFM-Aufnahmen durch eine einheitliche Größe und Form, gerade bei einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis oder einer wenig scharfen Aufnahme, besser auszumachen als lineare Fragmente gleicher Länge und eignen sich daher gut, um neuartige DNA-Komplexe zu detektieren, deren Darstellung ein weiteres Ziel dieser Arbeit war.

3.1.1 A-tracts

Für die Synthese von *minicircles* werden üblicherweise intrinsisch gekrümmte DNA-Sequenzen verwendet. Die Sequenzen mit der stärksten bekannten intrinsischen Krümmung sind die *A-tracts*¹⁷¹, die aus 4-6 hintereinander folgenden Adenosinen bestehen, welche sich einmal pro Helixwindung wiederholen.

Über die molekularen Ursachen der Krümmung und deren Richtung gab und gibt es widersprüchliche Ansichten. Das Keil-Modell (engl. *wedge model*), entwickelt von Trifonov *et al.*, war das erste Modell zur Beschreibung nichtlinearer DNA.¹⁷² Die Autoren entdeckten, dass in (gekrümmter) Chromatin-DNA bestimmte Dinukleotide besonders häufig in einem Abstand von 10.5 bp - der Gangweite der DNA-Doppelhelix - vorkommen. Daraus schlossen sie, dass jene Dinukleotide gleichermaßen als Keil in den ansonsten parallel verlaufenden Ebenen der Nukleobasen fungieren, und sich deren periodische Wiederholung zu einer Krümmung addiert. Das Dinukleotid-Modell wird immer noch als Erklärungsversuch gelistet, obwohl schon in den 1980-er Jahren starke Zweifel an diesem Modell aufkamen.¹⁷³ Ein formal ähnliches Modell zur Vorhersage von gekrümmter DNA ist das Trinukleotid Modell.¹⁷⁴ Diesem Modell liegen zahlreiche Kristallstrukturen zugrunde, aus denen geometrische Parameter von Dreiergruppen von Nukle-

otiden abgeleitet werden. Auf der Basis dieses Modells wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Koepfel dreidimensionale Strukturen von zahlreichen gekrümmten Sequenzen errechnen,¹⁷⁵ doch versagt das Modell speziell bei der Vorhersage der für diese Arbeit wichtigen Krümmung von *A-tracts* und wurde daher nicht weiter zur Planung von Sequenzen herangezogen.

Ein neueres Modell trägt den Namen *tug of war*-Modell (Tauziehen) und postuliert eine sequenzspezifische Konkurrenz der großen und kleinen Furche der DNA um Kationen.¹⁷⁶ Mit diesem Modell können sowohl die Krümmung von *A-* als auch von *G-tracts* erklärt werden. Wenn Ionen nicht gleichmäßig verteilt in der *minor* und *major groove* vorliegen, sondern sequenzbedingt vermehrt in der *minor groove* (in *A-tracts*) oder in der *major groove* (in *G-tracts*), dann kommt es zu einer elektrostatisch getriebenen Kontraktion der entsprechenden Furche. Dieses Modell erfährt Unterstützung von Versuchen aus der Arbeitsgruppe von Eric Kool. Bei diesen Experimenten wurden künstliche Nukleobasen eingesetzt, welche keine Salzbrücken ausbilden können.^{177,178} Die gelelektrophoretische Mobilität dieser *A-tract*-Sequenzen war im Vergleich zu *A-tracts* mit natürlichen Nukleobasen erhöht, was auf eine geringere Krümmung schließen lässt. Demzufolge müssen in der Tat Lokalisationen von Ionen an den Nukleobasen entscheidend zur Krümmung beitragen. Da Hybridisierungen für diese Arbeit meist in magnesiumhaltigen Puffern durchgeführt wurden, ist noch von Interesse, dass die Krümmung mit Magnesium deutlich stärker ausfällt als mit einwertigen Kationen.¹⁷⁹

Aber nicht nur über die Ursachen, sondern auch über die Richtung der Krümmung der *A-tracts* gibt es unterschiedliche Berichte.

3.1.2 Die Richtung der intrinsischen Krümmung von *A-tracts*

Für alle Projekte dieser Arbeit mit *A-tract*-enthaltenden *minicircles* ist weniger die molekulare Ursache der Krümmung der *A-tracts* als eher die Richtung der Krümmung interessant, also welche Stellen einer *A-tract*-Sequenz im Torus innen und welche außen zu liegen kommen. Doch ist die Literaturlage zu dieser Frage auch nicht eindeutig. Gelelektrophoretische Experimente und Versuche mit DNA-bindenden Proteinen deuteten darauf hin, dass die *A-tract*-Krümmung aus einer Kompression der kleinen Furche an den A-T-Sequenzen herrührt.¹⁸⁰ In einer Kristallstruktur eines *A-tract*-Dodecamers ist die Richtung der Krümmung jedoch um etwa 90° gedreht gefunden worden.¹⁸¹ Eine neuere hochaufgelöste NMR-Struktur eines Dodecamers kommt wiederum zum Ergebnis, dass die kleine Furche an den A-T-Sequenzen komprimiert ist (siehe Abbildung 40).¹⁸² Molekulare-Dynamik-Rechnungen, die die bestehenden Strukturen als Ausgangszustände nehmen,¹⁸³ kommen zu dem Schluss, dass die Richtung der Krümmung aus der Kristallstruktur¹⁸¹ wohl eher Packungseffekten denn ihrem natürlichen Auftreten in Lösung geschuldet ist. Auch das *tug of war*-Modell (s.o.) lässt sich eher mit der NMR-Struktur und der Rechnung als mit der Kristallstruktur in Einklang bringen. Damit spricht die Mehrheit gerade der neueren

Arbeiten gegen die Richtigkeit der Kristallstruktur und daher wurden allen im Weiteren vorgestellten Designs das NMR-Modell von Lu¹⁸² zugrunde gelegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben keinen Hinweis darauf, dass diese Annahme falsch gewesen ist.

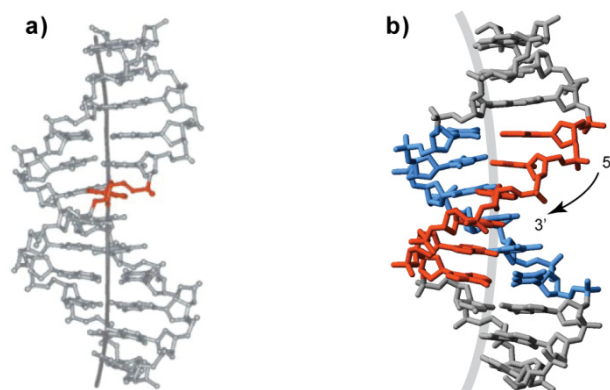


Abbildung 40: Die Krümmung von A-tracts. a) Original-Abbildung aus der Publikation von Lu.¹⁸² Das dritte von sechs aufeinanderfolgenden Adenosinen ist rot eingefärbt. Die Krümmung verläuft nach links, der Blick des Betrachters ist genau senkrecht zur Ebene der Krümmung. b) Model nach Lu¹⁸², möglichst genau wie a) ausgerichtet. Die Adenosine sind rot, die Thymidine blau eingefärbt. Die Polarität des A-reichen Strangs ist in 5'-3'- Richtung markiert. Die Krümmung der Helixachse ist in grau übertrieben dargestellt.

3.1.3 Synthesestrategien für DNA-*minicircles*

Die kleinsten prinzipiell doppelsträngigen *minicircles* ohne *A-tracts* waren nur 64 bp lang und wurden mit einem zyklischen Verfahren, genannt *Ligase Assisted Minicircle Accumulation* (LAMA, Ligase-assistierte *minicircle*-Akkumulation) erzeugt.¹⁸⁴ Allerdings zeigte sich bei so kleinen Ringen, dass die DNA-Struktur durch die extreme Biegung mindestens in einigen Regionen nicht mehr doppelsträngig vorliegt.

Üblicherweise sind doppelsträngige *minicircles* größer und wurden bislang meist durch Ligation kurzer (z.B. 21 bp langer), identischer, *A-tract* haltiger Fragmente synthetisiert, welche mit sticky ends versehen waren (siehe Abbildung 41).¹⁸⁵ Bei solchen statistischen Ansätzen ist die Größe der entstehenden Ringe nicht steuerbar und vom Radius der intrinsischen Krümmung, der Ligationseffizienz und - wie in Abschnitt 3.1.9.3 diskutiert - vermutlich auch von kinetischen und entropischen Effekten abhängig.

Für eigene Arbeiten sollten jedoch Ringe von einheitlicher Größe zum Einsatz kommen. Des Weiteren sollten diese neuartigen Ringe modifizierte Oligonukleotide oder einzelne Bindungsstellen für Polyamide tragen. Dafür war es nötig, die *A-tracts* zumindest in einigen Teilen der *minicircles* durch andere Sequenzen zu ersetzen. Da diese Teile nicht mehr gekrümmt sind, aber

die Gesamtheit der intrinsischen Krümmung beibehalten werden sollte, wurde für die zu synthetisierenden *minicircles* eine über dem optimalen Wert von Ulanovski (Abbildung 41) liegende Länge gewählt (168 bp, Diskussion siehe unten).

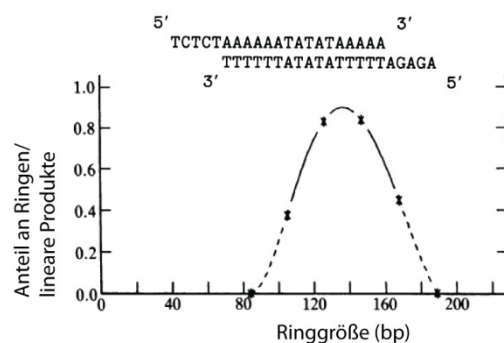


Abbildung 41: Zyklisierungsexperiment nach Ulanovski.¹⁸⁵ Ein A-tract-Fragment mit selbstkomplementären *sticky ends* wurde ligiert und die Ligationsprodukte in zweidimensionalen PAGE-Gelen nach linearen und zirkulären Ligationsprodukten aufgetrennt. Die Zirkularisations-Effizienz erreichte um etwa 140 bp ein Maximum.

Um nur *minicircles* einer bestimmten Größe und modifizierte Ringe zu erhalten, können nicht mehr gleiche Segmente mit selbstkomplementären *sticky ends* verwendet werden. Stattdessen wurden die gewünschten Ringe so in Segmente unterteilt, dass die entstehenden *sticky ends* einzigartig sind und sich somit nur zu den gewünschten *minicircles* oder linearen Polymeren zusammenfinden können (siehe Abbildung 44). Die Synthese der für die *minicircles* benötigten künstlichen Oligonukleotide hat sich seit den ersten Arbeiten zur Zyklisierung aus der Mitte der 80-er Jahre stark verbessert und verbilligt. Heute gibt es zahlreiche Firmen, die Oligonukleotide kommerziell in hoher Qualität anbieten. Dabei sind sogar Längen von über 60 Nukleotiden möglich, einige Firmen bieten selbst 200-mere an. Dabei nehmen freilich der Aufwand für die Synthese und Aufreinigung und damit der Preis zu, die Ausbeuten der Synthesen und oft auch deren Qualität jedoch erheblich ab (siehe auch Abschnitt 3.1.9.4). Daher sind für diese Arbeit meistens Oligonukleotide bis zu Längen von ca. 60 Nukleotiden designt worden, vereinzelt auch 84-mere und 128-mere. Rückblickend haben die Oligonukleotide über ca. 60 bp jedoch so viele Probleme bereitet (vgl. etwa Abschnitt 3.12.3), dass in zukünftigen Projekten so lange Fragmente besser nicht mehr entworfen werden sollten. Unabhängig davon scheint die „Standardgröße“ der Ringe von 168 bp für viele Projekte nach jetzigem Kenntnisstand unnötig groß, so dass für zukünftige Projekte möglicherweise zwei Segmente mit 63 bp (für 126 bp Ringe) ausreichen könnten.

Für die *minicircles* dieser Arbeit sind aber nicht nur einzigartige Segmente vonnöten, es mussten auch die Syntheseprotokolle neu entwickelt und im Laufe dieser Arbeit mehrfach variiert und verbessert werden. Die Einzelheiten der Designs werden im jeweiligen Kapitel diskutiert, die Synthesen jedoch erforderten immer die gleichen Schritte:

- 1) evtl. Kinasierung der zu ligierenden Oligonukleotide
- 2) Hybridisieren
- 3) evtl. Ligation
- 4) Abtrennen der zirkulären von linearen Ligationsprodukten
- 5) Aufreinigung und Aufkonzentrieren der *minicircles*

Für die unterschiedlichen Syntheseschritte sind mehrere Optionen entwickelt worden, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

3.1.4 Kinasierung

Standardmäßig wird DNA synthetisiert, welche an den 3'- und den 5'-Enden OH-Gruppen tragen. Die am häufigsten eingesetzte Ligase, die T4-Ligase hat zwar eine geringe Phosphorylierungsaktivität, braucht aber für die volle Effizienz 5'-phosphorylierte Oligonukleotide als Substrat. Die Kinasierung wurde bei den ersten Designs noch enzymatisch durchgeführt. Dies hatte den Vorteil, dass zur Kinasierung auch radioaktiv markiertes ^{32}P γ -ATP eingesetzt werden konnte und damit radioaktiv markierte Stränge erzeugt werden konnten. Radioaktive Gele haben im Vergleich zu anderen Methoden eine extrem niedrige Nachweisgrenze und ein hervorragendes Signal-Rausch-Verhältnis. Sie haben aber den Nachteil, dass ein spezielles Radioaktivlabor zur Verfügung stehen muss und radioaktives Arbeiten trotz aller Vorsichtsmaßnahmen immer mit einem gewissen gesundheitlichen Risiko behaftet bleibt. Im Verlauf der Arbeit hat sich herausgestellt, dass die extrem hohen Nachweisempfindlichkeiten radioaktiv markierter Gele nicht erforderlich waren. Stattdessen wurden Gele mit SybrGreen® oder SybrGold® angefärbt (s.u.). Eine Alternative zur enzymatischen Kinasierung stellen die chemisch phosphorylierten Oligonukleotide dar, wie sie die meisten DNA-Synthese-Firmen im Angebot haben. Der Vorteil dieser DNA ist, dass die Ausbeute nach Ligation nicht zusätzlich von der Effizienz der Kinase abhängt, hat aber den Nachteil, dass phosphorylierte Oligonukleotide etwa 25-40 Euro teurer sind als unmodifizierte.

Kann bei dem speziellen Design auf eine Ligation verzichtet werden (siehe 3.1.7), so sind natürlich auch keine phosphorylierten Oligonukleotide vonnöten.

3.1.5 Hybridisierung

In ersten Synthesen wurden die einzelnen Segmente noch getrennt voneinander hybridisiert. Es war aber auch möglich, alle Stränge gemeinsam zu hybridisieren, zu kinasieren und anschließend ohne Pufferwechsel zu ligieren. Bezüglich des Temperaturgradienten wurde die höchste Ausbeute an Ringen erhalten, wenn die Ringe langsam abgekühlt wurden (in 8 Stunden von 95°C auf 10°C), doch auch ein sehr schnelles Abkühlen (1 Minute) lieferte noch eine deutlich bessere Syntheseausbeute im Vergleich zur Ligation ohne vorheriges Aufheizen (hier betrug die Ausbeute nur 60-75 % der Ausbeute mit Heizen und langsamem Abkühlen).

Wenn nicht anderes angegeben, wurden die Oligonukleotide in allen außer dem ersten Design (Abschnitt 3.2.3) in einem heizbaren Thermoschüttler in 0,5 fachen Hybridisierungspuffer (Materialien und Methoden) für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Dann wurde die Heizung ausgestellt wobei nach Abkühlung auf Raumtemperatur in ca. 60 min gegebenenfalls die Ligation stattfand.

3.1.6 Ligation

Um das erste Syntheseprotokoll (siehe Abschnitt 3.2.3) - das noch einen Isolationsschritt zwischen Kinasierung und Ligation vorsah - zu vereinfachen, wurde zunächst die enzymatische Kinasierung und Ligation hintereinander in demselben Puffer (Ligase-Puffer) durchgeführt. Eine zusätzliche Zugabe von ATP (Adenosintriphosphat), welches sowohl von der Kinase als auch von der Ligase verbraucht wird, ist nicht erforderlich, da im Ligationspuffer ein ausreichender Überschuss an ATP vorhanden ist. Mehr Einfluss schien aber die Frische des Ligationspuffers zu haben. Daher wurden wiederholtes Auftauen und wieder Einfrieren durch Aliquotieren des konzentrierten Puffers so weit wie möglich vermieden.

Anfangs wurde fälschlicherweise die Ligationseffizienz als wichtigster limitierender Faktor für die Ringausbeute vermutet. Daher wurden Versuche unternommen, die Ausbeuten etwa durch höhere Konzentrationen von Ligase zu verbessern, was jedoch praktisch keinen Unterschied machte. Überraschenderweise lieferte ein Ringsynthese-Versuch mit nicht phosphorylierten Strängen immer noch etwa 1/6 der Ausbeute der Synthese mit phosphorylierten Strängen. Angesichts der Tatsache, dass für einen kompletten Ringschluss immerhin 6 Ligationen erforderlich waren, muss die Ausbeute eines Ligationsschrittes immerhin noch bei etwa 74% der Ausbeute bei Ligation mit phosphorylierten Oligonukleotiden verlaufen $((1/6)^{1/6})$. Des Weiteren war die Ausbeute an *minicircles* nicht messbar geringer, wenn statt über Nacht bei 4°C oder 16°C nur für 30 min bei Raumtemperatur ligiert wurde. Eine Inaktivierung der Ligase nach Abschluss der Ligation bei 65°C, wie sie in vielen Protokollen zu finden ist, brachte bezüglich der Sauberkeit oder Ausbeute der Ringe keine Verbesserung, daher wurde dieser Schritt meistens nicht durchgeführt.

Bei neueren *minicircle*-Designs wurden selbst dann noch sehr hohe Ausbeuten an Ringen erzielt, wenn komplett auf Ligation verzichtet wurde und die Oligonukleotide, evtl. an einem einzelsträngigen Templating (s.u.), hybridisiert und dann direkt nativ aufgereinigt wurden. Das liegt im Trend praktisch aller Veröffentlichungen von DNA-Nanoarchitekturen aus neuerer Zeit, bei denen Ligationen ebenfalls nicht mehr durchgeführt werden. Angesichts dieser Ergebnisse könnte aus Kosten- und Zeitgründen in Zukunft evtl. wieder auf chemisch phosphorylierte Oligonukleotide und auf die Ligation selbst verzichtet werden.

Sollte eine Ligation dennoch erfolgen, so wurde sie nach dem Hybridisierungsschritt ohne vorherigen Pufferwechsel durch die Zugabe einer geeigneten Menge konzentrierten Ligationspuffers und Ligase durchgeführt.

3.1.7 DNA-*minicircle*-Synthese über einzelsträngige Ringe

Eine in letzter Zeit häufig benutzte Methode war die Synthese und Isolation eines *ss* (*single stranded* = einzelsträngig) *minicircles*, der nachfolgend als Templat für die Hybridisierung mit den fehlenden Strängen des *ds* (*double stranded* = doppelsträngigen) *minicircles* diente. Die Synthese des *ss minicircles* gelingt durch Splint-Ligation, also mithilfe eines kurzen Templates, der die Enden des zu ligierenden DNA-Stranges zusammenführt. Analog zu den Überlegungen zu Polymerisation und Zyklisierung in Abschnitt 3.1.9.3 wurden die Splinte so designt, dass sich die Schmelztemperaturen des Splints mit den beiden Enden der einzelsträngigen DNA deutlich unterscheiden (siehe Abbildung 42 a).

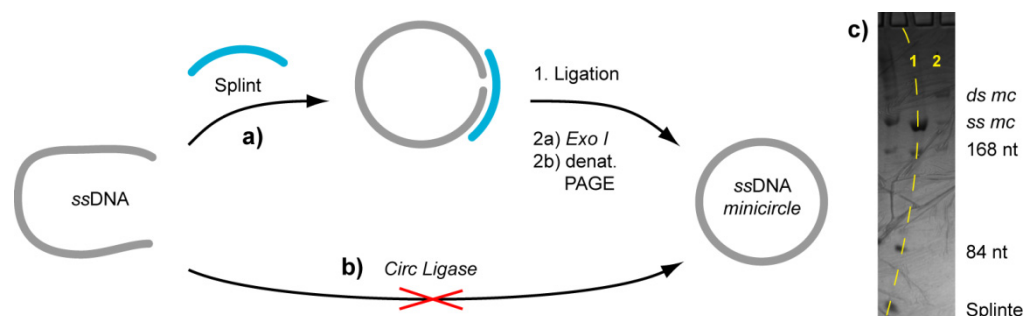


Abbildung 42: Schematische Synthese eines einzelsträngigen DNA-*minicircles*. a) Weg über Splint-Ligation.¹⁸⁶ b) Direkte Zyklisierung mit Circ Ligase (Erläuterungen im Text). c) Bild eines denaturierenden PAGE-Gels (vgl. auch Abbildung 45). 1) *ss minicircle* (*mc*) Synthese aus zwei 84 nt langen Einzelsträngen und zwei Splinten. 2) Kontrolle: Synthese eines *ds minicircles*. Die Mobilität des *ss minicircles* liegt zwischen dem linearen Fragment und dem *ds minicircle*. Die Bahnen sind durch Salzreste in der Probe nicht gerade gelaufen; das Bild entstand beim UV-shadowing.

Splinte können im Überschuss eingesetzt werden.¹⁸⁶ und können nach der Ligation durch ein denaturierendes PAGE-Gel (s.u.) wieder entfernt werden. Prinzipiell sollte auch ein enzymati-

scher Verdau durch *Exo I*-Nuklease möglich sein, doch führte diese Route nicht zum Erfolg. Auch nicht erfolgreich verlief ein Versuch, die einzelsträngige DNA direkt, also ohne Splint mit einer speziellen *Circ Ligase* zu ligieren, da keinerlei zirkuläres Produkt isoliert werden konnte.

Da bei der Aufreinigung von Einzel- oder auch Doppelsträngen mit Anionenaustausch-Chromatographie gute Erfahrungen gemacht wurden (siehe Abschnitt 3.1.8.5) ist der Gedanke verlockend, auch die einzelsträngigen Ringe chromatographisch zu trennen. Zwar können auch denaturierende Bedingungen eingestellt werden und somit die Splinte abgetrennt werden, doch gelingt anders als durch PAGE die Trennung von linearen und zyklischen Produkten gleicher Länge nicht, da die Anzahl der Ladungen der beiden Produkte fast identisch ist.

Der Umweg über die Synthese einzelsträngiger Ringe ist somit zwar ein Mehraufwand, doch bietet diese Syntheseroute auch mehrere Vorteile. Ein Vorteil ist, dass bei Zugabe der fehlenden Stränge und evtl. Ligation keine größeren linearen Produkte oder Polymere entstehen können. Das einzige größere Produkt sind die gewünschten doppelsträngigen Ringe. Daher waren die Ausbeuten an doppelsträngigen Ringen (gerade bei frühen Designs mit nicht optimaler Sequenz) in der Regel höher als beim gleichzeitigen Hybridisieren aller beteiligter Einzelstränge. Das Hybridisierungsprodukt bzw. Ligationsprodukt der Synthese mit einzelsträngigen Ringen kann nun direkt über ein natives Gel oder Anionenaustausch-Chromatographie von in leichtem Überschuss eingesetzten Oligonukleotiden abgetrennt werden. Diese Methode ist besonders dann wertvoll, wenn bestimmte Bestandteile eines *ds minicircles* nur in sehr geringen Mengen vorliegen (wie etwa die Polyamid-modifizierten Oligonukleotide, siehe Abschnitt 3.6.3), denn die Ausbeuten dieser Synthesen scheint nach Auswertung von Gelen und HPLC-Chromatogrammen in Bezug auf die einzelsträngigen Ringe annähernd quantitativ zu verlaufen und nur von Verlusten bei der Aufarbeitung limitiert zu sein.

3.1.8 Aufreinigung der *minicircles*

Im Laufe dieser Arbeit wurde eine große Vielfalt von Methoden zur Aufreinigung von DNA und DNA-*minicircles* getestet und angewandt. In diesem Kapitel sollen die wichtigsten dieser Methoden mit ihren Vor- und Nachteilen in Bezug auf die *minicircle*-Synthesen vorgestellt werden.

3.1.8.1 Zweidimensionale native Gelelektrophorese

An mehreren Stellen wurden bereits die PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) angesprochen. Daneben wurden auch Agarose Gele für größere Architekturen oder Komplexe aus mehreren *minicircles* eingesetzt. Polyacrylamid-Gele (inkonsequenter Weise auch PAGE-Gele genannt) gibt es als native Gele oder als denaturierende Gele.

In den ersten Arbeiten zu *minicircles* nutzen Ulanovski et al.¹⁸⁵ zweidimensionale PAGE mit Chloroquin in der zweiten Dimension (siehe Kapitel 3.2.3). Dieses Verfahren erlaubte es den Autoren, die Zirkularisierungseffizienz abhängig von der Länge des Ligationsproduktes zu bestimmen.

Die erste Dimension ist ein natives Gel, bei dem die Ligationsprodukte der Länge nach aufgetrennt werden (siehe Abbildung 43 A). Nun können einzelne Banden oder eine ganze Bahn ausgeschnitten werden und die Gelstücke für die zweite Dimension in ein weiteres Gel eingegossen werden. Dieses Gel enthält zusätzlich den Interkalator Chloroquin, welcher sich in die DNA-Basenstapel einlagert und die Krümmung der DNA weitet. Zirkularisierte DNA kann nicht geweitet werden und behält dadurch eine erniedrigte elektrophoretische Mobilität. Nicht kovalent geschlossene Ligationsprodukte der gleichen Länge (siehe Abbildung 43 B und C) werden jedoch geweitet und laufen schneller.

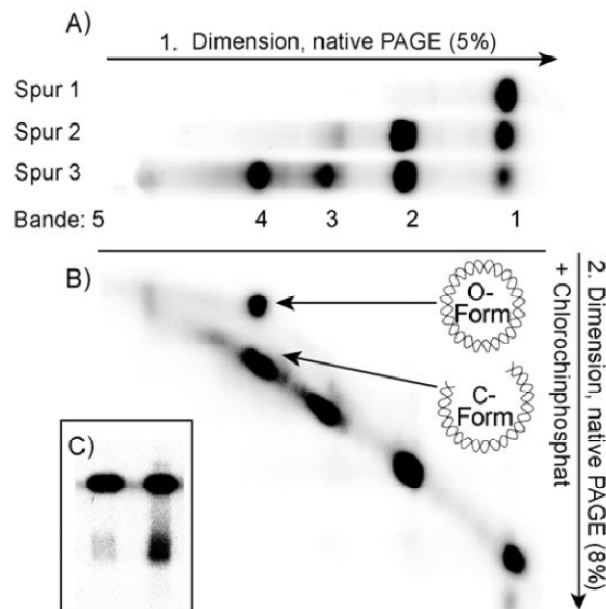


Abbildung 43 (aus Lit.¹⁸⁷): Auftrennung mit zweidimensionaler PAGE. A) Erste Dimension (native PAGE). Spur 1: nur ein Segment; Spur 2: Ligationsprodukt zweier Segmente; Spur 3: Ligationsprodukt aller 3 Segmente. B) Spur 3 wurde ausgeschnitten und in einer zweiten PAGE mit Chloroquin getrennt. Dadurch teilt sich die Bande 4 in die zirkuläre O-Form und die topologisch lineare C-Form auf. C) Zweite Dimension einer Ligation, welche mit BAL-31-Exonuklease behandelt wurde (links), rechts der Vergleich ohne Exonuklease-Behandlung.

Diese sehr zeitaufwändige Prozedur wurde zunächst übernommen, da es ein etabliertes Verfahren war und da damit auch *minicircles* mit Einzelstrang-Domänen aufgereinigt werden konnten.¹⁸⁷ Der Umweg wurde auch in Kauf genommen, da vermutet wurde, dass die Ligation der von Dr. Rasched verwendeten Interkalator-modifizierten DNA vielleicht nicht möglich sei. Rückblickend

wäre eine direkte Hybridisierung und Ligation aller beteiligter Oligonukleotide wahrscheinlich doch möglich gewesen, da die Ligation auch durch den Polyamid-Anker nicht gestört wurde (siehe Kapitel 3.6). In den ersten eigenen Synthesen wurden auch die *minicircles* für die Komplektierung mit der Polyamid-Stütze (Design siehe Abschnitt 3.2.3) mit zweidimensionalen Gelen aufgereinigt, jedoch erwies sich ein enzymatischer Verdau oder denaturierende PAGE (siehe Abbildung 45) als der schnellere Weg.

3.1.8.2 Exonuklease-Verdau (*BAL-31*)

Für den enzymatischen Verdau wurde die Exonuklease *BAL-31* eingesetzt, welche auch eine gewisse Endonuklease-Aktivität an Einzelsträngen und *nicks* (fehlende Verknüpfung der 3'-OH Gruppe und des 5'-Phosphates) zeigt, sonst aber als reine Exonuklease fungiert. Infolgedessen verdaut *BAL-31* alle Ligrationsprodukte, die nicht doppelsträngig zirkularisiert sind (siehe Abbildung 44).

Der Exonuklease-Verdau ist bei linearen Produkten sehr schnell und gründlich, bekanntermaßen ist die Endonuklease-Aktivität an *nicks* deutlich schwächer ausgeprägt. Zu sehen ist dies etwa in Abbildung 45 b auf der mittleren Bahn, auf der Exonuklease-aufgereinigte und mit einem PCR (*polymerase chain reaction*, Polymerase-Ketten-Reaktion)-Isolationskit isolierte Ringe aufgetragen wurden. Unter der hellen Bande, die dem *ds minicircle* entspricht, gibt es eine Bande für den *ss minicircle* und das lineare (168 bp lange) Fragment. Auch in Abbildung 43 c ist eine schwache Bande des geöffneten Ligrationsproduktes zu sehen. Der Anteil an nicht komplett kovalent geschlossenen *minicircles* kann bei größeren Ansätzen als der radioaktiv markierten Synthese deutlich höher sein, jedoch wirken sich *nicks* in AFM-Aufnahmen nicht störend aus. Daher ist eine Abtrennung von *minicircles* mit *nicks* für die meisten Anwendungen nicht erforderlich. Sollte dies dennoch erwünscht sein, kann (wie in Abbildung 45) eine denaturierende PAGE durchgeführt werden.

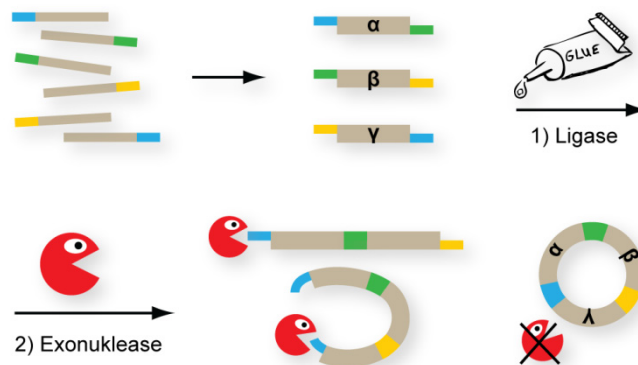


Abbildung 44: Schematische Darstellung einer *minicircle*-Synthese durch Ligation von einzelnen Segmenten und nachfolgendem Exonuklease-Verdau nicht zirkulärer Ligrationsprodukte.

Zwischen Ligation und dem Exonuklease-Verdau muss der Puffer gewechselt werden, da die Exonuklease in Ligase-Puffer kaum aktiv ist. Dazu wurde entweder eine Ethanol-fällung oder eine Aufreinigung mittels eines PCR-Isolationskits durchgeführt. Letztere Aufreinigung ist zwar nicht so kostengünstig wie eine Ethanol-fällung, lieferte aber manchmal bessere Ausbeuten und dauert nur wenige Minuten. Eine Verlängerung des Exonuklease-Verdau über 60 Minuten hinaus war nicht nötig, schadete der Ausbeute jedoch auch nicht merklich. Eine Beeinträchtigung der Aktivität durch Polyamid-Anker-substituierte Oligonukleotide (s.u.) war nicht festzustellen.

3.1.8.3 Denaturierende PAGE

Denaturierende PAGE wird dann eingesetzt, wenn alle nicht kovalenten Wechselwirkungen, also auch Sekundärstrukturen gebrochen werden sollen. Dafür wird dem Gel Harnstoff zugesetzt, der die Wasserstoffbrücken der Watson-Crick-Basenpaarungen stört und zusätzlich werden im Vergleich zu nativer PAGE höhere elektrische Leistungen angesetzt, die das Gel aufheizen. Bei dem eingesetzten vertikalen Gelsystem (Biorad Protean II) kam es leider aufgrund von Temperaturgradient-induzierten Spannungen in den Deckgläsern zum Bruch mehrerer Gläser. Um Temperaturgradienten zu minimieren wurde die Gelkammer daher in einem Wärmeschrank bei etwa 45-50°C mit einer Leistung von max. 15 W laufen gelassen und die elektrischen Kabel nach draußen geleitet.

In *minicircle*-Synthesen bietet sich denaturierende PAGE als Alternative zu zweidimensionalen nativen Gelen oder einem Exonuklease-Verdau an und war die einzig erfolgreiche Methode um einzelsträngige *minicircles* (siehe Abschnitt 3.1.7) zu isolieren.

Um die Banden sowohl von denaturierenden als auch nativen Gelen sichtbar zu machen, wurden die Gele nach beendeter Elektrophorese mit SybrGreen® oder SybrGold® gefärbt.

Anfangs wurden die Gele mit einer kommerziell erhältlichen Fertiglösung gegossen (Appllichem) doch waren diese Gele kaum UV-durchlässig und dadurch war die Nachweisempfindlichkeit und das Signal-Rausch-Verhältnis der Bilder extrem schlecht. Trotz intensiver Bemühungen, dem Fehler auf den Grund zu gehen konnte der Hersteller die Probleme nicht beheben und es wurden stattdessen PAGE-Gele selbst aus den Einzelkomponenten frisch angesetzt.

Bei der Ablichtung mit einem neu angeschafften Geldokumentationsgerät waren anfänglich mit dem bloßen Auge die fluoreszierenden Banden besser zu sehen als auf den Bildern, die die Kamera lieferte (Abbildung 45 a). Durch den Austausch des mitgelieferten „Universal“-Vorsatzfilters für das Kameraobjektiv durch einen auf die Emissionswellenlänge der Sybr-Farbstoffe beschränkten Filter konnte dieses Problem gelöst werden und das Hintergrundleuchten der Gele wurde um ein Vielfaches reduziert (Abbildung 45 b). Fluoreszierende Flecken, wie jene auf Abbildung 45 c stammen von Fingerabdrücken von den bei der Manipulation der Gele verwendeten Nitril-Handschuhen. Dieses Flecken konnten dadurch vermieden werden, dass über die Nitril-Handschuhe Latex-Handschuhe gezogen wurden.

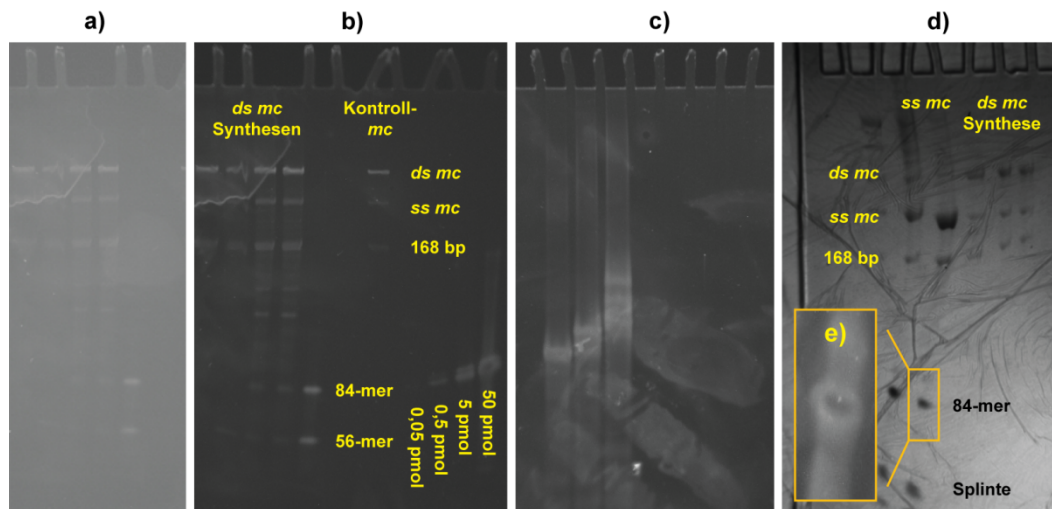


Abbildung 45 a) PAGE-Gele (SybrGold-gefärbt), aufgenommen mit „Universalfilter“. b) Dasselbe Gel aufgenommen unter denselben Bedingungen aber mit „Sybr“ Objektivfilter. c) Fluoreszierende Fingerabdrücke von Nitrilhandschuhen auf dem Gel. d) UV-shadowing (siehe Text) im Vergleich zu einer Fluoreszenz-Aufnahme(e).

Auf den Gelen a), b) und d) sind jeweils denaturierende PAGE-Gele von einzelsträngigen und doppelsträngigen Ringsynthesen zu sehen. b) zunehmende Mengen von einem 70-mer (rechts). Vom Kontroll-minicircle (mc) (Mitte) wurden 0,3 pmol aufgetragen.

Für präparative Gele, in denen größere Mengen DNA aufgetragen wurden, hat sich das sogenannte *UV-shadowing* (*shadow* = Schatten) bewährt. Hierzu wird das Gel auf eine fluoreszierende Unterlage (z.B. eine Dünnschichtchromatographie-Platte) gelegt und mit einer UV-Handlampe bestrahlt. Die DNA der Gelbanden absorbiert die UV-Strahlung, daher sind unter den Banden Schatten (Abbildung 45 d) zu sehen, die dann markiert und ausgeschnitten werden können. Abbildung 45 e zeigt einen Ausschnitt desselben Gels, welches nach *UV-shadowing* fluoreszenzgefärbt wurde. Die Helligkeit der Fluoreszenz ist dabei in der Mitte der Bande niedriger als an den Rändern und ober- und unterhalb der Bande. Dieser Effekt kommt daher, dass durch die extrem hohe Dichte von DNA und Fluorophor die Fluoreszenz in diesem Bereich intern gequenchet wird. Daher kann aus der Intensität der Fluoreszenz nur bei niedrigen DNA-Mengen - also bei analytischen Gelen - auf die Menge der in der Bande enthaltenen DNA geschlossen werden.

3.1.8.4 Elutionsmethoden aus Gelen

Native oder denaturierende PAGE-sowie Agarose-Gelelektrophorese können nicht nur zu analytischen Zwecken durchgeführt werden; es gibt viele Möglichkeiten, die entsprechenden Banden zu eluieren. Die klassische Variante sieht das Anfärben der Gele mit Fluoreszenzfarbstoffen und das Ausschneiden der gewünschten Banden vor, gefolgt von einem mechanischen Zerkleinern der Gelstücke zum Zweck der Oberflächenvergrößerung und Diffusion unter Schütteln in

einen Elutionspuffer. Die festen Bestandteile werden durch Filtration durch Glaswolle entfernt und die DNA mittels Ethanol-fällung aufkonzentriert. Dieses Verfahren hat sich nicht bewährt, da auf AFM-Bildern der so gewonnenen *minicircles* viele DNA-Bruchstücke (Abbildung 60 links) und auch größere Bruchstücke des Gels zu sehen waren. Auch eine Mikrozentrifugation konnte die vermutlichen Gelbruchstücke nicht effektiv entfernen.

Alternativ hat sich bewährt, die ausgeschnittenen Gelbanden entweder per Elektroelution zu eluieren, oder die nur wenig zerkleinerten Gelstücke über Nacht und ohne Agitation bei Raumtemperatur zu eluieren. Anschließend wurde die DNA entweder über Ethanol-fällung, über Membran-Mikrozentrifugation (Amicon®-Säulen von Millipore) oder über PCR-Extraktionskits isoliert (siehe Abschnitt 3.1.8.6).

Eine Elution aus Agarosegelen sollte laut Gebrauchsanweisung auch durch Auflösen der Agarose und Aufreinigung mittels PCR Isolationskits gelingen. In der Praxis jedoch war die Ausbeute bei dieser Methode schlecht und AFM-Aufnahmen zeigten viele Ringe nicht mehr intakt. Ebenso wenig praktikabel erwies sich eine Isolation von DNA-*minicircles* mit „freeze’n squeeze®“ Mikrozentrifugationssäulen (BioRad). Bei dieser Methode waren viele große Fremdkörper, vermutlich Gelreste, auf den AFM-Aufnahmen zu sehen.

Eine besonders schonende Methode für die Elution von Banden aus Gelstücken ist die Elektroelution. Hierfür wird an das in Puffer gelegte Gelstück in eine spezielle Apparatur eine elektrische Spannung angelegt. Dadurch wird die DNA wie bei der Elektrophorese in Richtung der Anode beschleunigt. In Wanderungsrichtung passiert die DNA erst eine semipermeable Membran, dann wird sie an einer anderen Membran zurückgehalten. Aus dieser Elutionskammer kann die DNA oder die DNA-Architektur entnommen werden und aufkonzentriert werden (Abschnitt 3.1.8.6). Diese Methode wurde als sauberere und schonendere Alternative zu der Diffusion unter Schütteln durchgeführt, ist aber teurer und aufwändiger als die rein Diffusionsgetriebene Elution.

3.1.8.5 Anionenaustausch-Chromatographie als Alternative zu Gelelektrophorese

Für bestimmte Anwendungen konnte eine schwache Anionenaustausch-Chromatographie als Alternative zu Gelelektrophorese etabliert werden. Bei dieser Methode wird der aufzutrennende anionische Analyt, in diesem Fall DNA, auf eine Amino-modifizierte HPLC-Säule (z.B. DNAPac PA 200 der Firma Dionex) gegeben und mit einem steigenden Salzgradienten (z.B. NaCl oder NaClO₄) eluiert. Die steigende Ionenkonzentration des Elutionspuffers tritt in Konkurrenz mit der DNA, löst ihre ionischen Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial und infolgedessen wird die DNA der Länge nach eluiert.

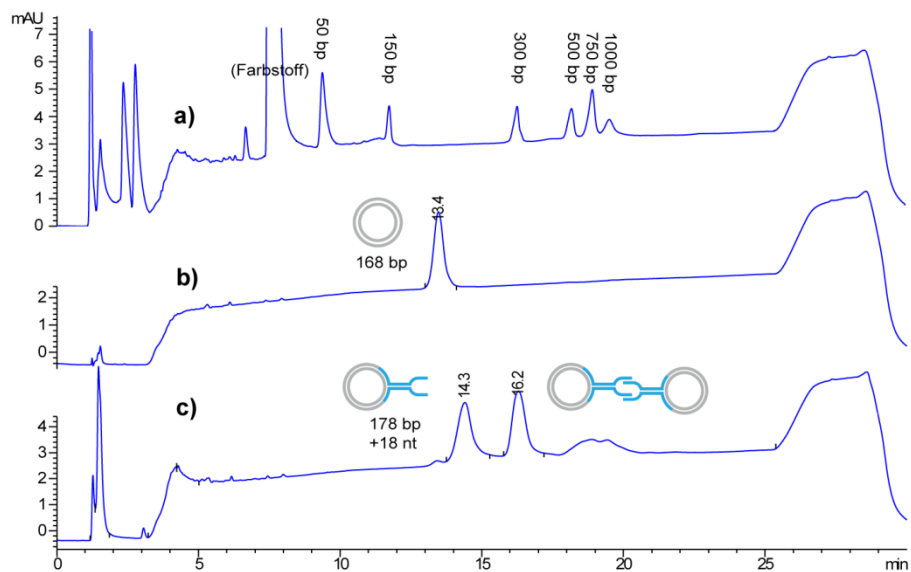


Abbildung 46: Anionenaustausch-HPLC-Chromatogramme. a) Handelsübliche DNA-Leiter für Gelelektrophorese. b) Ein doppelsträngiger minicircle (ca. 500 fmol). c) Chromatogramm eines G-reichen Stimmgabel-minicircles. Dieser bildet Natriumionen-induzierte Dimere (Kapitel 3.8).

Theoretisch ist durch den Zusatz von denaturierenden Reagenzien wie Harnstoff oder Formamid zum Laufpuffer oder durch hohe Temperaturen auch denaturierende Chromatographie möglich. Für die Aufreinigung von *ss minicircles* (Abschnitt 3.1.7) eignet sich jedoch weder native noch denaturierende Anionenaustausch-Chromatographie, da lineare und zirkuläre Stränge wegen der fast gleichen Anzahl von Ladungen die gleiche Retentionszeit aufweisen. Hervorragend gelingt es jedoch, *ds minicircles* aufzureinigen und sie von Proteinen und kurzen Fragmenten zu trennen.

Bei unverzweigten *minicircles* jedoch ist ein Exonuklease-Verdau und eine Aufreinigung mit PCR-Extraktions-Kits die schnellere Alternative (Abschnitt 3.1.8.6). Bei verzweigten *minicircles* kann die Synthese an einem *ss minicircle*-Templat erfolgen (siehe Abschnitt 3.1.7), was zu weniger Nebenprodukten und besseren Ausbeuten führt. In neuesten Experimenten gelang sogar eine hohe Ausbeute an korrekt zusammengesetzten *minicircles* selbst wenn komplett auf Ligation oder den Einsatz von *ss minicircles* verzichtet wurde. Dass dies anders als bei frühen Designs nun möglich ist, liegt vermutlich an Verbesserungen im Sequenzdesign und einer günstigen Wahl der „Schnittstellen“ im Ring also der *sticky ends*. (Abschnitt 3.1.9).

Als problematisch gestaltete sich jedoch die Aufreinigung von sehr langen Einzelsträngen, wenn teilweise selbstkomplementäre Sequenzen enthalten waren oder die Aufreinigung von Segmenten mit langen *sticky ends*. Hier kam es vermutlich zu Sekundärstruktur-Bildungen die zu zusätzlichen Peaks, Verbreiterung von Peaks oder verzögerten Retentionszeiten führte.

3.1.8.6 Aufkonzentration von verdünnten Lösungen

Nach den meisten Methoden zur Aufreinigung wie zum Beispiel der Elution aus Gelen oder der Anionenaustausch-Chromatographie oder nach enzymatischen Reaktionen sind die gewünschten Produkte meist in großen Puffermengen oder in für nachfolgende Schritte ungeeigneten Puffern gelöst. Auch zum Aufkonzentrieren und Umpuffern gibt es verschiedene Wege.

Die klassische Ethanol-fällung hat den Vorteil, dass etwa vorhandene Fluoreszenzfarbstoffe aus den Gelen wie etwa der Interkalator Ethidiumbromid oder organische Verbindungen aus einer Kupplungsreaktion meist mit dem Ethanol entfernt werden können. Durch die Wahl des vor der Ethanol-fällung zugegebenen Salzes (z.B. Ammoniumacetat, Natriumacetat oder auch Natriumchlorid) kann man die Gegenionen für die DNA nach der Umfällung festlegen.

Soll – beispielsweise für die Auftragung auf ein Gel – das Volumen einer DNA enthaltenen Lösung verringert werden, so kann eine Butanol-Extraktion durchgeführt werden. Damit lassen sich Volumina auf einen Bruchteil der Anfangsmenge verringern. Allerdings werden dabei auch Puffersalze und hydrophile Bestandteile aufkonzentriert.

Die schnellste Methode zum reinen Umpuffern bieten Größenausschlusschromatographie-Säulen (bspw. G25-Säulen der Fa. GE Healthcare). Mit diesen Säulen können (nicht zu kurze) DNA-Fragmente, beispielsweise vor einer HPLC-Trennung, von Überschüssen an Kupplungsreagenzien oder unerwünschten organischen Lösemitteln befreit werden.

Eine erst in der Schlussphase der Doktorarbeit genutzte Methode ist die Zentrifugation durch Mikrozentrifugationssäulchen mit Größenausschluss-Membranen. Diese Säulchen sind mit Membranen für Molekülgrößen ab 3 kDa bis 100 kDa unter dem Namen Amicon (früher Centricon) bei der Firma Millipore erhältlich. Diese Methode wurde oft zum Aufkonzentrieren nach einer Elution oder HPLC-Aufreinigung genutzt, ist aber auch dazu geeignet, Mischungen von Molekülen mit sich stark unterscheidenden Molekülgrößen zu trennen.

Die schnellste Methode, bei der ebenfalls organische Reste, Proteine und sehr kurze DNA-Fragmente entfernt werden können, bieten die PCR-Extraktionskits. Diese haben allerdings den Nachteil, dass DNA nur bis zu einer Länge von ca. 10 kbp eluiert werden kann und eignen sich daher z.B. nicht für *Rolling Circle Amplification*-Produkte (Kapitel 3.11).

Während alle dieser Methoden für komplett doppelsträngige Ringe geeignet schienen, empfiehlt sich für verzweigte *minicircles* (z.B. G-Quadruplex-Module, Kapitel 127) oder die relativ labilen Rotaxane (Kapitel 3.10) nur die Membran-Mikrozentrifugation, da die DNA-Gebilde dabei stets unter nativen Bedingungen in Lösung bleibt und dadurch die strukturelle Integrität, anders als etwa bei der Ethanol-fällung, erhalten bleibt.

3.1.9 Sequenzdesign von DNA-*minicircles*

Die Synthese aller artifiziellen Strukturen aus DNA steht und fällt mit einer geeigneten Wahl der Sequenzen der beteiligten Oligonukleotide. Mit dem Design von DNA-Sequenzen für Nanoarchitekturen haben sich bereits mehrere Fachartikel beschäftigt,¹⁸⁸ es gibt sogar bereits Computer-Programme, mit deren Hilfe die Sequenzen optimiert werden können wie z.B. SEQUIN¹⁸⁹ NUPACK¹⁹⁰ (www.nupack.org) oder NANEV¹⁹¹. Speziell für DNA-Origami mit dem M13-Strang kann eine Software benutzt werden, mit welcher sich mithilfe von beliebigen Bilddateien Sequenzen für *staple strands* entwerfen lassen.¹⁹²

Doch erschienen die speziellen Anforderungen für diese Projekte (*A-tracts*, Bindungsstellen für Polyamide) damit nicht ohne weiteres umsetzbar zu sein. Daher wurden alle Sequenzen dieser Arbeit manuell entworfen und mithilfe von internetbasierten Werkzeugen zur Vorhersage der thermodynamischen Werte (besonders der Schmelztemperatur) und der Vorhersage von möglichen Sekundärstrukturen von Sequenzen verbessert. Bewährt hat sich dabei besonders das Angebot der Firma Integrated DNA Technologies, der „IDTOligoAnalyzer 3.1“,¹⁹³ welcher verschiedene Modelle (u.a. Mfold)¹⁹⁴ bei den Vorhersagen der Struktur und thermodynamischen Werten berücksichtigt.

Ohne Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben, scheinen die Kriterien

- 1) Einzigartigkeit der Sequenzen
- 2) Vermeidung von Sekundärstrukturen
- 3) Geeignete Wahl von *sticky ends* für einen effizienten Ringschluss
- 4) Sauberkeit der Oligonukleotide

für ein funktionierendes *minicircle*-Design relevant zu sein. Diese Kriterien sollen im Folgenden einzeln diskutiert werden.

3.1.9.1 Einzigartigkeit von Sequenzen

Die Einzigartigkeit von Sequenzen dient dazu, dass sie nur an der vorhergesehenen Stelle mit dem dafür vorgesehenen Gegenstrang hybridisieren kann. Hybridisiert ein Strang an ein falsches Oligonukleotid oder an eine andere Stelle, so senkt das folglich die Ausbeute für die gewünschte Struktur. Das Kriterium der Einzigartigkeit kann beim Design von *minicircles* nur bedingt angewendet werden, da die *A-tracts* dem Muster



(mit N für eine beliebige Base) folgen und durch die Selbstähnlichkeit automatisch eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, mit einem falschen Strang zu hybridisieren als randomisierte Sequenzen. Faktisch bleibt der Gestaltungsspielraum daher auf die 5 bp langen Füllsequenzen zwischen den *A-tracts* beschränkt. Anders als in frühen Designs (z.B. in den Designs aus Kapiteln 3.2.3, 3.5 oder 3.7.1) sollten Zwischensequenzen nur noch einmal pro *minicircle* eingesetzt werden. Die ursprüngliche Annahme, dass Zwischensequenzen auch mehrmals eingesetzt werden können,

solange sie einmal nach einer A₅ das andere Mal nach einer A₆-Sequenz zu liegen kommen, wurde aus einem zu starren Modell von DNA abgeleitet. Tatsächlich ist (gerade einzelsträngige) DNA nicht so starr wie zwei Papierstreifen, der verschoben werden kann, bis eine maximale Anzahl von Basenpaarungen gebildet wird. Stattdessen können auch *bulges* und andere Sekundärstrukturen (siehe Abbildung 9) entstehen, die ebenfalls eine hohe Stabilität aufweisen können (Abschnitt 3.1.9.2).

Der mögliche Sequenzraum für Zwischensequenzen wurde für alle Projekte, in denen eine Bindungsstelle für Polyamide eingebaut wurde (siehe Abschnitte 3.2, 3.5, 3.7 und 3.6), zusätzlich eingeschränkt. Hier war darauf zu achten, dass durch die Füllsequenzen nicht versehentlich eine weitere ungewollte Bindungsstelle für die beteiligten Polyamide entstand. Besonders schwierig gestaltete sich das Design bei der heterobifunktionalen Polyamid-Stütze, da die Bindestelle (oder auch nur eine einzelne Fehlpaarung) für das **Polyamid-B**

5'-WWGGWWW

gerade an den Übergängen zu den A-reichen Sequenzen leicht entsteht. Vom Gesichtspunkt des Sequenzdesigns und auch weil **Polyamid-B (PA-B)** schwächer zu binden scheint als **Polyamid-A (PA-A)** (vgl. Abschnitte 3.2.4 und 3.4.2) ist **PA-B** gegenüber **PA-A** unterlegen. Daher wurde für den Polyamid-Anker (siehe Kapitel 3.6) das **PA-A** gewählt.

Die Einzigartigkeit von Sequenzen wurde mit dem Programm IDTOligoAnalyzer sowohl für Homo- als auch für alle möglichen Heterodimer-Bildungen untersucht.

3.1.9.2 Sekundärstrukturen

Fälschlicherweise wurde beim Sequenzdesign anfangs angenommen, dass Sekundärstrukturen wie Haarnadeln keine entscheidende Rolle spielen, da sie energetisch gegenüber einem Duplex mit komplett komplementärer Sequenz (wie er bei der *minicircle* Synthese ja zugegen ist) benachteiligt sind. Dies ist zwar der Fall, doch ist auch die Schmelztemperatur (T_m) von Strukturen und nicht allein deren freie Gibbs-Energie (ΔG) für deren Stabilität verantwortlich. Und entgegen der anfänglichen Intuition kann aus einem hohen ΔG -Wert auch nicht automatisch auf eine hohe Schmelztemperatur des Komplexes geschlossen werden. Dies machen die Beispiele aus Abbildung 47 deutlich.




			
$\Delta G =$	-38,3 kcal/mol	-7,5 kcal/mol	-13,5 kcal/mol
$T_m =$	65,7 °C	86,9 °C	23 °C

Abbildung 47: Vergleich zwischen einem intermolekularen Duplex (links) und einer von zwei hiermit konkurrierenden intramolekularen Haarnadel-Strukturen. Rechts ein Duplex mit denselben Basenpaarungen wie die Haarnadel. ΔG und T_m wurden mit dem IDTOligoAnalyzer berechnet.¹⁹³

Von allen drei Strukturen hat die Haarnadel (Abbildung 47 Mitte) die geringste freie Energie aber mit Abstand den höchsten Schmelzpunkt. Besonders fällt dabei auf, dass die Haarnadel und der rechte Duplex zwar dieselben 5 Watson-Crick-Basenpaarungen ausbilden aber die Schmelzpunkte mehr als 60°C auseinander liegen. Der hohe Schmelzpunkt der Haarnadel resultiert daraus, dass bei der Hybridisierung eines Duplexes zwei anfangs unabhängige Stränge zusammenfinden müssen, während eine Haarnadel geöffnet oder geschlossen nur aus einem Strang besteht. Bei einer Haarnadelbildung handelt es sich also um einen intramolekularen Prozess, bei dem nur eine Entropiestrafe für den Übergang von einem flexiblen Einzelstrang zu einer rigideren Haarnadel zu zahlen ist, während die Hybridisierung eines Duplexes mit einem zusätzlichen Entropieverlust verbunden ist da, aus zwei Einheiten ein einziger Komplex entsteht.

Nun wäre der höhere Schmelzpunkt von Haarnadeln¹⁹⁵ allein noch kein Problem für die Bildung von *minicircles*, wenn am Ende das absolute energetische Minimum erreicht würde. Das wäre also in Abbildung 47 der Duplex links, der energetisch gegenüber den konkurrierenden Haarnadeln (Mitte) klar bevorzugt wäre. *Minicircles*, wie praktisch alle Nanoarchitekturen auch, werden jedoch durch Abkühlen von hohen Temperaturen erzeugt. Aus den denaturierten Einzelsträngen bilden sich dabei Haarnadeln wie oben diskutiert schon bei höheren Temperaturen und können metastabil bleiben und so die Bildung der gewünschten Komplexes im absoluten Energieminimum verhindern. Dadurch stehen alle Stränge, deren Haarnadeln stabil bleiben, für den korrekten Zusammenbau der *minicircles* nicht mehr zur Verfügung und vermindern deren Ausbeute.

Interne Haarnadeln könnten nach der jetzigen Erkenntnis einer der wichtigsten Gründe für die geringen Ausbeuten früher Ringsynthesen sein. In einem Fall konnte ein *minicircle* trotz mehrfacher Versuche sogar gar nicht synthetisiert werden. Es handelt sich dabei um Ring A aus dem Catenan-Design mit Polyamid-Stütze (Abschnitt 3.7.1). Eine Erklärung für das Versagen dieses Designs liefert vermutlich die Analyse der möglichen Sekundärstrukturen mit Mfold¹⁹⁴ (Abbildung 48 a). Es sind mehrere Haarnadel-Strukturen zu sehen, zwei davon haben eine Doppelstrangregion aus C-G-Paaren und sind damit praktisch identisch mit der sehr stabilen Haarnadel aus Abbildung 47. Vermutlich ist aber nur eine dieser beiden Haarnadeln für das Scheitern der *minicircle*-Synthese verantwortlich, nämlich die Haarnadel mit 6 A in der Schleife – und natürlich entsprechend der Gegenstrang. Diese Sequenz befindet sich nämlich in der Mitte eines besonders kurzen Segmentes (Segment Gamma A, Abbildung 48 b). Haarnadeln sind jedoch besonders dann stabil, wenn die Schleifenregion oder die Überhänge vor oder nach dem Stamm der Haarnadel zu kurz sind, um mit einem Komplementärstrang zu hybridisieren und nachfolgend die doppelsträngige Region der Haarnadel aufzutrennen. Beginnt die Hybridisierung mit den Überhängen, gleicht der Mechanismus dem beim *toehold strand displacement* (Abbildung 22). Beginnt die Hybridisierung hingegen in einer längeren Schleifenregion, so kann die Haarnadel ebenfalls, ähnlich wie beim der Hybridisierung eines *molecular beacons* mit seiner Zielsequenz,¹⁹⁶ aufgetrennt werden.

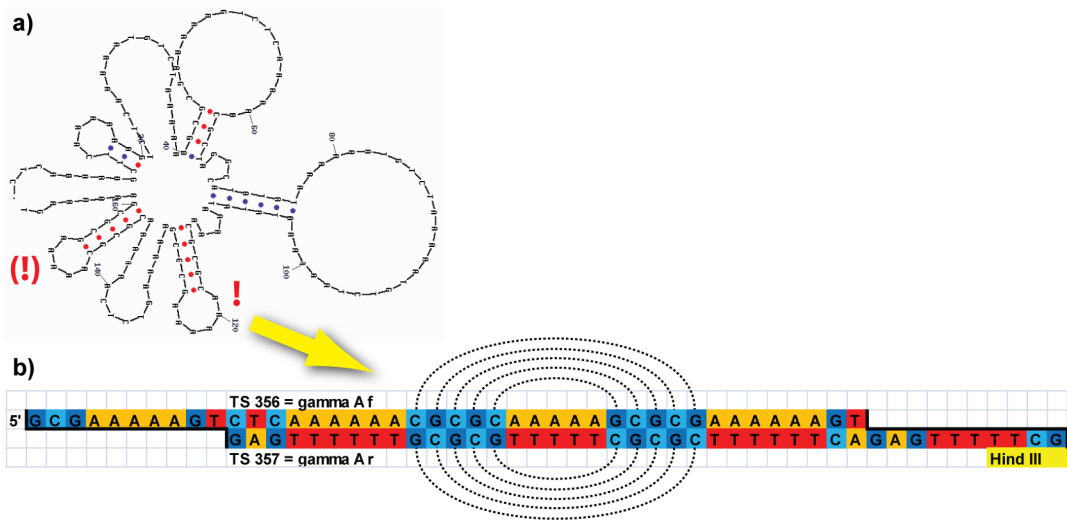


Abbildung 48 a) Mfold-Struktur¹⁹⁴ des A-reichen Stranges eines Ringdesigns (siehe Abschnitt 3.7.1), bei dem die minicircle-Synthese nicht möglich war. Besonders die mit Ausrufezeichen markierten Haarnadeln haben sehr hohe Schmelzpunkte. b) Eine dieser Haarnadeln stammt aus dem Segment Gamma des Designs und war vermutlich verantwortlich für das Scheitern der Synthese.

Im Gegensatz zu anderen *minicircles*, in denen sich teilweise dieselbe Haarnadelsequenz findet (z.B. dem Anker-*minicircle* aus Abschnitt 3.6.2) sind hier in der Nachbarschaft der G-C-reichen Sequenzen nur noch recht kurze und zudem A-T-reiche Sequenzen zu finden gewesen. Diese reichten vermutlich nicht aus, um einen *toehold strand displacement* auszulösen, das Segment Gamma zu bilden, und damit die Synthese des Ringes zu ermöglichen.

3.1.9.3 Polymerisation und Ringschluss

Am Anfang der Arbeit und während den Arbeiten von Dr. Rasched kam die Frage auf, welche Größe die entstandenen Ringe hatten. Bei allen Designs mit 3 Segmenten α , β und γ kann es auch zu einer Dimerisierung der entsprechenden Einheiten (etwa zu $-\alpha-\beta-\gamma-\alpha-\beta-\gamma-$) und nachfolgendem Ringschluss kommen (siehe Abbildung 49).

Der entstandene Ring wäre dann doppelt so groß und doppelt so lang (336 statt 168 bp). In Gelen liegen die Banden von *ds minicircles* zwischen 300 und 400 bp (bezogen auf die Referenzleiter), was für die Vermutung doppelt so großer Ringe spräche. Allerdings haben schon *A-tract*-haltige Sequenzen eine deutlich geringere elektrophoretische Mobilität als randomisierte Sequenzen gleicher Länge und daher ist es plausibel, dass Ringe eine noch ausgeprägter niedrigere Mobilität als lineare Fragmente haben. Anhand der Größe der *minicircles* auf ersten AFM-Aufnahmen und anhand der Diffusionskoeffizienten in FCS-Experimenten (siehe Abschnitt 3.2.7) konnten doppelt so große Ringe jedoch ausgeschlossen werden.

Aber auch theoretische Überlegungen lassen die Synthese von doppelt so großen Ringen unwahrscheinlich erscheinen. Zum einen sollte die Zyklisierungswahrscheinlichkeit nach

Ulanovski¹⁸⁵ (siehe Abbildung 41) bei so großen Ringen gegen null gehen. Da gerade in den ersten Designs über weite Teile der Ringe dieselben Sequenzen wie von Ulanovski verwendet wurden, sollte auch bei den eigenen Ringen ein einfacher Ring gegenüber dem doppelt so großen Ring stark begünstigt sein.

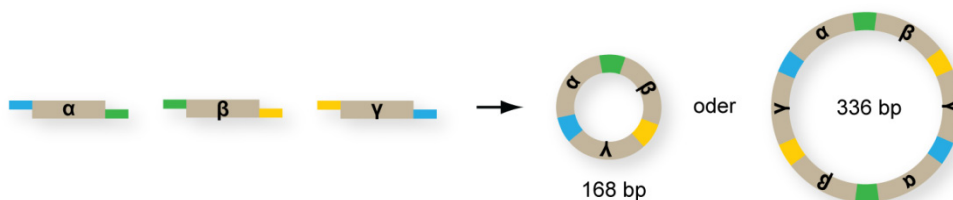


Abbildung 49: Zwei mögliche Ringgrößen bei der Synthese von minicircles aus 3 verschiedenen Segmenten.

Der andere Grund, der gegen die doppelt so große Ringe spricht, ist, dass Ringschlüsse gegenüber Polymerisierungen in bestimmten Fällen entropisch begünstigt sind, da es sich beim Ringschluss um eine intramolekulare Reaktion handelt. Daher erscheint es plausibel, dass analog zu den höheren Schmelztemperaturen der Haarnadeln gegenüber einem Duplex (siehe oben) auch die Ringschlüsse bei höheren Temperaturen stattfinden als die konkurrierende Dimerisierung. Wenn diese Überlegung zutrifft, so ist die Verteilung der Ringschlussausbeuten bei verschiedenen Längen der Segmente in Abbildung 41 nicht nur vom Grad der intrinsischen Krümmung abhängig, sondern ist überlagert von diesem entropischen Effekt. So ließen sich auch die Differenzen in den beobachteten und den nach der intrinsischen Krümmung zu erwartenden Ringgrößen erklären. Nach der NMR-Struktur von MacDonald¹⁸² und den Studien von Tchernenko¹⁷⁹ beträgt die intrinsische Krümmung eines *A-tracts* übereinstimmend 19° . Doch errechnet man aus dieser Krümmung die optimale Ringgröße ($360^\circ/19^\circ$), so müsste sie bei etwa 19 Helixwindungen liegen und nicht wie beobachtet bei etwa 12-14 Windungen (siehe Abbildung 41).

Dennoch traten soweit sich das anhand der Daten noch rekonstruieren lässt, bei allen Synthesen auch zu einem geringen Anteil doppelt so große Ringe auf. So wurden auf AFM-Aufnahmen auch einzelne doppelt so große *minicircles* ausgemacht (z.B. Abbildung 88 g) und in Gelen von *minicircle*-Synthesen nach Exonuklease-Verdau waren auch meistens schwache Banden bei der doppelten Ringgrößen zu sehen. Erwartungsgemäß war diese obere Bande bei einem Design, welche nur 12 *A-tracts* enthielt (Kapitel 3.5) deutlicher ausgeprägt als bei Designs mit 16 *A-tracts*, da hier die Summe der Krümmung niedriger war.

Ein Faktor, der bei den verschiedenen *minicircle*-Designs mehrfach geändert wurde, war neben den Sequenzen die Länge der *sticky ends*. In dem ersten Design waren die *sticky ends* nur 5 nt lang. Bei dieser Länge und gerade bei einem hohen A-T Gehalt liegt die resultierende Schmelztempe-

ratur unter der Raumtemperatur. Zwar sind auch in vielen anderen Beispielen in der Literatur die *sticky ends* beim Aufbau von Nanoarchitekturen nicht länger, doch stabilisieren dort (etwa in 2D-Kristallen aus DNA-Kacheln oder in 3D-Kristallen) kooperative Effekte diese schwachen Interaktionen. Bei der *minicircle*-Synthese gibt es aber keine Kooperativität der beteiligten Segmente und daher wurde die Länge der *sticky ends* erst auf 10 nt (siehe Kapitel 3.5), bei einem anderen Design sogar auf 20 nt Länge erhöht. Gerade die Erhöhung auf 20 nt erscheint nach meinem heutigen Kenntnisstand jedoch nicht mehr sinnvoll. Zwar ist die Verlängerung der *sticky ends* gerade bei nicht vollständiger Ligation oder beim Weglassen der Ligation von Vorteil, da die Struktur dann allein durch die Hybridisierung zusammengehalten wird, doch ist eine Erhöhung der Länge und damit der Schmelztemperaturen aller *sticky ends* gleichermaßen möglicherweise sogar nachteilig für eine gute Ausbeute an *minicircles*. Durch die Verlängerung auf 20 nt unterscheiden sich die Schmelzpunkte der Segmente und der *sticky ends* untereinander immer weniger. Möglicherweise ist aber ein weitestgehend definierter Zustand bei einer bestimmten Temperatur während des Abkühlens von Vorteil. In Abbildung 50 wird ein Modell postuliert, nachdem unterschiedlich lange *sticky ends* zu einer höheren Ausbeute führen sollten.

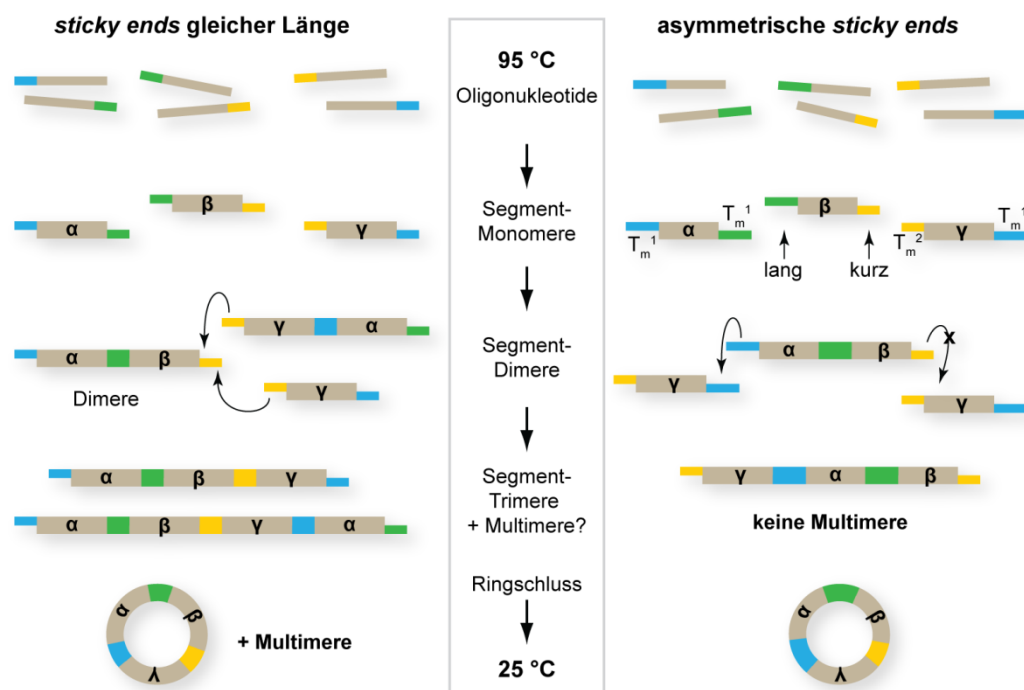


Abbildung 50: Hypothetischer Mechanismus der Multimer-Bildung bei der Synthese von *minicircles* aus Oligonukleotiden mit *sticky ends* gleicher Länge und Vermeidung der Multimer-Bildung durch Synthese mit asymmetrischen *sticky ends*. Von oben nach unten sind die vermuteten hybridisierten Komplexe im Verlauf der Abkühlung zu sehen (Diskussion im Text).

In der Abbildung sind stellvertretend für eine Vielzahl von statistisch möglichen Hybridisierungsprodukten einige typische abgebildet. Oben sind bei einer Temperatur von 95°C alle Oligonukleotide denaturiert und im Laufe des Abkühlungsprozesses (nach unten) bilden sich mehr und mehr Paarungen aus. Die intrinsische Krümmung der *A-tract*-Sequenzen ist der Einfachheit halber nicht abgebildet. Links ist eine Synthese gezeigt, in der alle *sticky ends* dieselbe Länge und damit ähnliche Schmelztemperaturen haben, rechts ein Design mit asymmetrischen *sticky ends*. Die blauen und grünen Sequenzen sind gegenüber der gelben Sequenz verlängert. Im ersten Schritt bilden sich aus den Oligonukleotiden die entsprechenden Segment-Monomere α , β und γ . Sinkt die Temperatur weiter ab, fangen die *sticky ends* an zu hybridisieren, wobei zunächst Segment-Dimere entstehen. In beiden Designs können diese Dimere nun mit einem weiteren Monomer hybridisieren. Das symmetrische Design links hat dabei keine Vorzugsrichtung, im asymmetrischen Design rechts hingegen ist die Hybridisierung des kürzeren *sticky ends* noch nicht wahrscheinlich. Des Weiteren kann es links anders als im asymmetrischen Design mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zusätzlich zu einer Hybridisierung von zwei Duplexen kommen, wobei ein Komplex aus 4 Segmenten entsteht, der keinen Ringschluss mehr eingehen kann. Rechts hingegen reagieren zu nächst alle verfügbaren Segmente zu $(-\gamma-\alpha-\beta-)$ ab. Erst wenn die Temperatur unter die Hybridisierungstemperatur des gelben *sticky ends* sinkt, kann ein Ringschluss (oder konkurrierend eine Polymerisation) auftreten. Links hingegen treten viele lineare Nebenprodukte auf und auch die Wahrscheinlichkeit von doppelt so großen Ringen dürfte höher liegen. Stimmt dieses Modell, so sollten *sticky ends* zukünftig asymmetrisch designet werden. Aufgrund analoger Überlegungen wurde im Übrigen auch Splinte für Splint-Ligationen (siehe 3.1.7) asymmetrisch entworfen.

Aber nicht nur das Sequenzdesign kann das Verhältnis von Ringen zu linearen Ligationen beeinflussen, sondern auch die absolute Konzentration der Oligonukleotide. Eine Polymerisation ist eine intermolekulare Reaktion, ein Ringschluss eine intramolekulare Reaktion. Ein intermolekularer Reaktionsverlauf wird durch eine hohe Konzentration der Edukte begünstigt, da die Wahrscheinlichkeit steigt, dass sich zwei geeignete Reaktionspartner treffen. Analog wird eine intramolekulare Zyklisierung hingegen durch niedrige Konzentrationen begünstigt. Diesen Parameter untersuchend, wurden Ringsynthesen bei unterschiedlichen absoluten Konzentrationen durchgeführt. Zwar ergaben sich wie erwartet Hinweise darauf, dass bei Reaktionen mit niedrigen Oligonukleotid-Konzentrationen eine höhere Ausbeute erzielt werden könnte, doch haben die Ausbeuteverluste bei der Aufarbeitung eines beispielsweise 10-fach höheren Reaktionsvolumens diese Vorteile wieder zunichte gemacht. Des Weiteren ist bei einem erhöhten Reaktionsvolumen der Enzym- und Pufferverbrauch entsprechend erhöht und macht die Reaktion unwirtschaftlicher. Daher wurden Ringsynthesen typischerweise bei den höheren Konzentrationen (mit etwa 100-200 pmol Oligonukleotiden in 100 μ l Reaktionsvolumen) durchgeführt.

3.1.9.4 Sauberkeit der Oligonukleotide

Bei der DNA-Festphasensynthese fallen aufgrund von nie zu 100 % verlaufenden Kupplungen zwangsläufig auch Abbruchfragmente an. Diese können in der Regel durch spezielle Umkehrphasen (RP)-Chromatographie-Säulchen, RP-HPLC oder denaturierende PAGE entfernt werden. Im Laufe der vorliegenden Arbeit sind Oligonukleotide von verschiedenen Firmen bezogen worden, wobei sich bei sehr langen oder modifizierten Strängen teilweise erhebliche Qualitätsunterschiede zeigten.

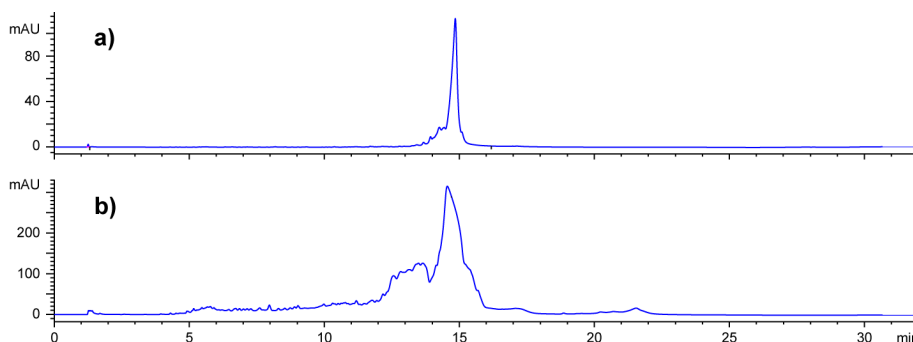
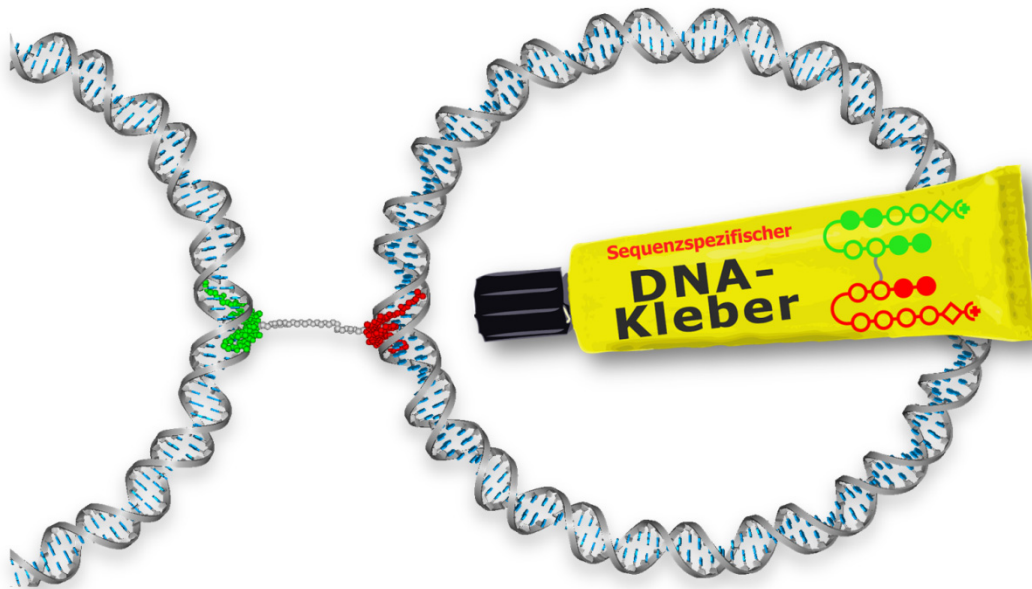


Abbildung 51: Anionenaustausch-HPLC-Chromatogramme eines Oligonukleotids (84-mer, HPLC-aufgereinigt, phosphoryliert) der Firmen Metabion (a) und Sigma-Aldrich (b).

Abbruchfragmente machen sich besonders dann negativ bemerkbar, wenn die Oligonukleotide ligiert werden und die Ligationsprodukte im nächsten Schritt enzymatisch oder per PAGE aufgereinigt werden. Der Anteil der Verunreinigungen vermindert die maximal mögliche Ausbeute dabei mit der Anzahl der Ligationsschritte in der Potenz. Beträgt der Anteil von Verunreinigungen in einer Lieferung beispielsweise 50 % (was teilweise leider vorkam), so wären bei einer Synthese eines *ss minicircles* mit 2 Ligationsschritten $(0,5)^2$ also maximal 25 % Ausbeute zu erwarten und bei einer *ds minicircle* Synthese mit 6 Ligationen $(0,5)^6$ sogar nur 1,6 %. Wie im Abschnitt zur Ligation (3.1.6) diskutiert, könnte auf Ligationen verzichtet werden und/ oder durch auf 12-14 Helixwindungen verkleinerte *minicircles* kürzere Oligonukleotide zum Einsatz kommen.

Ein weiteres Problem stellten nicht vollständig abgespaltene 5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppen dar. Bei einer Lieferung mehrerer phosphorylierter Oligonukleotide der Firma Ella Biotech befanden sich noch bis zu 40 % der Trityl-Schutzgruppen auf den Oligonukleotiden. Auch bei Kontrollen von Oligonukleotiden der Firma Metabion waren in Einzelfällen bis zu 10 % der Schutzgruppen nicht abgespalten. Dies liegt daran, dass nach Angaben der Fa. Metabion nur eine HPLC-Aufreinigung vor der Trityl-Abspaltung vorgenommen wird, danach aber nur eine Ethanol-fällung stattfindet. Trityl-Reste bei nicht-phosphorylierten Oligonukleotiden wurden jedoch nicht beobachtet. Da tritylierte Oligonukleotide ebenfalls die Ligationausbeuten absenken, sollten Lieferungen stichprobenartig kontrolliert werden oder ganz auf Ligation verzichtet werden.

3.2 Eine Polyamid-Stütze als sequenzspezifischer DNA-Kleber



Das zentrale Motiv von struktureller DNA-Nanotechnologie sind migrationsstabile DNA-Kreuzungen (siehe Abschnitt 1.3.1). Sie bilden die Grundlage für den Zusammenbau von DNA-Kacheln und DNA-Origami. Allerdings haben diese Kreuzungen den Nachteil, dass sie im Vergleich zur verhältnismäßig steifen, unverzweigten B-DNA sehr flexibel sind. In Vorträgen verwendet Seeman darum das Bild von in ein *marshmallow* (eine weiche, schaumige Süßigkeit) gesteckten ungekochten Nudeln. Zwar können die Strukturen etwa durch mehrere Kreuzungen stabilisiert werden, doch ist das nur mit vielen, genau zu diesem Zweck, künstlich designten Oligonukleotiden möglich. Hier sollte ein anderer Ansatz verfolgt werden. Mittels DNA-bindender Dervan-Polyamide als eine Art Kleber sollten zwei unverzweigte DNA-Stränge miteinander verbunden werden. Für das Verkleben zweier unterschiedlicher DNA-Stränge mussten zwei Dervan-Polyamide synthetisiert und über einen Linker miteinander verknüpft werden. Ein solches Molekül mit zwei Polyamiden (PA) erinnert an eine Stütze und soll daher im Folgenden kurz „Polyamid-Stütze“ genannt werden. Ein solches Molekül ist in ähnlicher Form schon einmal für die Erkennung von zwei in einem Nukleosom übereinanderliegenden Helixwindungen eingesetzt worden.¹⁹⁷ Der resultierende Komplex besteht aber letztlich nur aus einem DNA-Doppelstrang und dem Polyamid-Stützen-ähnlichen Molekül, daher war nicht klar, ob auch die

Verknüpfung zweier unabhängiger DNA-Doppelstränge zu einem ternären Komplex gelingen kann. Zunächst sollten nur zwei kurze DNA-Haarnadeln mit den entsprechenden Bindungsstellen miteinander verknüpft werden, später sollte das Konzept auch mit DNA-*minicircles* mit entsprechenden Bindungsstellen getestet werden.

3.2.1 Design und Synthese

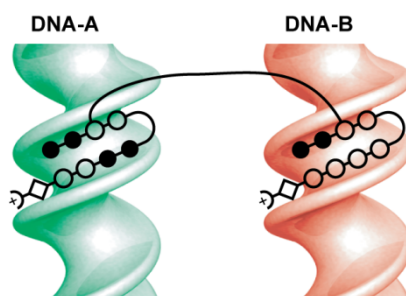


Abbildung 52: Schematische Darstellung einer Polyamid-Stütze. Zwei verschiedene Polyamide sind über einen langen flexiblen Linker miteinander verbunden. Jedes Polyamid bindet an die kleine Furche eines spezifischen DNA-Doppelstranges (**PA-A** an die **DNA-A** in grün bzw. **PA-B** an **DNA-B** in rot).

Für die Synthese der Polyamid-Stütze wurden zunächst zwei unterschiedliche Polyamide entworfen, welche eine doppelte Fehlpaarung als eine Garantie für hohe Selektivität für die jeweils andere Sequenz aufwies (siehe Abbildung 52 und Abbildung 53). Polyamid A (**PA-A**) bindet an die Sequenz 5'-WWGGCCW und **PA-B** an die Sequenz 5'-WWGGWWW. Ab 2006 wurden in schematischen Grafiken intern die Farbe Grün für PA-A und die DNA-A verwendet, Rot für PA-B und DNA-B. Diese Nomenklatur und der Farbcode sollen hier beibehalten werden.

Zum Verknüpfen der beiden Polyamide sollte ein Aminopropyl-modifizierter Pyrrol-Baustein eingesetzt werden, der von der Gruppe von Dervan etabliert ist. Diese Modifikation zeigt beim an die DNA gebunden Polyamid radial von der Helixachse weg.

Bei der Wahl des Linkers spielte die Überlegung eine Rolle, dass negativ geladene DNA-Doppelstränge sich elektrostatisch abstoßen. Damit diese elektrostatische Abstoßung einen möglichst kleinen Einfluss auf die Bildung eines geplanten ternären Komplexes hat, wurde ein langer, wasserlöslicher Linker auf Polyethylenglycol (PEG) -Basis gewählt (Abbildung 53). Rückblickend betrachtet erscheint der Linker viel länger als nötig, da zweiwertige Kationen die Ladungen effektiv abzuschirmen vermögen (siehe Abschnitt 3.6.1).

In den folgenden Abschnitten werden Experimente beschrieben, in denen meist die heterobifunktionale Stütze mit PEG-Linker aus meiner Diplomarbeit¹⁵⁷ (siehe Abbildung 53) zum Einsatz kam. Es wurden jedoch auch weitere hetero- und auch homobifunktionale Stützen, auch

mit unterschiedlichen Linkerlängen synthetisiert. Wurde eine dieser alternativen Polyamid-Stützen für Experimente eingesetzt, so wird dies ausdrücklich erwähnt.

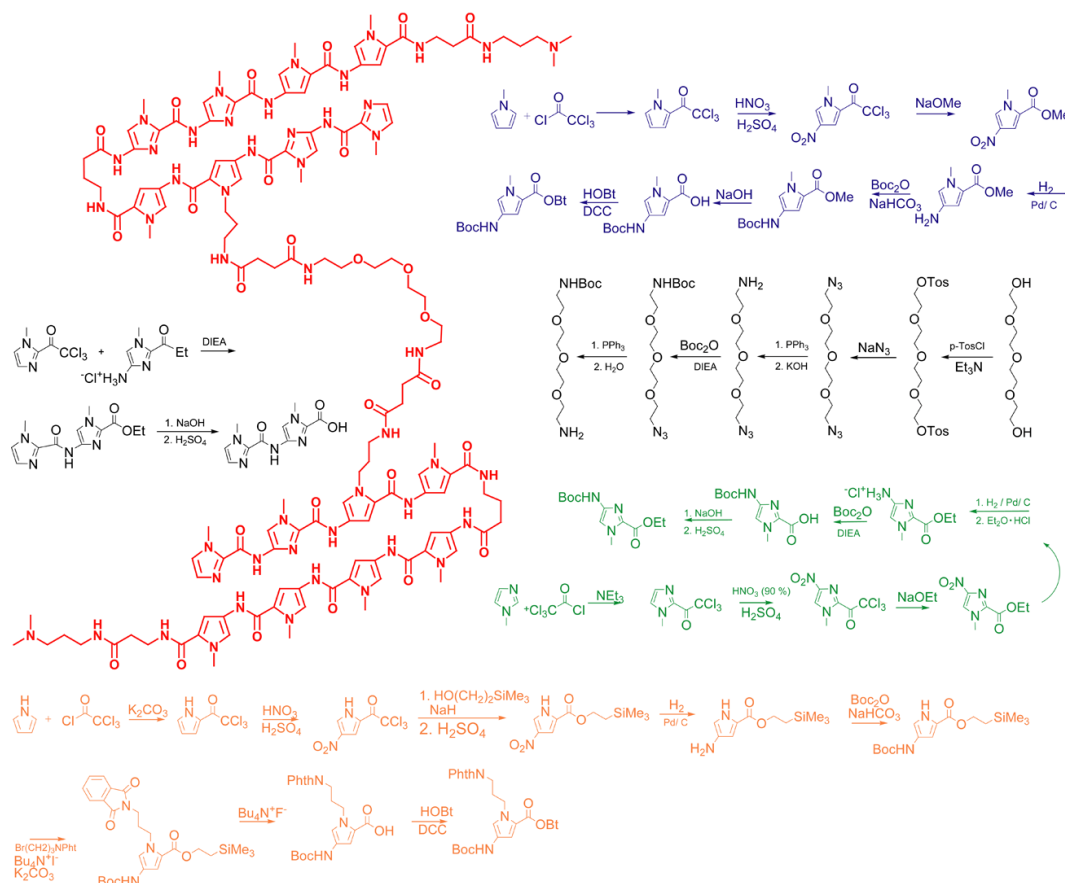


Abbildung 53: Übersicht über die Synthesen der Polyamid-Monomere und des PEG-Linker-Bausteins. Die Synthese der Polyamide erfolgte nach etablierten Festphasensynthese-Protokollen¹⁹⁸ und wurden bereits in meiner Diplomarbeit beschrieben.¹⁵⁷Links: Strukturformel der heterobifunktionalen Polyamid-Stütze mit verlängertem PEG-Linker in rot.

3.2.2 Varianten der Polyamid-Stütze

Prinzipiell ist es möglich, alle denkbaren Kombinationen aus Polyamiden (A-A, A-B und B-B) mit zahlreichen unterschiedlichen Linkern herzustellen. In Abbildung 54 sind einige verwendete Linker abgebildet.

Im ersten und in dieser Arbeit meistverwendeten Design wurde die heterobifunktionale Stütze mit dem extra langen Linker a) dargestellt. In Wiederholungen der Synthese wurde dabei zunächst wie in meiner Diplomarbeit¹⁵⁷ beschrieben vorgegangen. Doch gelang diesmal die Peptidkupplung an den PEG-Linker nicht mehr in beschriebener Weise durch 2-(1-H-

benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetraethyluronium hexafluorophosphat) (HBTU), sondern nur noch durch eine Kombination aus HBTU und HOBT (Hydroxybenzotriazol) in mehrfachem Überschuss. Der Grund, wieso dieselbe Kupplungsreaktion mit denselben Edukten diesmal ein anderes Verhalten zeigte, ist nicht ganz klar.

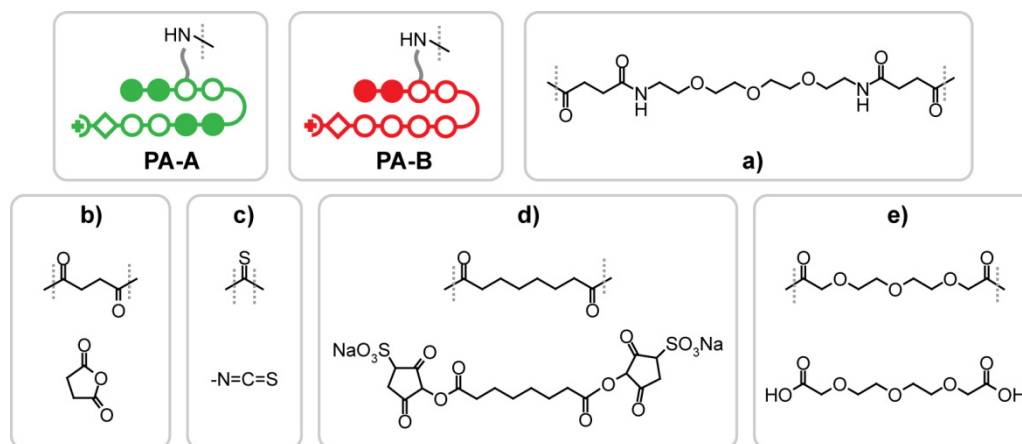


Abbildung 54: Die beiden Polyamide **PA-A** und **PA-B** und verschiedene Arten von möglichen Linkern. a) Langer Linker aus meiner Diplomarbeit, ¹⁵⁷ b) Bernsteinsäure-Linker aus Bernsteinsäureanhydrid (unten), c) Thioharnstoff-Linker aus der Kupplung mit einem Isothiocyanat eines Polyamides, Linker aus BS³ (unten), e) Linker aus der Tetraethylenglycol-Disäure.

b) Es ist aber auch möglich, nur mit Bernsteinsäure als Linker zwei Polyamide zu verknüpfen. Hierfür wurde eines der Polyamide mit Bernsteinsäureanhydrid (unten) modifiziert und anschließend das zweite Polyamid mit HBTU/ HOBT angekuppelt. Dadurch entsteht eine deutlich kürzere Stütze.

c) Die kürzest mögliche Stütze mit den beiden Polyamiden kann man darstellen, indem die Aminofunktion eines Polyamides wie in Abbildung 84 dargestellt zum Isothiocyanat umgewandelt wird und dann zu PA-A oder PA-B gegeben wird. Diese Reaktion ist sowohl in wässrigen Puffern als auch in organischen Lösemitteln wie DMF möglich, wobei ein Thioharnstoff-Derivat entsteht.

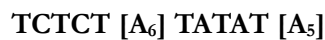
d) Mit kommerziell erhältlichen Crosslinkern wie dem **BS³** (Bis-(Sulfo-succinimidyl)-Suberat)-Linker (unten) können besonders einfach homobifunktionale Stützen dargestellt werden. Dazu kann eine stöchiometrische Menge des Crosslinkers in verdünnter Lösung langsam zu einer Polyamid-Lösung gegeben werden. Da dabei das Polyamid anfangs im Überschuss vorliegt, werden beide funktionellen Enden des Crosslinkers mit dem Polyamid substituiert. Soll jedoch zunächst nur ein Polyamid an den Crosslinker gekuppelt werden und die entstehende Verbindung aufgereinigt werden, so muss die Zugabe von Polyamid zu einem Überschuss an Crosslinker erfolgen, um die Bildung einer homobifunktionalen Stütze zu verhindern. Im Fall des hier

abgebildeten BS³ gelingt keine Aufreinigung von monofunktionalisiertem Crosslinker, da der Sulfosuccinimidyl-Rest zu leicht hydrolysiert. Linker mit nicht-sulfonierten Succinimidyl-Resten wie DSS (Abschnitt 3.6.3) konnten hingegen nach beendeter Kupplung sauer gequench und aufgereinigt werden.

e) Schließlich können prinzipiell auch mit Disäuren Polyamid-Stützen hergestellt werden. Die unten abgebildete Tetraethylenglycol-Disäure sollte zur Darstellung einer Stütze verwendet werden, da dieser Linker besonders hydrophil ist. Vermutlich aufgrund von Nebenprodukten im Edukt waren die Kupplungsausbeuten ans erste Polyamid allerdings so niedrig, dass eine Umsetzung mit einem weiteren Polyamid nicht durchgeführt wurde.

3.2.3 *Minicircle*-Design und -Synthese für die Dimerisierung mit der Polyamid-Stütze

Das erste hier verwendete Design von DNA-*minicircles* basierte auf einem Design aus der Doktorarbeit von Dr. Goran Rasched¹⁹⁹ und bestand aus drei Segmenten mit 5 nt langen *sticky ends*. Dieses Design beruht auf der Arbeit von Ulanovsky et al.¹⁸⁵ und hat den Vorteil, dass die Sequenzen keine internen Haarnadeln bilden konnten. Das Design war hochrepetitiv und folgte, außer in der Region für die Bindung der Polyamide (s.u.) und einer angrenzenden Sequenz, dem Muster



Da die erste Version der Polyamid-Stütze (siehe Abschnitt 3.2.1) ein heterobifunktionales Molekül war, wurden zwei verschiedene *minicircles* A und B hergestellt, die sich nur in dem Segment γ geringfügig unterschieden. In $\gamma\mathbf{A}$ war die Bindungsstelle für Polyamid A, in $\gamma\mathbf{B}$ die Bindungsstelle für Polyamid B integriert. Des Weiteren wurde noch ein *minicircle* C ohne eine Bindungsstelle für die beiden Polyamide synthetisiert.



Die Bindungsstelle war dort in die Sequenz eingefügt, wo die Polyamid-Stütze außen an den *minicircle* bindet, und der Linker des Polyamids möglichst genau nach außen zeigt (vergleiche hierzu Abbildung 40).

Im ersten Schritt wurden die jeweiligen zwei Oligonukleotide der Untereinheiten (α , β und entsprechendes γ) hybridisiert, dann enzymatisch phosphoryliert, gefolgt von einer Ethanol-fällung, und schließlich einer Ligation über Nacht. Die Ligationsprodukte wurden nun in einem zweidimensionalen Gel aufgetrennt, isoliert und schließlich aus dem Gel eluiert.¹⁹⁹

Dieses Verfahren war recht aufwändig und dauerte, alles in allem, mehrere Tage und wurde vor allem zur Herstellung von DNA-*minicircles* mit Einzelstrangregion entwickelt.¹⁸⁷

Für die Zwecke dieser Arbeit waren keine Einzelstrangregionen vonnöten, so dass das Protokoll abgeändert werden konnte (Protokolle der einzelnen Schritte in Kapitel 4.1).

- 1) Kinasierung aller Stränge gemeinsam im Ligationspuffer
- 2) Ligation über Nacht bei 4°C ohne Pufferwechsel
- 3) Pufferwechsel (Ethanol-fällung)
- 4) *BAL-31*-Exonuklease-Verdau der linearen Fragmente
- 5) denaturierende PAGE
- 6) Eluieren der Banden unter Schütteln bei 55°C

Zwar war diese Prozedur schon eine deutliche Erleichterung gegenüber der ersten Prozedur, doch ist die Qualität der Ringe auf den AFM-Bildern (wahrscheinlich durch die Elutionsmethode aus dem Gel) nicht zufriedenstellend. Das für unverzweigte Ringe mit Abstand schnellste Protokoll mit dem saubersten Endergebnis sah so aus:

- 1) Hybridisieren von bereits phosphorylierten Strängen
- 2) Ligation (nur ca. 20 Minuten bei 25°C)
- 3) Pufferwechsel (Ethanol-fällung oder PCR-Isolationskit)
- 4) *BAL-31*-Exonuklease-Verdau der linearen Fragmente
- 5) Isolierung der *minicircles* mit einem PCR-Isolationskit

Diese Prozedur ist problemlos an einem halben Tag durchzuführen und ist auch auf Polyamid-substituierte *minicircles* übertragbar (siehe Kapitel 3.6). Weitere Aspekte zu Designs und Aufreinigungsmethoden wurden in Kapitel 3.1 diskutiert.

3.2.4 SPR- und Love-Wellen-Bindungsstudien

In der abgeschlossenen Diplomarbeit¹⁵⁷ wurden bereits Oberflächen-Plasmon-Resonanz (englisch *surface plasmon resonance*, SPR)-Bindungsstudien durchgeführt, die auf eine Bildung eines von

der Polyamid-Stütze induzierten ternären Komplexes hindeuteten. Einige Aspekte der SPR-Experimente sind für die nachfolgenden Studien von Bedeutung, daher soll hier eine aufbereitete Grafik des zentralen Experimentes abgedruckt werden (Abbildung 55).

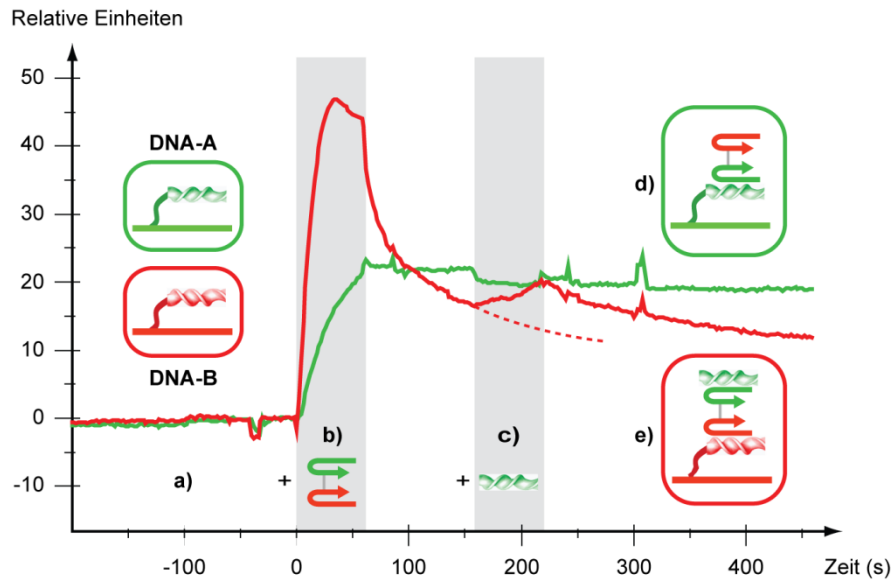


Abbildung 55: SPR-Bindungsstudien. a) Die Haarnadeln **DNA-A** (grün) und **DNA-B** (rot) gebunden an hintereinander geschaltete Flusszellen eines SPR-Chips. b) Bei der Zugabe der Polyamid-Stütze bindet die entsprechende Seite der Stütze an die DNA (Zeitraum der Zugabe grau hinterlegt). Die nun folgende Zugabe von **DNA-A** (c) führt an dem **DNA-A**-Stützen-Komplex (grüne Linie) zu keinem Ausschlag, da nur noch das **PA-B** der Stütze frei ist (d). An Flusszelle **B** hingegen wurde ein signifikanter Anstieg des SPR-Signals beobachtet. Auch nach Beendigung der Zugabe blieb das Signal über dem interpolierten Verlauf des Signals vor der Zugabe der **DNA-A** (gestrichelte Linie). Diese Erhöhung spricht für die Bildung des ternären Komplexes aus **DNA-A**, der Polyamid-Stütze und **DNA-B** (e).

Zwei hintereinander geschaltete Flusszellen wurden mit jeweils einer DNA-Haarnadel modifiziert. Bei Zugabe der Polyamid-Stütze war an beiden Zellen ein deutlicher Anstieg des SPR-Signals festzustellen, das nach Beendigung der Zugabe langsam abnahm. Die Abnahme des SPR-Signals unterschied sich deutlich. Während an der Zelle mit **DNA-A** das Signal kaum merklich fiel, war an Zelle **B** der Abfall stärker ausgeprägt. Diese Differenz ist mit verantwortlich für die unterschiedlichen Bindungskonstanten der beiden Polyamide der Stütze an die jeweilige DNA. An **DNA-A** wurde eine Dissoziationskonstante (K_D) von $5 \cdot 10^{-9}$ M ermittelt, an **DNA-B** band die Stütze nur mit einer K_D von $30 \cdot 10^{-9}$ M.

Auch wenn die SPR-Experimente einen starken Hinweis für die sequenzspezifische Bildung eines ternären Komplexes lieferten, konnte aus den vorliegenden Daten keine K_D ermittelt werden, da die Zunahme des SPR-Signals aus der Bildung des ternären Komplexes überlagert wird von der Dissoziation der Stütze und des Stützen-DNA-Komplexes. Erschwert wird die Auswer-

tung auch dadurch, dass methodenbedingt Komplexbildungen, die weit von der Oberfläche des SPR-Chips stattfinden, nicht mehr gut detektierbar sind und einen schwächeren Ausschlag des Signals hervorrufen.

Diesen Nachteil hat eine vom experimentellen Aufbau und Vorgehen verwandte Methode nicht, die auf speziellen horizontal polarisierten Scherwellen, den Love-Wellen (benannt nach dem Mathematiker August E. H. Love) basierende Sensortechnik.²⁰⁰ Dennoch gelang auch mit dieser Methode aufgrund von experimentellen Schwierigkeiten keine Bestimmung der K_D -Werte. Da aus patentrechtlichen Gründen keine Referenz-Flusszellen verwendet werden durften, war auch kein Vergleich zwischen *match*- und *mismatch*-Bindung und damit der direkte Beweis der Sequenzspezifität nicht möglich. Darum wurden die SPR- und Love-Wellen-Experimente nicht weiter verfolgt, sondern nach alternativen Nachweismethoden gesucht.

3.2.5 Gelshift-Experimente (EMSA)

Elektrophoretic mobility shift assay (EMSA) ist eine etablierte gelbasierte Technik zur Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten, bei der meist ein Interaktionspartner radioaktiv oder durch einen Fluoreszenzmarker markiert ist und der andere Partner in steigenden Konzentrationen hinzugegeben wird. In einem Gel haben Komplexe eine geringere Mobilität als der markierte Partner allein (Abbildung 56 b). Aus den Verhältnisse der Intensitäten des Komplexes in Bezug auf die Konzentrationen des markierten Edukts lässt sich die Bindungskonstante bestimmen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst die beiden DNA-Haarnadeln **DNA-A** und **DNA-B** mit der Polyamid-Stütze verbunden werden. In ersten EMSA-Experimenten mit unmodifizierter DNA und Polyamid-Stütze in äquimolaren Konzentrationen konnte keine Bande niedriger Mobilität gefunden werden. Dies wurde so interpretiert, dass durch die Verdünnung der Probe beim Auftragen auf das Gel und beim Laufen der Bande die Konzentration des Komplexes soweit abgesenkt wurde, dass die Komplexe wieder auseinander gefallen sind. Das Experiment wurde also verändert, indem eine der beiden DNA-Haarnadeln radioaktiv markiert wurde. Im Autoradiogramm des Gels ist somit nur die radioaktiv markierte DNA zu sehen und die andere DNA kann zusammen mit der Polyamid-Stütze im Überschuss zugegeben werden um das Gleichgewicht in Richtung des Komplexes zu treiben.

In Abbildung 56 ist die Auswertung eines EMSA-Experimentes zu sehen. In jenem Experiment wurde die K_D mit 760 nM bestimmt. Der Verlauf der Messwerte bei hohen Konzentrationen zeigt einen Ähnlichen Verlauf wie die Simulation in Abbildung 62. Wie dort diskutiert könnte der ternäre Charakter der Komplexe eine Erklärung dafür sein, dass die Messwerte im oberen Konzentrationsbereich noch kein Plateau erreicht haben, sondern weiter anstiegen.

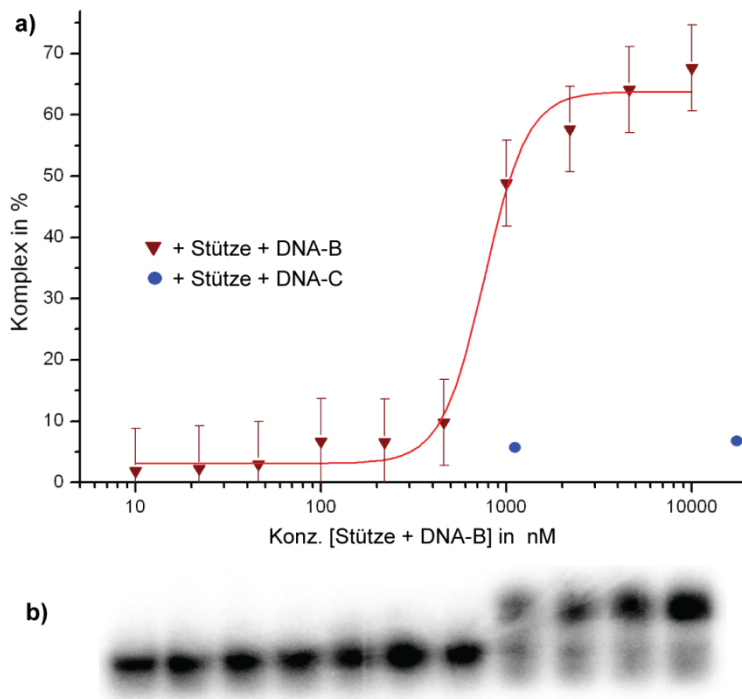


Abbildung 56 a) Auswertung eines EMSA-Experimentes mit radioaktiv markierter **DNA-A**, zu der steigende Konzentrationen von mit **DNA-B** inkubierte Stütze titriert wurde (rote Dreiecke). Die Dissoziationskonstante betrug etwa 760 nM. Die Kontrolle mit **DNA-C** (ohne Bindungsstelle für die die Stütze, blaue Kreise) zeigte keine Komplexbildung. b) Autoradiogramm des EMSA-Versuches

Die EMSA Studien wurden unter verschiedenen Bedingungen wiederholt. Dabei zeigte sich, dass metallsalzfreie Puffer ungeeignet waren, da dann keine scharfe Unterscheidung zwischen Komplex und freien Partnern möglich war. Die ermittelten Dissoziationskonstanten lagen je nach Experiment zwischen 300 und 1000 nM und waren damit mehr als eine Größenordnungen schlechter als die zum damaligen Zeitpunkt bereits mit FCS ermittelten Dissoziationskonstanten von etwa 20 nM (siehe 3.2.7).²⁰¹ Und auch die gezählte Anzahl der Komplexe in AFM-Aufnahmen (Abschnitt 3.2.8) lässt eher eine Dissoziationskonstante im niedrigen nanomolaren Bereich wahrscheinlicher erscheinen. Die scheinbar schlechtere Dissoziationskonstante bei EMSA ließe sich damit erklären, dass bei der Elektrophorese die positiv geladenen Polyamid-Stützen vom elektrischen Feld in die entgegengesetzte Richtung beschleunigt werden als die DNA und somit die eigentliche Bindungsstärke verfälscht wird.

Daher wurden auch die EMSA-Untersuchungen nicht weiter verfolgt.

3.2.6 Fluoreszenzpolarisation

Fluoreszenzpolarisation ist eine Methode zur Bestimmung von Bindungsereignissen,¹⁵⁸ bei dem einer der beiden Bindungspartner mit einem Fluorophor versehen wird. Wird dieser Fluorophor mit linear polarisiertem Licht angeregt, so strahlt er die Fluoreszenz wieder als linear polarisiertes Licht ab. Da der elektronisch angeregte Zustand eine gewisse Lebensdauer hat, kann das Molekül sich in dieser Zeit bewegen oder drehen, so dass die Polarisations Ebene des abgestrahlten Lichtes sich von der Ebene der Anregung unterscheiden kann. Je kleiner und damit beweglicher das Molekül mit dem Fluorophor ist, desto geringer ist der Anteil des Lichtes, was in derselben Polarisations Ebene wie die Anregung abgegeben wird. Bindet nun ein Molekül an das fluoreszenzmarkierte Molekül, so nimmt dessen Beweglichkeit ab, was sich in der Zunahme des mP-Wertes (mili Polarisation) niederschlägt.

Für die Detektion des ternären Komplexes aus den beiden DNA-Haarnadeln und der Polyamid-Stütze wurde eine der beiden DNA-Haarnadeln mit einem Fluoreszenzmarker versehen. Die erste verwendete DNA war eine Rhodamin Grün markierte **DNA-B**, wie sie auch in den FCS-Experimenten (siehe Abschnitt 3.2.7) verwendet worden ist. Diese Markierung erwies sich jedoch als unbrauchbar, da der Fluorophor über einen $(\text{CH}_2)_{11}$ -Linker am 5'-Ende der DNA verknüpft war. Ein solch langer und damit beweglicher Linker entkuppelt den Fluorophor mechanisch von der DNA und somit ist die Beweglichkeit des Fluorophors nicht mehr davon abhängig ob ein Molekül an die DNA gebunden ist oder nicht. Diesen Zusammenhang bei Fluoreszenzpolarisations-Studien beschreibt der Begriff Propellereffekt.

Um die Beweglichkeit des Fluorophors an der DNA einzuschränken wurde ein neues **DNA-A**-Oligonukleotid designt, an dem ein Fluoreszein über einen kürzeren C2-Linker intern an einem Thymin angebracht war. Doch auch mit dem neuen Oligonukleotid ließen sich die Komplexe nicht zuverlässig nachweisen (siehe Abbildung 57).

Die aufgenommenen Daten ließen keine klare Auswertung zu. Die Schwankungen der mP-Werte waren aus nicht erkennbaren Gründen zwischen mehreren Messungen so groß, dass die Werte mit einem breiten Fehler behaftet sind. Des Weiteren ist nicht klar, wieso bei der Zugabe von Polyamid, Stütze oder einen Komplex aus Polyamid-Stütze und **DNA-B** der mP-Wert erst leicht abfällt, und erst ab Konzentrationen von über $1\mu\text{M}$ ansteigt. Der mP-Anstieg ist bei $10\mu\text{M}$ immerhin so stark ausgeprägt, dass eine Komplexbildung wahrscheinlich erscheint. Auch ins Bild passt, dass der Anstieg bei dem Komplex aus Stütze und **DNA-B** am stärksten ausfällt, da hier auch der Massenzuwachs des Komplexes am höchsten ist. Eine Bestimmung von Dissoziationskonstanten ist anhand dieser Daten jedoch nicht möglich gewesen. Insgesamt sind die mP-Änderungen bei den hohen Schwankungen zu gering und außerdem müsste für eine K_D -Berechnung der Anstieg des mP-Wertes eine Sättigung erreichen. Da ein Anstieg aber erst bei den höchsten Konzentrationen beobachtet wurde, wäre eine mit dieser Methode ermittelte K_D vermutlich im μM Bereich zu finden.

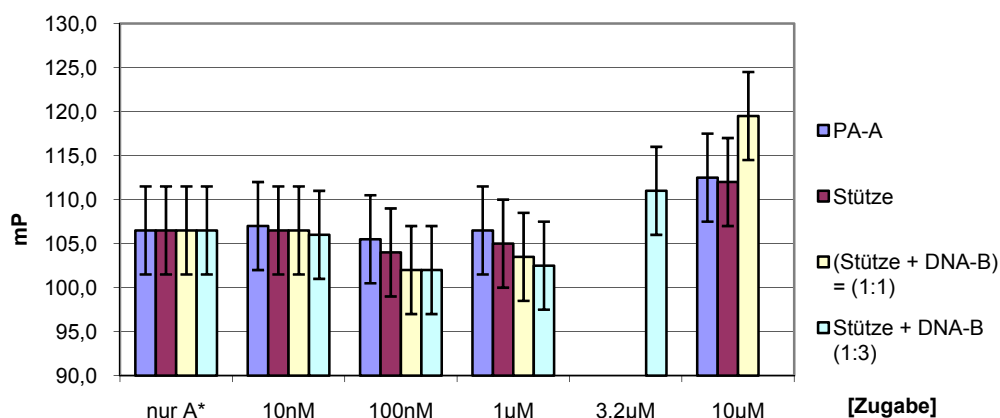


Abbildung 57: Fluoreszenzpolarisationsexperimente. **DNA-A*** ist fluoreszenzmarkiert. Zu **DNA-A** wurden in steigenden Konzentrationen **PA-A** (blau), die Polyamid-Stütze (magenta), ein vorinkubierter Komplex aus Stütze und **DNA-B** (1:1 gelb) oder Stütze und **DNA-B** (1:3 grün) gegeben. Ein leichter Anstieg des mP-Wertes und damit ein Hinweis auf die Bildung von Komplexen wurde erst bei 10 mM Konzentrationen gefunden. Der fehlende Wert bei 10 µM konnte aus experimentellen Gründen nur bei 3,2 µM gemessen werden.

Ein Grund für die scheinbar schlechte Bindung liegt auch sicherlich in der Probenvorbereitung, denn die Proben wurden vor der Messung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Diese Vorgehensweise ist nach heutigem Wissensstand sicherlich nicht sinnvoll gewesen, da Komplexe durch höhere Temperaturen zerstört werden (vgl. Abbildung 89).

Möglicherweise ist auch der Fluorophor an der DNA trotz des kurzen C2-Linkers sowohl bei der terminalen Verknüpfung als auch bei der Verknüpfung an einer Nukleobase selbst zu beweglich gewesen, was zur Beobachtung der Fluoreszenzpolarisierung eines weitgehend frei beweglichen Fluorophors geführt hätte. Denkbar ist aber auch, dass der PEG-Linker der Polyamid-Stütze selbst zu flexibel war, um die fluoreszenzmarkierte DNA in ihrer Beweglichkeit merklich einzuschränken. Jedenfalls erwies sich auch Fluoreszenzpolarisierung als ungeeignet, um die ternären Komplexe nachzuweisen und wurde daher ebenfalls nicht weiter verfolgt.

3.2.7 FCS und FCCS

Der erste zweifelsfreie Nachweis für die Polyamid-Stützen-vermittelte Interaktion gelang in einer Kollaboration mit Dr. Chayan Nandi und Dr. Partha Parui aus der Arbeitsgruppe von Prof. Brutschy mittels FCS und FCCS. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS für *fluorescence correlation spectroscopy*) und Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie (FCCS für *fluorescence cross correlation spectroscopy*) sind zwei weitere Methoden um Interaktionen von zwei Molekülen miteinander zu messen.^{202,203} Vereinfacht dargestellt beobachtet man bei FCS zeitlich aufgelöste die Fluoreszenz und damit die Aufenthaltsdauer eines fluoreszenzmarkierten Moleküls in einem

kleinen Flüssigkeitsvolumen, der vom Fokus eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops vorgegeben wird. Je größer oder sperriger ein Molekül, desto niedriger ist seine Diffusionsgeschwindigkeit und desto länger damit die mittlere Aufenthaltsdauer im Fokus. Wird ein unmarkierter, deutlich größerer Bindungspartner (ab 8-facher Masse oder größer) zu diesem Molekül gegeben, so hat der Komplex durch seine größere Trägheit eine längere mittlere Aufenthaltsdauer im Fokus. Aus dem Verhältnis von freien Bindungspartnern zum Komplex kann bei bekannten Konzentrationen die Bindungskonstante ermittelt werden.²⁰⁴

FCCS ist eine verwandte Technik, bei der jedoch beide Bindungspartner mit jeweils unterschiedlichen Fluorophoren versehen sind. Nun wird beobachtet, ob die Fluoreszenzsignale der beiden Fluorophore korreliert sind, das heißt gleichzeitig im Fokus auftauchen oder verschwinden oder ob sie unabhängig voneinander sind. Sind die Signale korreliert, so heißt das, dass die beiden Interaktionspartner als Komplex durch den Focus schwimmen. Der Vorteil von FCCS gegenüber FCS ist, dass auch Komplexe von Partnern mit ähnlicher Masse untersucht werden können und deren Bindungsgrad bestimmt werden kann.²⁰⁴

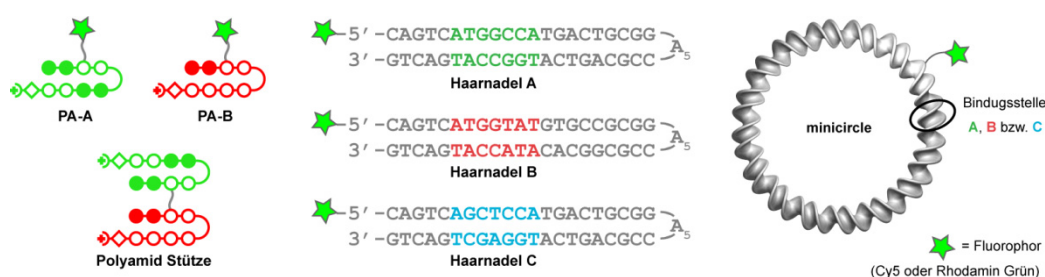


Abbildung 58: Die für die FCS und FCCS verwendeten Komponenten: Fluoreszenzmarkierte Polyamide, unmarkierte Polyamid-Stütze, markierte Haarnadeln und minicircles.

In ersten Experimenten wurden die Dissoziationskonstanten fluoreszenzmarkierter Polyamide mit den entsprechenden DNA-Haarnadeln per FCSS gemessen, um sie mit den etablierten *Footprinting*-Werten²⁰⁵ vergleichen zu können. Da sich die Massen der Polyamide und der DNA-Haarnadeln etwa um den Faktor 10 unterschieden, kam auch eine Autokorrelations-Messung per FCS infrage. FCCS und FCS lieferten übereinstimmende Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich²⁰⁴ (siehe Tabelle 2), und liegen damit im selben Bereich wie die publizierten Werten.²⁰⁵ Auch die eigenen SPR-Messungen (siehe 3.2.4) lieferten K_D -Werte im selben Bereich, jedoch war hier sowohl bei den unmodifizierten Polyamiden als auch bei der Stütze die Bindung von **PA-A** an **DNA-A** signifikant stärker als die **PA-B-DNA-B**-Bindung. Warum dieses Verhältnis bei den FCS- und FCSS-Messungen umgekehrt war, konnte nicht geklärt werden. Den Messungen der Dimere wurde die Messung der ternären Komplexe mit der unmarkierten Stütze angeschlossen. Zunächst wurden die DNA-Haarnadeln, dann auch komplexe mit fluoreszenzmarkierten *minicircles* durchgeführt.

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, dass nur dann eine Interaktion messbar war, wenn das jeweilige Polyamid mit der *match*-DNA inkubiert wurde und nicht mit einer *mismatch*-DNA. Ähnlich verhält es sich bei den ternären Komplexen von den DNA-Haarnadeln bzw. den DNA-*minicircles* mit der Polyamid-Stütze. Auch war mit einer *mismatch*-DNA keine Interaktion nachweisbar, was die Sequenzspezifität der Stütze belegt. Ohne Stütze ist, wie zu erwarten, auch keine Interaktion nachweisbar gewesen. In den Experimenten mit der PA-Stütze wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten so bestimmt, als ob die DNA-Komponenten direkt miteinander wechselwirkten, obgleich der Komplex ja über zwei unabhängige Wechselwirkungen durch die Stütze zusammengehalten wird. Eine genauere Beschreibung der einzelnen Wechselwirkungen (**DNA-A** und Stütze bzw. **DNA-B** und Stütze) wäre allenfalls durch eine weitere Markierung auch der Stütze möglich, was aber nicht im Focus dieser Arbeit war. Es ist aber durchaus denkbar, dass eine der beiden Interaktionen als schwächstes Glied in der Kette wirkt und die Mehrzahl der Komplexe an jener Wechselwirkung auseinander bricht.

Die K_D des ternären Haarnadel-Komplexes lag bei 20 ± 5 nM, die des *minicircle*-Komplexes bei 30 ± 5 nM.

Cy5	RhG	unmarkiert	K_D [nM]	match?
DNA-Polyamid Interaktion				
H-A	PA-A	-	5 ± 1	+
H-A	PA-B	-	n.m.	-
H-B	PA-A	-	n.m.	-
H-B	PA-B	-	2 ± 1	+
H-C	PA-A	-	n.m.	-
H-C	PA-B	-	n.m.	-
Ternärer Komplex mit Haarnadel-DNA				
H-A	H-B	PA-Stütze	20 ± 5	+
H-C	H-B	PA-Stütze	n.m.	-
H-A	H-B	-	n.m.	0
Ternärer Komplex mit <i>minicircles</i>				
MC-A	MC-B	PA-Stütze	30 ± 5	+
MC-C	MC-B	PA-Stütze	n.m.	-
MC-A	MC-B	-	n.m.	0

Tabelle 2: Mit FCCS gemessene Dissoziationskonstanten verschiedener Komplexe.

RhG= Rhodamin Grün Marker, H= Haarnadel DNA, PA= Polyamid, MC= minicircle, n.m.= nicht messbar

In Abbildung 59 sind die Verläufe der Kreuzkorrelationsfunktionen zu sehen. Auch diese Resultate bestätigen die sequenzspezifische Bildung der Komplexe.

Damit liegt die über FCCS gemessene K_D des ternären Komplexes 1-2 Größenordnungen unter den mit EMSA bestimmten Werten (Kapitel 3.2.5). Da allerdings auch die Anzahl der Komplexe in AFM-Aufnahmen (3.2.8) eher ein Dissoziationskonstante im niedrigen nanomolaren Bereich vermuten lässt, spricht dies wie oben diskutiert gegen die Richtigkeit der EMSA Ergebnisse.

In weiterführenden Experimenten konnten wir zeigen, dass mit FCS auch die Stöchiometrien von Polyamid-Bindungen an DNA-Substrate mit mehreren Bindungsstellen korrekt darstellbar sind.²⁰⁴ In derselben Studie zeigten wir, dass der optimale pH-Wert für die Polyamid-DNA-Bindung bei 7-7,4 liegt und dass die Art der Metallsalze im Puffer keinen entscheidenden Einfluss auf die Bindungsstärke hat.

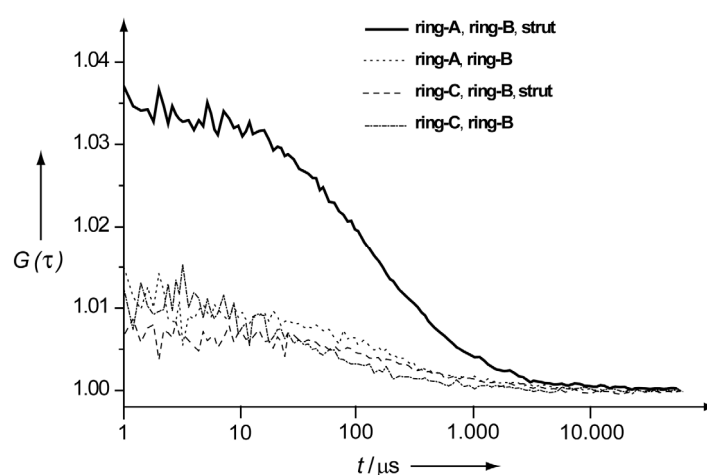


Abbildung 59: Die zeitlichen Verläufe der Kreuzkorrelationsfunktionen der angegebenen Interaktionspartner.

Für den Aufbau von größeren Architekturen mit Polyamid-Stützen können mehrere Stützen zwischen zwei Interaktionspartnern eingesetzt werden. Dies sollte aus Gründen der Kooperativität und aus einem entropischen Vorteil¹¹³ zu einer festeren Bindung führen. Daher wurde ein Testsystem mit zwei Doppelsträngen designt, in dem jeder Doppelstrang zwei Bindungsstellen A bzw. B trägt. Folglich können diese Doppelstränge nun durch zwei Stützen zusammengehalten werden, was sich in einer Verbesserung der K_D von 22 nM auf 6 nM niederschlug.²⁰⁴

3.2.8 AFM-Aufnahmen der ternären Komplexe

Auch wenn der Nachweis der Komplexbildung mit der Polyamid-Stütze durch FCCS zweifelsfrei gelungen ist, sollten auch rasterkraftmikroskopische Bilder der Komplexe aufgenommen werden. Nach anfänglichen Schwierigkeiten stabile Abbildungsbedingungen zu etablieren (siehe Kapitel 3.3), wurde eine ältere Probe noch einmal vermessen (Abbildung 60 links).

Zusätzlich wurden auch andere homo- und heterobifunktionale Stützen, mit kurzen, wie auch mit langen Linkern untersucht. Alle Bilder zeigen einige Komplexe neben unverbundenen Ringen. In Aufnahmen mit *minicircles* aus frühen Synthesen (Abbildung 60 links) finden sich auch lineare Fragmente. Die stammen vermutlich daher, dass die *minicircles* unter Schütteln aus einem Gel eluiert wurden und aufgrund dieser mechanischen Beanspruchung auseinander gebrochen sind. Der Bindungsgrad der Ringe beträgt etwa 50 %. Für das rechte Bild wurde ein etwa 3-facher Überschuss an Stütze gegenüber den *minicircles* eingesetzt, jedoch länger inkubiert (Diskussion in Abschnitt 3.2.9.3).

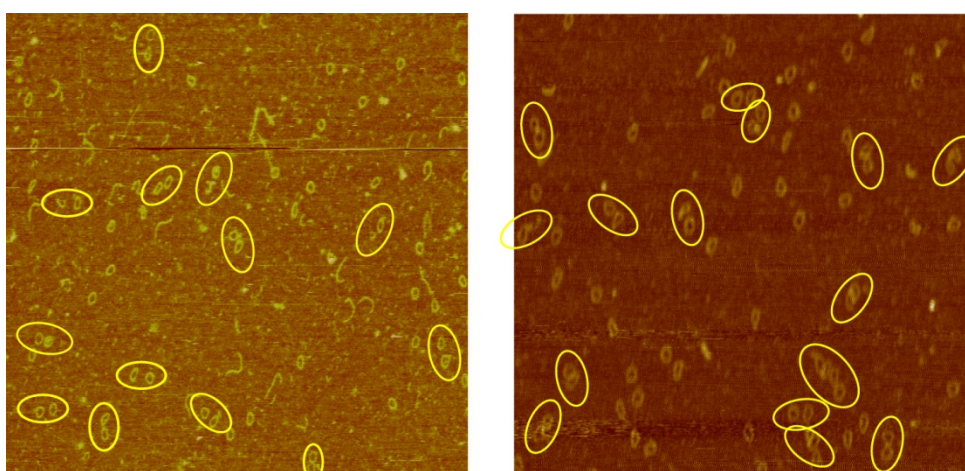


Abbildung 60: AFM-Aufnahmen von Komplexen von DNA-*minicircles* mit der Polyamid-Stütze. Links Bilder mit der heterobifunktionalen Stütze mit langem PEG-Linker, rechts ein Komplex mit homobifunktionaler Stütze (2x PA-B) mit kurzem Linker.

Ein Grund für die relativ geringe Ausbeute könnte darin liegen, dass die zur Probenpräparation eingesetzte Lösung nicht konzentrierter als 2-5 nM sein darf, da sonst die Oberfläche mit Ringen übersättigt wird (siehe Abbildung 64 f). Damit liegt die Konzentration unter der K_D (siehe Diskussion in 3.2.9.2).

3.2.9 Nachteile der Polyamid-Stütze

Mit den Polyamid-Stützen steht nun erstmals ein universelles System zur Verfügung, um doppelsträngige B-DNA sequenzspezifisch miteinander zu verkleben. Es gibt jedoch einige prinzipielle und experimentelle Limitierungen des Konzeptes, derer man sich beim Planen von Experimenten bewusst sein sollte. Diese sollen im Folgenden kurz diskutiert werden.

3.2.9.1 Stöchiometrien ternärer Komplexe

Nach dem Massenwirkungsgesetz lassen sich die Ausbeuten einer Reaktion (z.B. Komplexbildung) durch die Erhöhung der Konzentration einer oder beider Komponenten steigern. Wenn aber keine Aufreinigung erfolgen soll ist nicht nur die absolute Menge an Komplex entscheidend, sondern die Ausbeute im Vergleich zu eingesetzten Spezies. Denn beispielsweise in AFM-Aufnahmen ist es wünschenswert, dass möglichst alle eingesetzten *minicircles* komplexiert vorliegen. Wäre einer der beiden Ringe im Überschuss eingesetzt, könnte man anhand der AFM-Aufnahmen nicht mehr entscheiden, ob nun ein schlechter Bindungsgrad oder ein Überschuss an einem *Minicircle* für die Monomere verantwortlich sind. Bei dem Komplex aus zwei DNA-Strängen und der Polyamid-Stütze handelt es sich jedoch nicht nur um ein binäres, sondern um ein ternäres System, was die genaue Einhaltung der Stöchiometrien aller drei Komponenten erforderlich macht. Dies wird in einem Gedankenexperiment deutlich, in dem der Einfachheit halber von einer unendlich festen Bindung zwischen einem DNA-*minicircle* und der entsprechenden Seite der Polyamid-Stütze ausgegangen wird (siehe Abbildung 61).

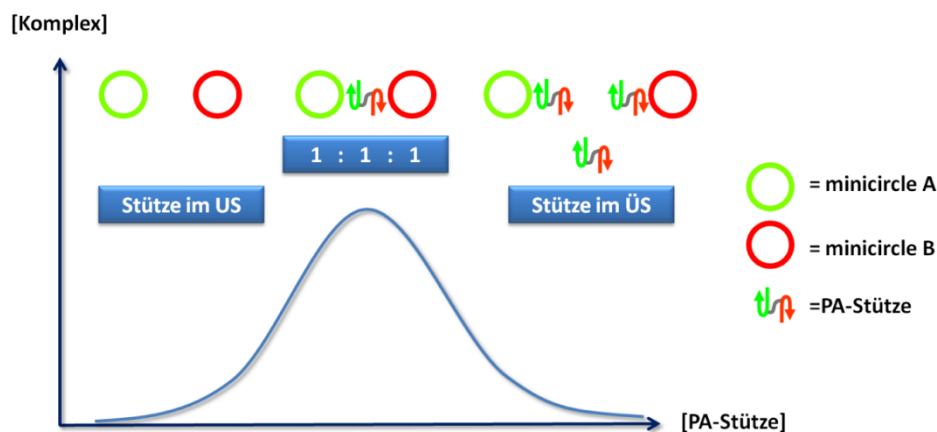


Abbildung 61: Verlauf der Komplexausbeute in einem hypothetischen Titrationsexperiment (Diskussion im Text)

Im Gedankenexperiment wird einer 1:1 Mischung aus *minicircles* A und B steigende Mengen an Polyamid-Stütze hinzugegeben und dabei die Ausbeute des Komplexes bestimmt. Vor der Zugabe der Stütze sind alle Ringe unverbunden (links), durch die Zugabe der Stütze bilden sich Komplexe. Wird jedoch die Stütze gegenüber den Ringen im Überschuss zugegeben (rechts), so werden die Bindungsstellen der *minicircles* durch die jeweilige Seite der Stützen abgesättigt und stehen nicht mehr für eine Komplexbildung zur Verfügung. Daher sinkt die Ausbeute wieder ab. Nach diesen Überlegungen wäre es von großer Wichtigkeit, die exakten äquimolaren Verhältnisse der Komponenten einzustellen. Leider ist dies experimentell bei den sehr kleinen Stoffmengen und Volumina nicht immer optimal zu bewerkstelligen. Ähnlich wichtig sind die exakten

äquimolaren Verhältnisse bei der Synthese der DNA-Kacheln, die aus mehreren Einzelsträngen aufgebaut werden.⁹³ Bei DNA-Origami entfällt diese Voraussetzung, da hier die Synthese der Struktur an nur einem Einzelstrang als Templat erfolgt. Dadurch ergibt sich ein entropischer Vorteil, wenn statt zwei Strängen zur Hälfte nur ein Strang voll bindet und dadurch die Faltung des Origami bewirkt.^{103,113} In der Konsequenz können bei Origami Synthesen die *staple strands* in deutlichem Überschuss zugegeben werden (siehe 1.3.4).

Möglicherweise kann in Analogie zum DNA-Origami solch ein Entropievorteil auch bei Synthesen mit der Polyamid-Stütze ausgenutzt werden, wenn zwei DNA-Stränge durch mehrere Stützen zusammengehalten werden. Dies würde eine Zugabe von Überschüssen an Stütze erlauben und den Komplex durch die Kooperativität der Interaktionen zusätzlich stabilisieren. Leider wurde ein solches Experiment bei den FCSS Experimenten mit DNA-Strängen mit zwei Bindungsstellen für die Stütze nicht durchgeführt (siehe 3.2.7), was diese These hätte erhärten können.

3.2.9.2 Einfluss der absoluten Konzentration auf die Ausbeute

Im Gedankenexperiment oben wurde von einer unendlich festen Bindung ausgegangen. Diese Annahme ist natürlich nicht zutreffend, da jede Komplexbildung eine Gleichgewichtsreaktion ist, deren Lage durch eine Bindungskonstante oder Dissoziationskonstante angegeben werden kann. Aus diesem Grund ist ein weiterer konzeptioneller Nachteil von Komplexbildungen, dass der Bindungsgrad oder die „Ausbeute“ des Komplexes nicht nur wie oben erörtert von der relativen Konzentration (also der Stöchiometrie) der Komponenten abhängt sondern auch von deren absoluten Konzentration.

In einer Simulation wurde der Bindungsgrad eines ternären Komplexes in Abhängigkeit zur absoluten Konzentration der Komponenten unter folgenden Annahmen berechnet:

- 1) Alle Komponenten liegen in äquimolaren Verhältnissen vor.
- 2) Jede der beiden Interaktionen (**DNA-A** mit Stütze bzw. **DNA-B** mit Stütze) habe eine K_D von 10 nM.
- 3) Die *mismatch*-Bindung sei 100 fach schwächer ($K_D = 1 \mu\text{M}$)

In einer halblogarithmischen Auftragung zeigt die Simulation einen für Komplexbildungen typischen sigmoidalen Verlauf (Abbildung 62). Dabei ist jedoch die asymptotische Annäherung an den Maximalwert bei hohen Konzentrationen durch den ternären Charakter langsamer als die Annäherung an den Minimalwert, da bei dem ternären Komplex beide Polyamid-DNA-Wechselwirkungen *gleichzeitig* ausgebildet werden müssen, für ein Auseinanderbrechen des Komplexes aber schon das Lösen einer Bindung ausreicht.

Auch wenn die Annahme der K_D mit 10 nM konservativ erfolgte, zeigt sich doch deutlich, dass nur bei Konzentrationen weit über der K_D des ternären Komplexes mit einem hohen Bindungs-

grad zu rechnen ist. Diese hohen Konzentrationen sind jedoch nicht immer leicht einzustellen. Das liegt daran, dass die Ausgangsmaterialien nicht in beliebig großen Mengen synthetisierbar sind, aber auch an bestimmten experimentellen Erfordernissen. So sind beispielsweise für FCS bzw. FCCS oder auch AFM nicht beliebig hohe Konzentrationen einstellbar, da sonst keine Messungen möglich sind.

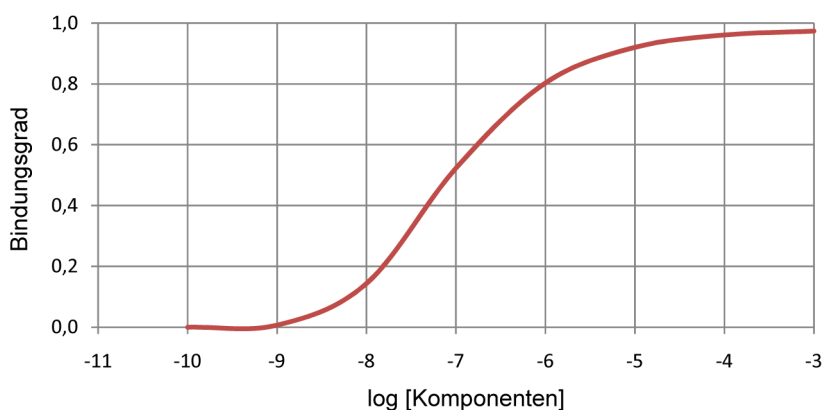


Abbildung 62: Simulation der Komplexbildung zweier DNA-Komponenten mit der Polyamid-Stütze.

So liegt eine für AFM-Aufnahmen günstige Konzentration bei etwa 2-5 nM, ansonsten ist die Oberfläche so dicht mit Ringen besetzt, dass die Unterscheidung zwischen Komplexen und Monomeren nicht mehr möglich ist (siehe Abbildung 66 e). Experimentell wurde dieses Dilemma dadurch angegangen, dass eine konzentrierte Lösung der Komplexe erst unmittelbar vor der Auftragung auf die Glimmer-Oberfläche verdünnt wurde. Dennoch waren auf AFM-Aufnahmen der ternären Komplexe nie höhere Bindungsgrade als 50 % zu sehen gewesen (siehe Abbildung 60). Unklar ist jedoch, ob die Komplexe bereits in der konzentrierten Lösung diesen Bindungsgrad aufwiesen oder ob die Dissoziation der Komplexe trotz der kurzen Inkubationszeit bei niedriger Konzentration zu einem nennenswerten Abfall der Komplexausbeute führte.

3.2.9.3 Adsorption der Polyamid-Stütze an Oberflächen

Ein weiteres Problem der Polyamid-Stützen ist, dass bei der Arbeit mit Polyamid-Stützen in verdünnten Lösungen stets eine Abnahme der Konzentration auftrat. Dieser Effekt wurde nicht beobachtet, solange **PA-A** oder **PA-B** alleine inkubiert wurden. Der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten ist nicht ganz klar, doch wurde Adsorption als Ursache vermutet, die bei allen Oberflächen auftrat, etwa an Plastik-Schnappdeckelgläschen aber auch an Glasoberflächen. Dabei nahm die Konzentration innerhalb von Minuten oder weniger Stunden um die Hälfte ab und konnte durch Vorinkubation der Reaktionsgefäße mit bovinem Serum-Albumin (BSA) nicht, mit Polyornithin zumindest teilweise verhindert werden. Hierfür wurde zuvor ein Reaktionsgefäß über Nacht mit Polyornithin-Lösung (siehe Abbildung 65) inkubiert (0,1 mg/ml). Die-

ser Umstand deutet darauf hin, dass eine polare Wechselwirkung mit für die Adsorption verantwortlich sein kann. Der Konzentrationsverlust war nicht erkennbar von der Art oder Länge des verwendeten Linkers abhängig oder aus welchen Polyamiden die Stütze aufgebaut war..

Für Adsorption als Mechanismus spricht das Ergebnis eines Versuches der Konzentrationsmessung mit zwei verschiedenen Küvetten, einer Quarzküvette für etwa 60 μl Lösung und eine Mikroküvette mit Spiegelaufsatz (siehe Abbildung 63). Nahm bei der Quarzküvette die gemessene Konzentration im Laufe der Zeit schnell ab, so war die Absorption des UV-Lichts bei der Mikroküvette stabil. Ein möglicher Grund für diesen Unterschied könnte sein, dass in der Mikroküvette wegen fehlender Seitenwände alles adsorbierte Material im Strahlengang bleibt, und damit weiterhin das Licht absorbiert, während in der Quarzküvette auch die übrigen Seitenwände beschichtet werden und damit weniger Licht absorbiert wird. Damit nähme zwar auch in der Mikroküvette die tatsächliche Konzentration des Tropfens ab, doch wird sie nicht detektiert.

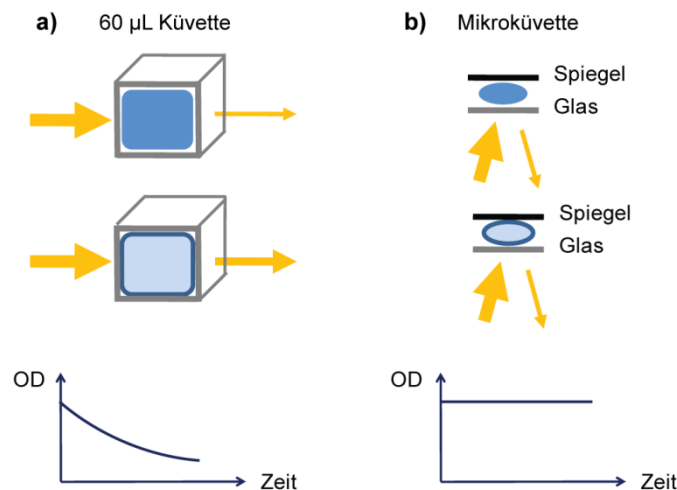


Abbildung 63: Vermuteter Adsorptionseffekt durch die Polyamid-Stütze in verschiedenen Küvetten. a) Die Beschichtung aus einer Polyamid-Stützen Lösung findet an allen Oberflächen einer 60 μl Küvette gleichermaßen statt; die gemessene optische Dichte (OD) der Lösung nimmt ab. b) Konzentrationsmessung in einer Mikroküvette. Alles adsorbierte Polyamid bleibt im Strahlengang, daher ändert sich die OD nicht.

Dieser Adsorptionseffekt und damit eine über längere Zeiträume nicht genau einstellbare Konzentration dürfte ein weiterer Grund dafür sein, dass die beobachteten Komplexausbeuten nicht über 50 % hinausgegangen sind. Denn wenn die Überlegungen zu Stöchiometrien in Abschnitt 3.2.9.1 richtig sind, sind bei ternären Komplexen exakte äquimolare Verhältnisse entscheidend für eine hohe Ausbeute. Des Weiteren legt das Experiment zur Reversibilität der sogar deutlich stabileren Polyamid-Anker-Komplexbildung (Abbildung 89 in Kapitel 3.6.5) den Schluss nahe, dass die Inkubationszeit deutlich länger als wenige Minuten sein sollte. In einem Experiment (Abbildung 60 rechts) wurde darauf spekuliert, dass ein 3-facher Überschuss an Stütze (nach

mehreren Tagen Inkubationszeit) an die Gefäßwand adsorbiert und nur jener Teil in Lösung bleibt, der zwei DNA-*minicircles* komplexiert. In diesem Bild war die Ausbeute an *minicircles* in der Tat vergleichbar groß, wie in kürzer inkubierten Vergleichsproben mit den exakten stöchiometrischen Verhältnissen.

Der Effekt der Adsorption von Material an Oberflächen trat übrigens auch bei DNA-*minicircles* auf, allerdings deutlich langsamer. Hier lag die „Halbwertszeit“ in der Größenordnung von Tagen statt bei wenigen Stunden (vgl. Abschnitt 3.6.5). Wie dort vorgeschlagen könnten in Zukunft spezielle *LoBind*-Reaktionsgefäße mit niedrigerer Adsorptionstendenz ausgetestet werden, oder aber die Reaktionsgefäße mit Polyornithin vorinkubiert werden. Ein Einfluss der Polyornithin-Vorinkubation auf die Konzentrationsstabilität der DNA-Ringe wurde bislang nicht untersucht. Eine andere Lösung des Adsorptionsproblems besteht darin, ein Polyamid kovalent mit den *minicircles* zu verknüpfen (vgl. Abschnitt 3.6), da damit die DNA-Lösungseigenschaften überwiegen.

3.2.10 Bewertung und Ausblick

Ein Nachteil der Polyamid-Stütze ist, dass zwei Komplex-Bindungen *gleichzeitig* ausgebildet werden müssen, während zum Auseinanderfallen nur eine der beiden Bindungen gelöst werden muss. Des Weiteren müssen die Stöchiometrien der Bindungspartner genau eingehalten werden. Dieser Nachteil könnte möglicherweise dadurch umgangen werden, dass mehrere Stützen für das Zusammenhalten zweier DNA-Einheiten eingesetzt werden. Dadurch könnten wie bei der kooperativen Interaktion mehrerer *sticky ends* bei dem Kristallwachstum von DNA-Kacheln²⁰⁶⁻²⁰⁸ oder bei DNA-Origami eine robustere Bindung generiert werden, die möglicherweise auch Überschüsse an Stütze toleriert.

Eine zukünftige Einsatzmöglichkeit von Polyamid-Stützen wäre denkbar, wenn eine hypothetische DNA-Architektur oder -Maschine an einen unverzweigten DNA-Doppelstrang angeracht werden soll. Dieser Doppelstrang könnte möglicherweise aus einem Biologischen Kontext stammen, was es ermöglicht, eine zukünftige DNA-Maschine an einen Doppelstrang zu fixieren. Mit einer oder besser mehreren Polyamid-Stützen wäre es darüber hinaus möglich, fertig gefaltete Architekturen wie DNA-*tiles* oder DNA-Origami miteinander zu verkleben. Die Polyamid-Stütze wäre damit nicht ein Ersatz für etablierte Methoden der strukturellen DNA-Nanotechnologie, sondern eine möglicherweise nützliche Ergänzung.

3.3 AFM von *minicircles*

Eine zentrale Technologie für diese Arbeit stellte die Rasterkraftmikroskopie dar. Weder in unserem Arbeitskreis noch bei unseren Kollaborationspartnern von den Arbeitskreisen von Prof. Wandelt oder Prof. Kolbesen war AFM von DNA etabliert; daher sollten die wichtigsten Entwicklungen, Parameter und Arbeitsweisen, welche AFM zu einer extrem zuverlässigen Methode mit kurzen Antwortzeiten haben werden lassen, in diesem Kapitel besprochen werden.

Kontakt- oder *tapping*-Modus?

Wie in Abschnitt 1.6.1 dargestellt eignet sich für die Messung weicher Proben der *tapping*-Modus eher als der Kontakt-Modus, da die dabei auf die Probe ausgeübten Kräfte geringer sind.

Beim zuerst benutzten Gerät (ehemals Molecular Imaging Inc., jetzt Agilent, PicoScan) aus der Gruppe von Prof. Wandelt wird ein magnetisch beschichteter Cantilever durch ein unter der Probe erzeugtes Magnetfeld zum Schwingen angeregt. Jedoch war es längst nicht bei jeder Spitze möglich, eine stabile Schwingung zu erreichen. Bei den Geräten der Firma Veeco (welche unter anderem die Arbeitsgruppen Seeman und Kolbesen verwenden) wird die Schwingung des Cantilevers durch eine Oszillation des *z*-Piezos des Scankopfes oder besser durch einen im Sondenhalter eingebauten Piezo angeregt. Bei diesen letzteren Geräten war die Anregung der Schwingung weniger störanfällig. Aus diesem Grund und aufgrund des deutlich höheren Preises für magnetisch beschichtete Sonden erscheint die mechanische Anregung überlegen. Die oft postulierte bessere Auflösung magnetisch angeregter Geräte konnte in eigenen Experimenten nicht gefunden werden.

Puffer oder Luft?

DNA kann sowohl in Puffer (siehe Abbildung 64) als auch getrocknet an Luft (siehe Abbildung 66) gemessen werden. Zu Beginn dieser Arbeit wurde ausschließlich in Puffer gemessen, da auch die Mehrzahl der publizierten AFM-Bilder von DNA-Nanoarchitekturen in Puffer erzeugt wurde. Messungen in Puffer haben den Vorteil, dass die DNA zu jeder Zeit in nativen Bedingungen vorliegt. Des Weiteren zeigten in Puffer erzeugte Bilder manchmal einen leicht höheren Kontrast als bei Abbildung an Luft. Durch den Phasenübergang sind Messungen in Puffer auch weniger anfällig gegen akustische Störungen und Schwingungen, was schnellere Scanfrequenzen (meist problemlos bis 3 Hz pro Zeile) erlaubt. Jedoch ist ein Nachteil dieser Methode, dass der Puffer bei längeren Messzeiten verdampft und sich aus aufkonzentrierten Pufferlösungen störende Salzablagerungen auf der Oberfläche bildeten. Der wichtigste Nachteil der Messungen in Puffer ist jedoch, dass die Gebrauchsdauern der Sonden sehr stark hinter Trockenmessungen zurückfielen. Oft ging während eines Scanvorganges schlagartig die Auflösung verloren, vermutlich aufgrund von Fremdkörpern, die sich aus dem Puffer an die Spitze hafteten. Manchmal ließ

sich die Spitze regenerieren (s.u.) andernfalls musste die Sonde getauscht werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass von den verwendeten Sonden für den Puffer-Modus (DNP-S/ Veeco) nur etwa jede 5. bis 10. Spitze eine befriedigende Auflösung bot, was jedoch literaturbekannt ist.¹⁰³ Von den Spitzen für den Trockenmodus (ACT/ APP Nano) war hingegen mindestens jede zweite scharf genug, um die *minicircles* auflösen zu können, was die Suche nach einer geeigneten Spitze sehr verkürzte. Des Weiteren zeigten diese Spitzen kaum Anfälligkeit gegenüber Verschmutzungen, ließen sich häufig regenerieren und waren damit um ein Vielfaches länger einsetzbar als die Sonden im Puffer. Des Weiteren konnten DNA- und Protein-Proben, welche auf Glimmer getrocknet waren, viele Wochen ohne jeglichen Abbau oder Verschmutzung aufbewahrt werden. Aus diesen Gründen und aufgrund der einfacheren Probenpräparation wurden Messungen in letzter Zeit fast ausschließlich an Luft durchgeführt.

Positivierung der Oberfläche

Um DNA mit AFM abzubilden, muss sie auf eine geeignete Oberfläche aufgebracht werden. Für viele Biomoleküle und auch DNA eignet sich Glimmer in besonderer Weise. Glimmer ist ein in dünnen Plättchen erhältliches Schichtsilikat, dessen Schichten durch Abziehen mit handelsüblichem Transparentklebestreifen gespalten werden können, so dass für jede neue Probenpräparation eine saubere Oberfläche zur Verfügung steht.

Glimmer hat jedoch eine negativ polarisierte Oberfläche, so dass die ebenfalls negativ geladene DNA elektrostatisch abgestoßen wird, wenn die negativen Ladungen an der Oberfläche nicht kompensiert werden. Drei Strategien sind im Verlauf dieser Arbeit ausgetestet worden, die zwar alle bereits literaturbekannt waren, aber nach bestem Wissen noch nicht gegeneinander an sehr kleinen DNA-Objekten und -Komplexen getestet wurden. Die erste Strategie sah eine Vorinkubation der Oberfläche mit Nickelchlorid vor (Abbildung 64 a). Das von Dr. Goran Rasched in seiner Doktorarbeit erarbeitete Protokoll hat sich bewährt,^{187,199,209} jedoch dauert die Probenvorbereitung verhältnismäßig lange; des Weiteren ist Nickel auch giftig und allergen.

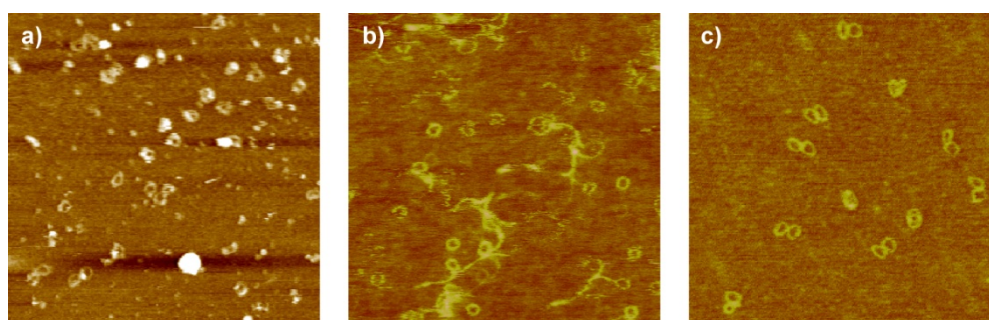


Abbildung 64: AFM-Aufnahmen von *minicircles* in Puffer mit verschiedenen Positivierungen der Glimmeroberfläche. Positivierung mit a) NiCl_2 ; b) MgCl_2 ; c) Polyornithin. Für die Probenvorbereitung benötigte Stoffmengen: a) 0,1 pmol b) 0,1 pmol c) 0,001-0,01 pmol.

Die in der Literatur am häufigsten zu findende Methode ist das direkte Auftragen der Proben in Magnesiumchlorid-haltigen Puffern auf die Glimmer-Oberfläche und das Messen unter Puffer. Dieses Protokoll erlaubte ebenfalls die Abbildung der *minicircles* (Abbildung 64 b), jedoch fielen die Ergebnisse gerade beim Messen im Trockenem weit hinter die mit dem dritten dieses Protokoll erzielten Ergebnisse zurück (siehe Abbildung 66 a und c). Die Vorbehandlung der Oberfläche mit Poly-L-ornithin-Hydrochlorid (kurz Polyornithin, Abbildung 65) lieferte sowohl beim Scannen unter Puffer (Abbildung 64 c) als auch an Luft (Abbildung 66 b und d) die besten Bilder und hat auch weitere wichtige Vorteile gegenüber den anderen Methoden.

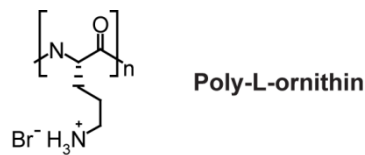


Abbildung 65: Struktur von Poly-L-ornithin-Hydrobromid (Polyornithin), welches zum Positivieren der Glimmer-Oberfläche eingesetzt wurde.

Der erste ist die scheinbar höhere Festigkeit der Interaktion der DNA mit einer Polyornithin-modifizierten Oberfläche, was besonders klar beim Vergleich mit Magnesium zutage tritt. In Abbildung 64 b (einer der besten Aufnahmen aus dem Praktikum in Prof. Seemans Labor) ist augenfällig, dass nicht alle Ringe mit gleichem Kontrast zu sehen sind. Einige der Ringe scheinen gleichsam durchsichtig. In anderen Aufnahmen ist ein Verschieben der Ringe durch die Spitze zu erahnen gewesen. Dies könnte aus einer für das Scannen nicht ausreichend festen Adsorption der Ringe an die Glimmeroberfläche herrühren. Bei den Abbildungen mit Polyornithin ist dies nicht der Fall. Alle Ringe haben den gleichen Kontrast und werden durch die AFM-Spitze auch nicht verschoben. Dies kann man aus mehreren hintereinander aufgenommenen Bildern schließen, in denen sich die Anzahl, relative Lage und Anordnung von Ringen gegenüber einem nicht verschiebbaren Fremdkörper auf der Oberfläche über mehrere Scanvorgänge nicht ändert.

Dieser Umstand lässt einen *hit and stick*-Mechanismus wahrscheinlich erscheinen, also eine sofortige und quasi irreversible Adsorption beim Auftreffen der DNA auf die Polyornithin-modifizierte Oberfläche. Für diesen Mechanismus spricht auch, dass in manchen Vergleichsaufnahmen die Dichte von Ringen mit Polyornithin merklich über der ohne Polyornithin ist. Dieser Unterschied wird besonders in Abbildung 64 deutlich, da für die ersten beiden Bilder etwa 10-mal so viel Material eingesetzt werden musste um etwa die gleiche Dichte zu erzielen wie im letzten. Aber auch in Abbildung 66 sind etwas mehr Ringe auf den Polyornithin-Bildern zu sehen also ohne Polyornithin.

Der augenfälligste Unterschied zwischen den Bildern, die unter Puffer und denen, die an Luft aufgenommenen wurden, ist, dass die Ringe ohne Polyornithin eine Tendenz zum Kollabieren

haben (Abbildung 66 a und c). Vermutlich sind diese Ringe durch das Abspülen mit deionisiertem Wasser und das Trocknen kollabiert, da die Form der Ringe unter Puffer nicht von der Positivierung der Oberfläche abhängt. Damit wird das Kollabieren möglicherweise durch die feste Interaktion mit dem Polyornithin verhindert.

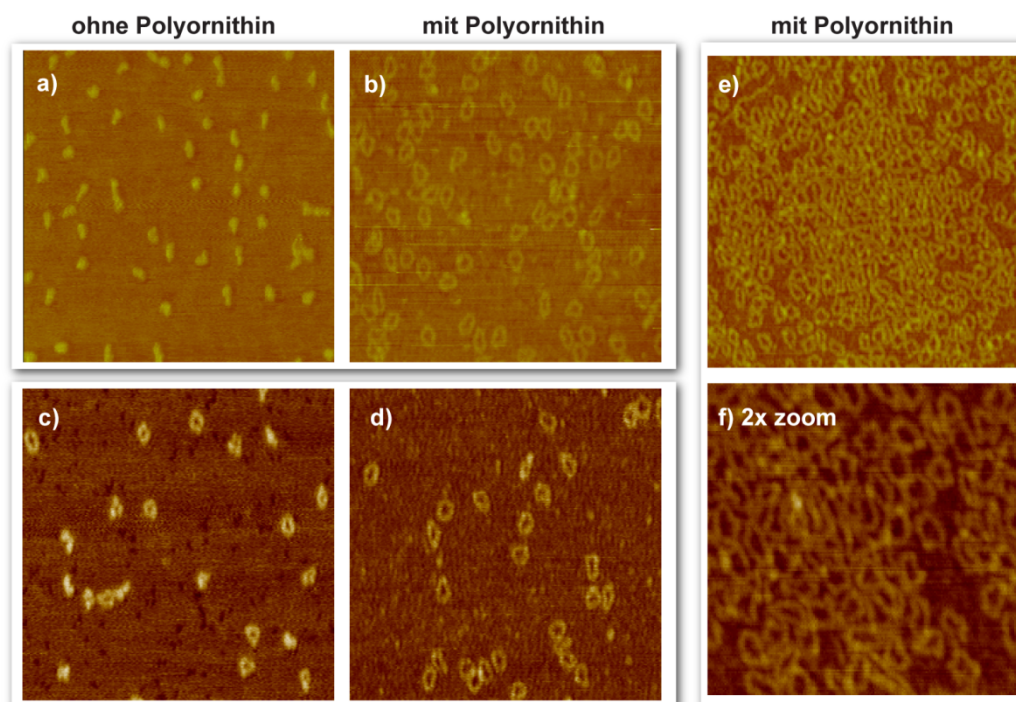


Abbildung 66: Einfluss von Polyornithin beim Scannen an Luft. a) und b) bzw. c) und d) sind jeweils identische Proben, abgebildet mit derselben Spitze, jedoch erst auf einer unbehandelten Glimmeroberfläche, dann noch einmal auf einer mit Polyornithin vorinkubierten Oberfläche. e) und f) AFM-Aufnahme und Vergrößerung nach versehentlich zu hoch eingestellten *minicircle*-Konzentration. (Kantenlängen a-e 500 nm)

Wie fest die Bindung ist, kann man auch an einem Experiment erkennen, in dem versehentlich eine zu hohe *minicircle*-Konzentration verwendet wurde (Abbildung 66 e und f). Die Analyse dieser Bilder zeigt, dass die Ringe teilweise stark deformiert vorliegen, jedoch praktisch nie übereinander zu liegen kommen. Damit muss die Anziehungskraft mit der Oberfläche stärker sein als die zur Deformation der Ringe notwendige Kraft.

Der postulierte *hit and stick*-Mechanismus hat aber auch Implikationen über die Form und den Kontrast der Ringe, also eher kosmetische Faktoren, hinaus. Wird ein Komplex aus zwei Ringen mit abgebildet, so sollte der auf den Bildern beobachtete Bindungsgrad möglichst demjenigen in der Lösung entsprechen. Eine Assemblierung von Komplexen erst auf der Oberfläche oder deren Zerfall nach der Adsorption kann bei den verwendeten Bedingungen nahezu ausgeschlossen werden. Diese These steht damit nur scheinbar im Gegensatz zu einem berichteten Zusam-

menbau von DNA-Strukturen aus den Einzelsträngen auf einer Oberfläche,²¹⁰ da der Zusammenbau in jenem Bericht bei 50°C an einer unmodifizierten Oberfläche erfolgte.

Erst ein „Einfrieren“ von Komplexen auf der Oberfläche erlaubt also für viele der hier besprochenen Projekte einen Rückschluss auf eine Komplexbildung in Lösung. Serien von Aufnahmen derselben Proben mit und ohne Polyornithin (wie jene in Abbildung 66 c und d) zeigen jedoch, dass nicht nur die Abbildungseigenschaften der Ringe durch Polyornithin verbessert sind, sondern dass auch der Anteil an Komplexen gegenüber Monomeren deutlich höher ist. Die Ursache für diesen Fund ist nicht klar, möglicherweise wird ein Komplex bei der Adsorption eines Partners auseinander gerissen, der zweite Partner aber durch die niedrigere Anziehungskraft nicht wie in Abbildung 88 e) in unmittelbarer Nachbarschaft adsorbiert. Dass es sich bei dem höheren Anteil von Monomeren auf unbehandeltem Glimmer um ein falsch negatives Ergebnis handelt und nicht die Dimere auf Polyornithin ein falsch positiver Befund sind, kann man aus alternativen Methoden (FCCS, Gel) ableiten oder auch daran sehen, dass unmodifizierte Ringe auf Polyornithin allein keine Wechselwirkungen zeigen.

Erst die starke Bindung von mit Polyornithin positiviertem Glimmer ermöglichte vermutlich die Abbildung der G-Quadruplex induzierten Komplexen (siehe Kapitel 3.8). Hätten wir jene Komplexe auf unmodifizierten Glimmer aufgegeben, so hätten die in hohen Konzentrationen an monovalenten Kationen die ohnehin schon schwachen Magnesium Salzbrücken zusätzlich abgeschirmt und die Abbildung wäre vermutlich gar nicht möglich gewesen.²¹¹ So aber waren nicht nur monovalente Kationen, sondern selbst längeres Abspülen der Glimmerplättchen mit deionisiertem Wasser unproblematisch, was bei unbehandeltem Glimmer zu einer Desorption der DNA führen würde.²¹¹

Einen kleinen Nachteil haben positivierte Oberflächen aber dennoch. Polyornithin und auch das verwandte Polylysin verkürzen die Persistenzlänge von DNA.^{211,212} Damit erscheint es möglich, dass die nichtzirkuläre Form von *minicircles* auf einigen Bildern teilweise der Interaktion mit der Oberfläche geschuldet ist und nicht aus Fehlern oder Deformationen des Ringes selbst herrührt. Nach all diesen Betrachtungen stellt sich die Frage, warum praktisch alle publizierten Nanoarchitekturen auf unmodifiziertem Glimmer aufgenommen werden konnten. Die Antwort liegt vermutlich in der Größe der Strukturen. Während eine DNA-Origami Einheit (ca. 8000 bp) bereits 50-mal so viel Auflagefläche hat wie ein *minicircle* mit 168 bp, so erreichen 2-D-Kristalle aus DNA-Kacheln leicht eine 1000-fache Auflagefläche. Damit ist es deutlich schwerer, eine so große Struktur zu verschieben und damit reicht schon eine geringe Anziehungskraft pro Fläche für eine quasi irreversible Adsorption. Gerade bei sehr großen dreidimensionalen Origami-Strukturen stellt sich eher das Problem, dass die Strukturen aufgrund ihrer großen potentiellen Auflagefläche auf Glimmer auseinandergerissen werden und eher eine geringere Anziehungskraft wünschenswert wäre (persönliche Kommunikation von W. Shih).

Prozeduren zum Schärfen oder Regenerieren der AFM-Spitze

Der wichtigste Faktor für die Qualität der Bilder ist eine scharfe Spitze. Es wurden mehrere Prozeduren angewendet oder entwickelt, um Spitzen von Verunreinigungen zu befreien.

Vor dem erstmaligen Gebrauch empfiehlt Veeco, die Spitzen mit einer UV-Handlampe zu bestrahlen. Hierfür wurden die Spitzen auf einem Stück Aluminiumfolie für 1-12 h bestrahlt. Danach war der Anteil von Spitzen, die ein scharfes Bild lieferten, subjektiv höher als bei nicht bestrahlten Sonden. Durch Bestrahlung gelang es auch einmal eine Spitze zu regenerieren, die während des Messens in Puffer unscharf geworden ist. Ein Reinigen der Sonde mit Wasser oder Druckluft war selten erfolgreich und wurde daher auch kaum durchgeführt.

Eine unkonventionelle Methode zum Regenerieren von unscharfen Spitzen wurde versehentlich entdeckt. Durch Aufsetzen der Spitze auf die Glimmer-Oberfläche konnte in etwa einem von zwei Fällen eine während einer Messung verschmutzte Spitze regeneriert werden. Dabei sank die Laser-Intensität am Detektor durch den stark geänderten Reflektionswinkel des Cantilevers auf null ab. Wie in Abbildung 67 zu sehen ist, entsteht dabei ein Krater im Glimmer, doch neben dem Krater sind *minicircles* in guter Auflösung zu sehen, was den Erfolg der Methode dokumentiert. Vor dem Aufsetzen konnte dieselbe Spitze die *minicircles* kaum auflösen. Vermutlich werden durch diese Prozedur an der Spitze anhaftende Verunreinigungen abgestreift.

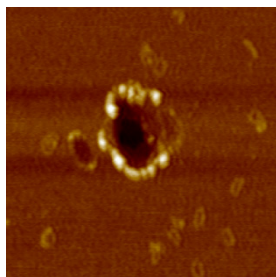


Abbildung 67: Spitzen-Krater, entstanden durch ein kontrolliertes Aufsetzen der AFM-Spitze auf die Glimmer-Oberfläche.

3.4 LILBID-Massenspektrometrie von Komplexen mit DNA

LILBID-Massenspektrometrie (*laser induced liquid bead ionization/desorption*, Laser induzierte Flüssigkeits-Ionisation/ -Desorption) ist eine in der Arbeitsgruppe von Prof Brutschy an der Universität Frankfurt entwickelte Massenspektrometrie-Methode, mit der Biomoleküle und Komplexe besonders schonend nachgewiesen werden können.²¹³⁻²¹⁵ Zwar gelingt auch der Nachweis mit ESI (Electrospray Ionisation)-Massenspektrometrie der Nachweis von nicht-kovalenten Komplexen, doch ist dies im Standardbetrieb mit kommerziell erhältlichen Geräten oder bei Salzhaltigen Proben mit erheblichen Problemen behaftet.²¹⁶ Der Hauptunterschied zwischen LILBID und ESI ist, dass bei LILBID niedrig geladene Spezies entstehen.

Motivation für die Kollaboration mit Dr. Nina Morgner und später mit Jan Hoffmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Brutschy war zunächst, die ternären Komplexe mit der Polyamid-Stütze nachzuweisen, doch gelang dies erst nach erheblichen Verbesserungen in den experimentellen Protokollen. Später wurde die Zusammenarbeit auf Interaktionen zwischen Nukleinsäuren und Nukleinsäure-Protein-Komplexe ausgeweitet.

3.4.1 Funktionsweise

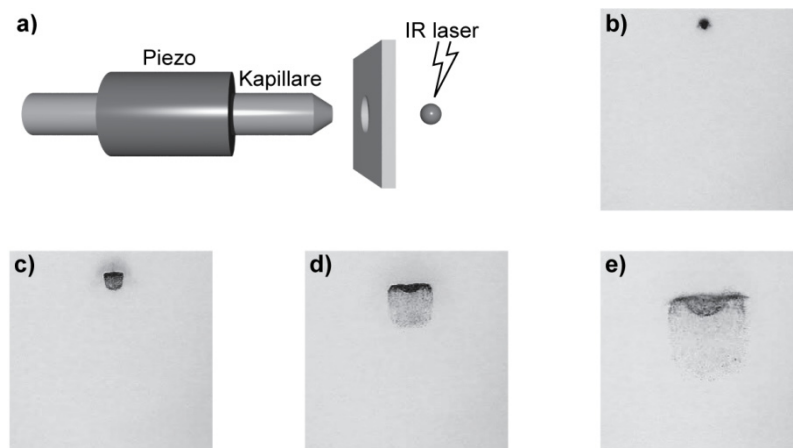


Abbildung 68 a) Die LILBID-Ionisationseinheit. b-e) Explosion eines Flüssigkeits-Töpfchens nach Bestrahlung durch einen IR-Laser.

Die Besonderheit von LILBID-Massenspektrometrie ist eine besonders schonende und salztolerante Ionisationsmethode. Ein Piezo-getriebener Töpfchen-Generator gibt in hoher Frequenz kleinste (wenige pL) Flüssigkeits-Tropfen ins Vakuum des Massenspektrometers ab, in dem

diese nachfolgend mit einem intensiven IR (Infrarot)-Laser-Puls bestrahlt werden (siehe Abbildung 68). Durch die hohen Leistungsdichten explodieren die Flüssigkeitstropfen und verdampfen im Vakuum. Durch die Schnelligkeit dieses Prozesses bleiben selbst empfindliche nicht-kovalente Komplexe weitgehend intakt. Nach dieser Ionisation und weitgehender Desolvatation werden die Ionen mit einem *Reflectron Time of Flight*-Massenspektrometer (RE-TOF) detektiert.

3.4.2 LILBID-Massenspektrometrie von PA-DNA-Komplexen

In einem ersten Kollaborationsprojekt mit Dr. Nina Morgner sollte untersucht werden, ob die Komplexe aus den DNA-Haarnadeln und den Polyamiden, sowie der ternäre Komplex aus zwei DNA-Haarnadeln und der Polyamid-Stütze durch LILBID-Massenspektrometrie nachzuweisen sind. Hierfür wurden alle Kombinationen aus den beiden DNA-Haarnadeln **DNA-A** und **DNA-B** mit beiden Polyamiden **PA-A** und **PA-B** untersucht (siehe Abbildung 69). Hierfür wurden die entsprechenden Komponenten in äquimolaren Verhältnissen in Ammoniumacetat-Puffer inkubiert und dann gemessen. Dabei zeigte sich wie erwartet, dass im *match*-Fall der Peak der Komplex stärker ausgeprägt war als der Peak der DNA allein und im *mismatch*-Fall die DNA ohne Polyamid stärker zum Vorschein trat.

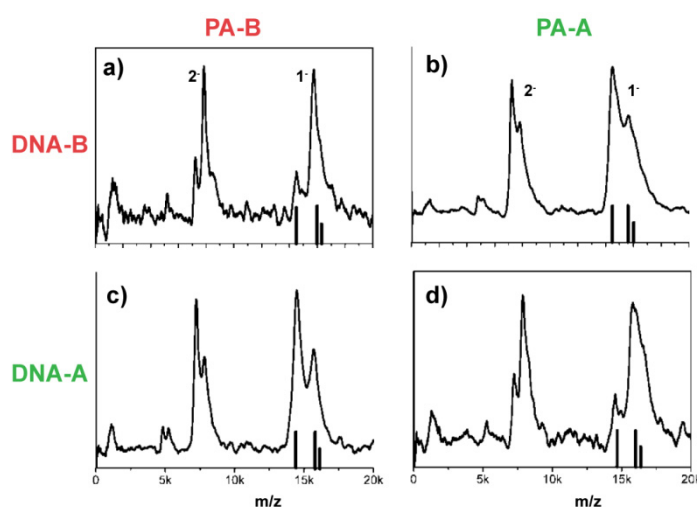


Abbildung 69: Massenspektren von DNA-Polyamid-Komplexen. a) und d) *match*-Fall, b) und c) *mismatch*-Fall. In den Spektren sind die Massen der DNA-Haarnadeln durch einen einfachen Balken, die DNA-PA-Komplexe durch einem Doppelbalken markiert.

Allerdings war es in ersten Versuchen noch nicht möglich, wie erhofft auch den ternären Komplex mit der DNA-Stütze nachzuweisen.

Dies gelang schließlich, als damit begonnen wurde, dem Ammoniumacetat-Puffer etwa 1 mM MgCl_2 beizumischen. Wie in Abschnitt 3.6.1 diskutiert sind Magnesiumsalze für die strukturelle

Integrität von DNA-Strukturen vermutlich von hoher Bedeutung und haben auch in der LILBID-Massenspektrometrie zu einer besseren Detektierbarkeit von DNA Duplexen (siehe Abbildung 70) und Komplexen beigetragen.

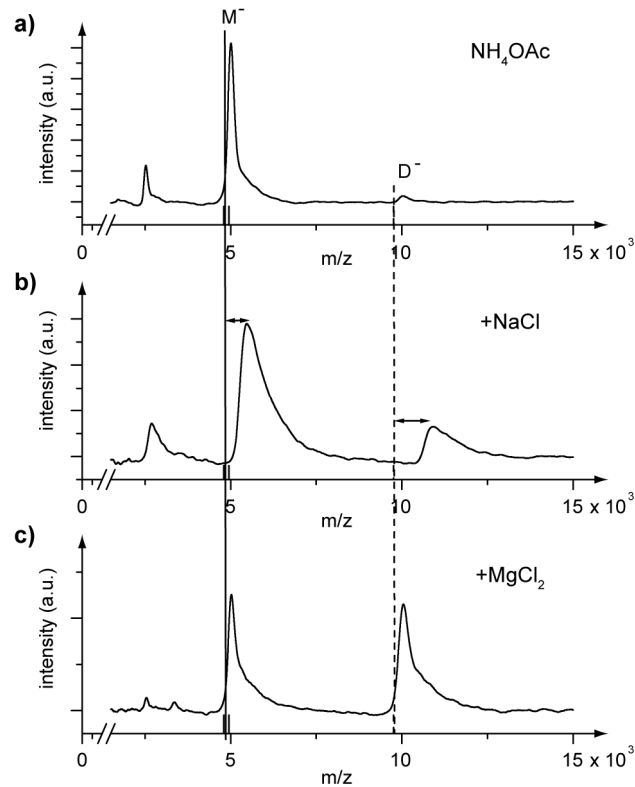


Abbildung 70: LILBID-Massenspektrometrie von einem 16 bp langen DNA-Duplex. a) Nur NH_4OAc -Puffer, b) NH_4OAc und 10 mM NaCl , c) NH_4OAc und 1 mM MgCl_2 . Die durchgezogene Linie zeigt die Lage des Monomers (oder doppelt geladenen Dimers) an, die gestrichelte Linie ist bei der genauen Masse des Dimers.

Wie in Abbildung 70 ersichtlich, war ohne die Zugabe von Metallsalzen praktisch kein DNA-Duplex eines 16-mers nachzuweisen. Natrium erlaubte dieses zwar, jedoch war die beobachtete Masse ein wenig zu hoch und die Peaks sehr breit. Mit Magnesiumchlorid hingegen blieben die Peaks scharf, bei der richtigen Masse und auch der Duplex war stabil.

Es wurden zwei verschiedene Versuche mit der Polyamid-Stütze durchgeführt. Im ersten (Abbildung 71 a) wurden dieselben gleich großen DNA-Haarnadeln wie in Kapitel 3.2 benützt. Zwar konnte ein Komplex aus zwei DNA-Haarnadeln und der Polyamid-Stütze nachgewiesen werden, doch die Sequenzspezifität konnte dieses Experiment nicht beweisen. Dies gelang, als die DNA-B Haarnadel um einige Nukleotide verlängert wurde. Nun war klar, wenn auch mit schlechter Ausbeute, der Komplex aus drei unterschiedlichen Spezies nachzuweisen. Warum

aber bei allen Experimenten auch ein Komplex aus zwei DNA-Strängen zu finden war, konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden. Vermutlich lagen die Haarnadeln im Gleichgewicht zu geöffneten Dimeren vor. Durch vorheriges Aufschmelzen und Abkühlen der DNA-Haarnadeln konnte die Population der Dimere zumindest deutlich gesenkt werden.

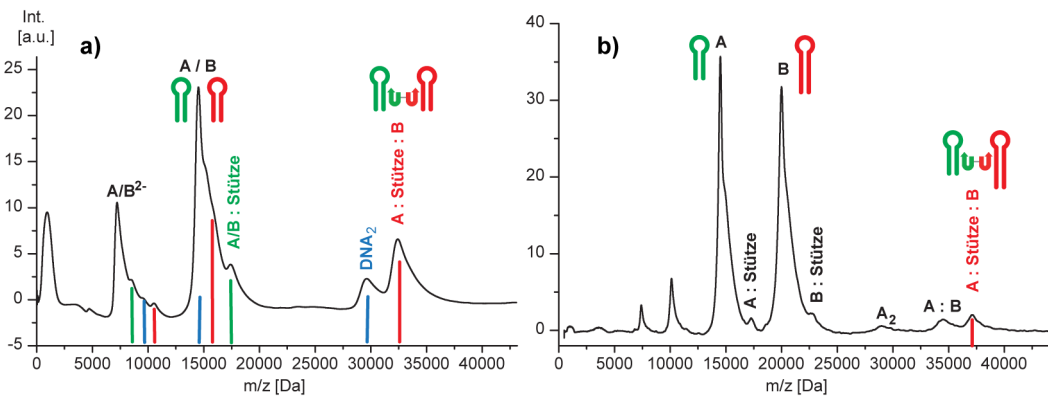


Abbildung 71: Komplexe mit der Polyamid-Stütze. a) Die DNA-Haarnadeln (A/B) sind gleich groß, b) DNA-Haarnadel B ist länger. Die Komplexe sind jeweils klar nachzuweisen, jedoch sind die Ausbeuten niedrig. Aus unbekanntem Gründen finden sich auch Komplexe aus zwei DNA Haarnadeln

Zwar wäre es auch reizvoll gewesen, einen den Komplex mit den DNA *minicircles* und der Polyamid-Stütze nachzuweisen, doch waren zum damaligen Zeitpunkt die Syntheseprotokolle noch sehr umständlich und die DNA Ringe nicht in den nötigen Mengen und einer befriedigenden Reinheit zu generieren gewesen.

Stattdessen sollte auf anderem Wege die Leistungsfähigkeit der LILBID Ionisation für sehr große DNA-Komplexe demonstriert werden.

3.4.3 LILBID von DNA-DNA-Komplexen

Es wurden zwei Systeme designt, welche aus jeweils nur zwei selbstkomplementären Oligonukleotiden bestanden. Dadurch waren diese Oligonukleotide in der Lage, lange Polymere zu bilden. Die beiden Systeme unterschieden sich in der Länge der *sticky ends*. Das erste System war symmetrisch aufgebaut. Es hatte jeweils 30 nt lange Überhänge, und hybridisierte mit dem Gegenstrang ebenfalls auf 30 bp Länge (Abbildung 72 a). Das zweite System war asymmetrisch und hybridisierte mit 40 bp und hatte 20 nt lange *sticky ends* (Abbildung 72 b).

Die LILBID-Massenspektren der beiden Systeme zeigten wie erwartet die Polymerisation der selbstkomplementären Paare, jedoch mit einem entscheidenden Unterschied. Wie erwartet gab es bei dem symmetrischen Paar keine bevorzugten Abbruchlänge, da alle Interaktionen (grau bzw. schwarz) annähernd gleich stark sein sollten.

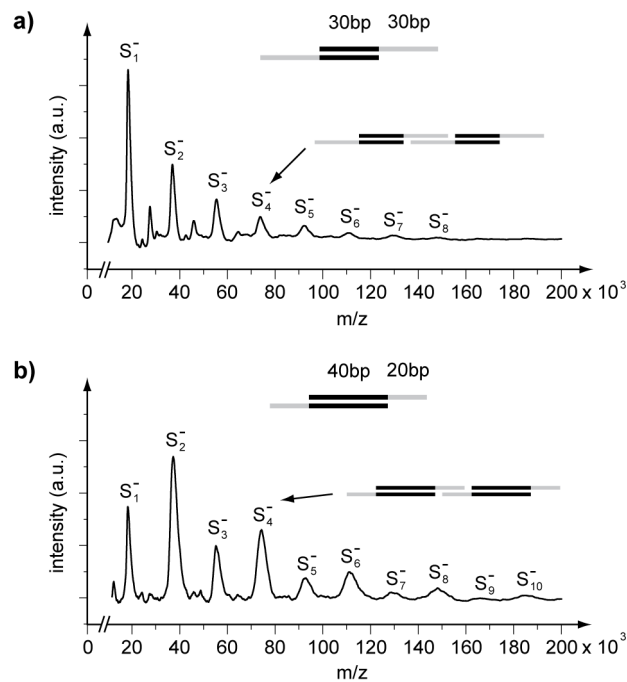


Abbildung 72 a) LILBID-Massenspektrum vom symmetrischen selbstkomplementären Oligonucleotid-Paar, b) Spektrum vom asymmetrischen Paar.²¹⁷

Hingegen ist im asymmetrischen Paar die schwarze Sequenz länger und damit stärker als die graue und daher gibt es jeweils mehr Komplexe mit einer geraden Anzahl von Oligonucleotiden als mit einer ungeraden Anzahl. Dies macht sich in einem alternierenden Muster im Massenspektrum bemerkbar und zeigt, dass thermodynamisch vorhergesagte Verhältnisse von Spezies korrekt durch LILBID abgebildet werden. Bemerkenswerterweise sind mit diesem sehr einfachen, nicht kovalenten System Komplexe bis zu einer Masse von fast 200 kDa als einfach geladene Komplexe sichtbar.

3.4.4 LILBID von Plasmid-DNA

Ermutigt durch die obigen Ergebnisse sollten noch größere DNA-Objekte gemessen werden. Wir entschieden uns für kommerziell erhältliche pUC19 Plasmide. Obwohl diese Plasmide topologisch geschlossene Catenane sind und für ihre strukturelle Integrität eigentlich keine Salze brauchen, waren die Spektren mit MgCl₂ überraschenderweise wieder schärfer und das Signal-Rausch-Verhältnis besser. Es konnte gezeigt werden, dass solch große Objekte immer noch problemlos mit LILBID zu detektieren waren. Hierbei wurden nun vermehrt auch höhere Ladungszustände beobachtet (Abbildung 73).

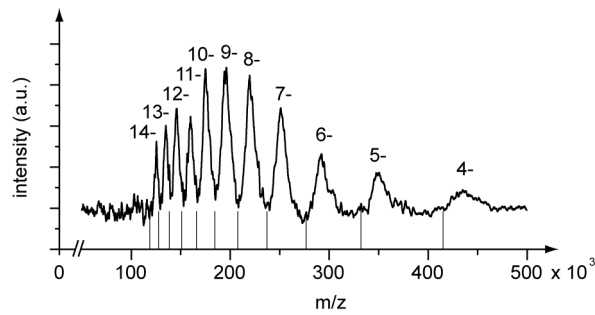


Abbildung 73: Spektrum des pUC19 Plasmids (2686 bp, 1.66 MDa)

3.4.5 LILBID von DNA-Protein Komplexen

In Folgeexperimenten sollte nun versucht werden, ob auch Protein-DNA-Komplexe mit so großer DNA messbar sind. Als gut etabliertes Testsystem wurde NF- κ B gewählt. NF- κ B ist ein sehr weit verbreiteter spezifischer Transkriptionsfaktor, der in mehreren verschiedenen großen Varianten vorkommt. Für diese Experimente entschieden wir uns für ein P50 genanntes Protein, welches als Homodimer mit einer subnanomolaren K_D an eine spezifische 10-11 bp lange Bindestelle binden kann²¹⁸⁻²²⁰ und zudem kommerziell erhältlich ist.

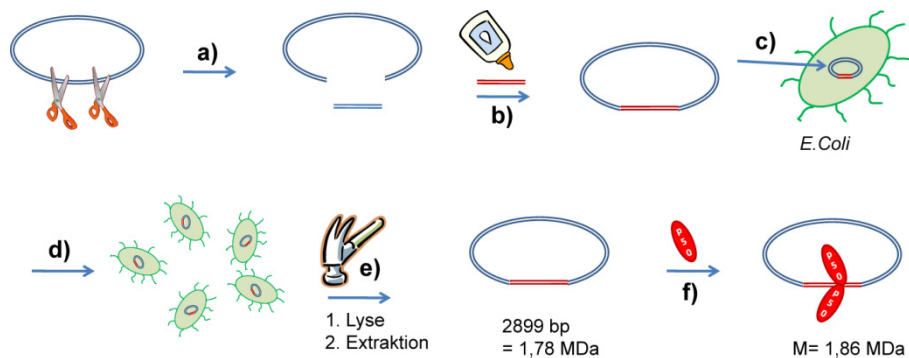


Abbildung 74: Darstellung von Plasmiden mit der Bindestelle für NF- κ B. Ein Plasmid wurde geschnitten (a). In den geöffneten Vektor wurde nun ein Doppelstrang mit der Bindestelle für NF- κ B einligiert (b). Auf diese Weise lassen sich Plasmide jedoch nur in geringen Ausbeuten erzeugen. Daher wurde es in *E.coli* transfiziert (c) und anschließend mit den Zellen vermehrt (d). Die Plasmide werden durch Lyse und Extraktion aus den Zellen gewonnen (e) und standen nun in größeren Mengen zur Verfügung. Bei der Inkubation mit den p50-Untereinheiten von NF- κ B (f) sollten diese als Dimere an das Plasmid binden.

Um ein Plasmid mit dieser Erkennungssequenz in einem zu erhalten, wurde ein längerer Doppelstrang mit der entsprechenden Sequenz in einen Vektor einligiert und in *E.coli* vermehrt (Abbildung 74). Diese Schritte wurden von der Firma Geneart durchgeführt.

Zwar war es ohne weiteres möglich, auch von diesem Plasmid LILBID-Massenspektren zu erhalten, doch konnten keine Komplexe mit p50 nachgewiesen werden. Aus einer Simulation, in der ein hypothetisches Spektrum des Komplexes über das Spektrum des reinen Plasmids gelegt wurde, wurde der Grund hierfür deutlich (Abbildung 75).

Die Simulation zeigt, dass gerade im Bereich mit den schärfsten Peaks und dem besten Signal-Rausch-Verhältnis zwischen 55 kDa und etwa 80 kDa die Peaks eines Ladungszustandes des Plasmids mit dem Ladungszustand $n+1$ des Komplexes zusammenfallen. Dadurch ist es unmöglich, in diesem Bereich die beiden Spezies auseinanderzuhalten. Da es unwahrscheinlich ist, dass die Komplexbildung quantitativ verläuft, könnte dies ein Grund für das Scheitern jener Experimente gewesen sein.

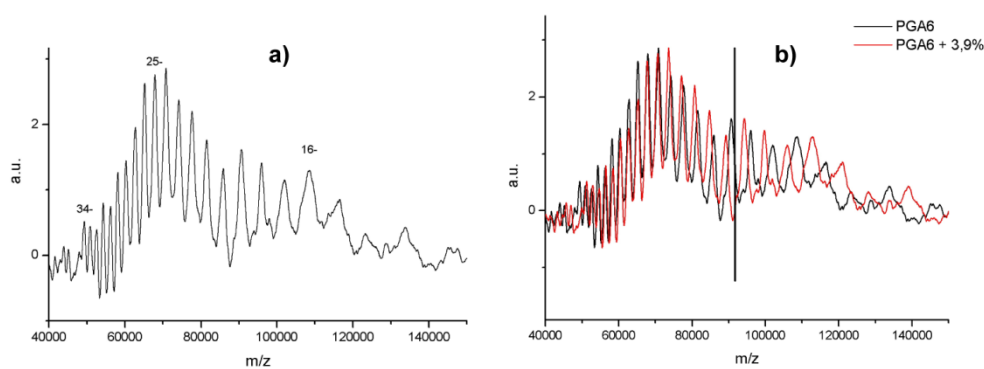


Abbildung 75 a) gemessenes Spektrum des pGA6-Vektors. b) In rot ist ein simuliertes Spektrum der Masse des pGA6-Vektors und zweier angelagerter p50-Monomere dem tatsächlich gemessenen pGA6-Spektrum überlagert.

Daher wurde ein System mit kürzeren Oligonukleotiden design, welches zur Kontrolle auch per FCS gemessen werden sollte. Da sich für FCS die Interaktionspartner einer Komplexbildung um mindestens den Faktor 8 unterscheiden sollten, wurde der 11 bp langen NF- κ B-Bindestequence jeweils nur 2 bp vorn und hinten angehängt, so dass ein 15-mer Duplex (mit Fluoreszenzlabel) entstand.

Bei den FCS-Messungen zeigte sich, dass das p50-Protein der Firma Cayman (Vertrieb über Biozol) praktisch nicht band, sondern erst das p50 aus einer Lieferung der Firma Promega. Mit dieser neuen Lieferung wurde der Komplex dann auch massenspektrometrisch in einem Kompetitions-Experiment, in dem ein längerer DNA-Doppelstrang ohne die Bindestelle zugegen war (siehe Abbildung 76).

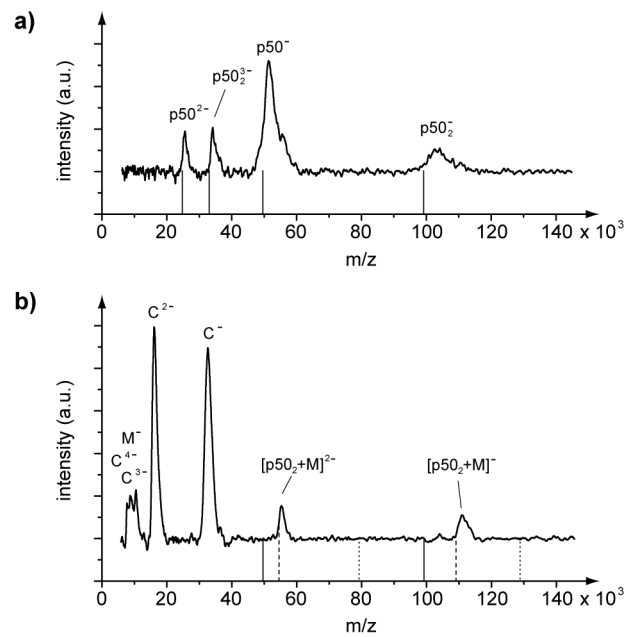


Abbildung 76 a) LILBID-MS-Spektrum der p50-Untereinheit von NF-κB. Zu einem gewissen Anteil liegt p50 bereits als Dimer vor. b) Bindungsexperiment mit der match-DNA M und der Kontroll-DNA ohne NF-κB Bindestelle C.

Die Kompetitionsstudie belegte klar die Sequenzspezifität von p50, da sich ausschließlich der Komplex von 2 p50-Einheiten mit der *match*-DNA bildete (bei etwa 110 kDa), und kein Komplex mit der Kontroll-DNA entstand (bei etwa 130 kDa). Durch einen leichten Überschuss an DNA gegenüber p50 war alles Protein im Komplex gebunden und lag nicht mehr frei (49 kDa) vor.

3.5 Eine Röhre aus *minicircles* und Polyamid-Stützen

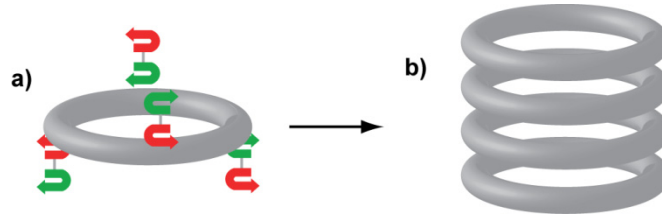


Abbildung 77: Schematische Darstellung einer durch Polyamid-Stützen zusammengehaltenen Röhre aus DNA-*minicircles*. a) Ein *minicircle* mit zwei Bindestellen für die Polyamid-Stützen auf der Oberseite und zwei auf der Unterseite. b) Geplante Selbstorganisation zu Röhren.

Aufbauend auf der Dimerisierung von zwei *minicircles* mit der Polyamid-Stütze sollte versucht werden, *minicircles* zu Röhren zu verkleben, wobei jeweils zwei Polyamid-Stützen die Verbindung zur nächsten Lage der Röhre vermitteln sollten (Abbildung 77). Aufgrund von geometrischen Überlegungen und um eine höhere Stabilität zu erhalten wären drei Stützen sicherlich vorteilhaft, doch muss für die Einführung einer Bindestelle rechtwinklig zu der Torus-Ebene ein *A-tract* zumindest teilweise geopfert werden (Abbildung 78). Wegen der Bedenken, die *minicircles* könnten mit zu wenigen *A-tracts* nicht mehr synthetisierbar sein, wurde daher das Design mit vier Bindestellen am Torus gewählt. Nachträglich betrachtet wäre solch ein Ring mit wenigen *A-tracts* über eine Synthese an einem ss *minicircle* Templat ohne weiteres möglich gewesen (Abschnitt 3.1.7).

Sequenzdesign

Wie in Abschnitt 3.1.6 diskutiert wurde zunächst noch eine schlechte Ligationseffizienz für die moderaten Ausbeuten der Ringsynthesen verantwortlich gemacht.

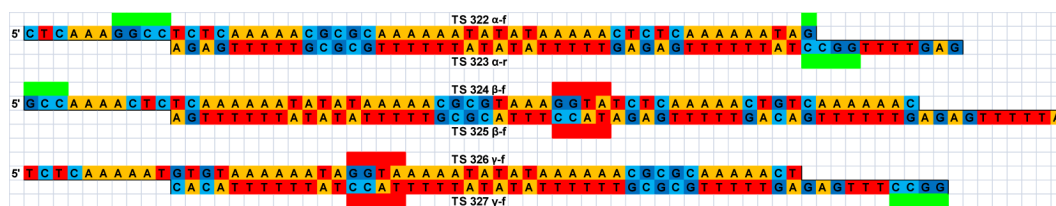


Abbildung 78: Sequenz in dem bei Planungen verwendeten Farbschema. Die Bindungsstellen für die Polyamide sind rot bzw. grün markiert.

Für dieses Projekt wurde daher das erste *minicircle*-Design (Abschnitt 3.2.3) in mehreren Punkten verändert. Zunächst wurden die *sticky ends* von 5 auf 10 nt verlängert, um eine höhere thermische Stabilität der Hybridisierung und damit mutmaßlich eine höhere Ligationseffizienz zu er-

langen. Des Weiteren wurden die zu ligierenden Enden so angeordnet, dass sie im Torus außen und damit leichter für die Ligase erreichbar waren. Aus diesem Grund mussten die Segmente auch unterschiedlich lang sein (Abbildung 78). Nachträglich betrachtet scheint diese Vorsichtsmaßnahme unnötig zu sein, da in anderen Designs Ligationen auch innen in Tori gelangen.

Um Phosphorylierung durch die Kinase als Ausbeuten limitierenden Schritt auszuschließen, wurden alle 5'-Enden phosphoryliert bestellt.

Eine weitere Änderung gegenüber dem ersten Design betraf die „Füllsequenzen“ zwischen den *A-tracts*. Es wurden mehrere neue Füllsequenzen verwendet, die eine Fehlpaarung der Stränge der Segmente unwahrscheinlicher werden lassen sollten. Die nachträgliche Analyse des Designs mit Mfold ergab, dass die beiden GCGCG-Blöcke eine Haarnadel ausbilden könnten. Diese Haarnadel hat aber einen viel niedrigeren Schmelzpunkt als die Struktur in Abbildung 48, da die Stämme der Haarnadel weit auseinander liegen. Zweitens liegen die beiden GCGCG-Blöcke auf zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden und könnten daher erst nach Ligation der Stränge eine interne Haarnadel ausbilden. So ist erklärbar, dass diese Haarnadel kein Problem für die Synthese darstellte.

Die letzte Änderung betraf die Bindestellen für die Polyamid-Stütze. Da die Verbindung der Ringe untereinander nun nicht mehr wie bei der Dimerisierung der Ringe in der Ebene der Tori erfolgen sollte sondern senkrecht dazu, mussten die Bindestellen nun um 90° verschoben werden. Rechnerisch sind das 2,625 nt ($10,5 \text{ nt} / 4$), gerundet also 3 nt. Infolge dessen wurden 3 *A-tracts* durch die Bindestellen ersetzt, so dass dieses Design insgesamt weniger *A-tracts* bei gleicher Ringgröße hatte. Dies hatte zur Folge, dass in Gelen die Bande für die doppelte Ringgröße etwas stärker ausgeprägt war als die sonst sehr schwache Bande bei anderen Designs. Diese Bande konnte sogar isoliert und per AFM abgebildet werden.

Synthesversuche der Röhre

Für eine Synthese der Röhre wurden die (über Gelelektrophorese und Elektroelution) aufgereinigten *minicircles* in TEAMg-Puffer (siehe Materialien und Methoden) mit stöchiometrischen Mengen oder mit Überschüssen der Polyamid-Stütze inkubiert und per AFM abgebildet. Leider waren bei allen Versuchen keine größeren geordneten Strukturen zu sehen sondern nur einzelne Ringe und allenfalls zu erahnende, verwischte Strukturen, die größer als die *minicircles* selbst waren. Dies wurde so gedeutet, dass die Röhren, so sie sich denn überhaupt gebildet haben, nicht annähernd so stabil sind, wie literaturbekannte Beispiele (Abschnitt 1.3.5). Der Vergleich des Ansatzes hier mit anderen Ansätzen zeigt die Schwächen dieses Konzeptes auf.

Während sich bei Verbindungen mit *crossovers* benachbarte Helices praktisch berühren (Abbildung 79 a), können sie mit gestreckter Polyamid-Stütze fast 4 nm weit auseinander sein (b). Ein weiterer Grund für die große Labilität der Röhren dürfte in der geringen Anzahl der Verbindungen zwischen den *minicircles* liegen.

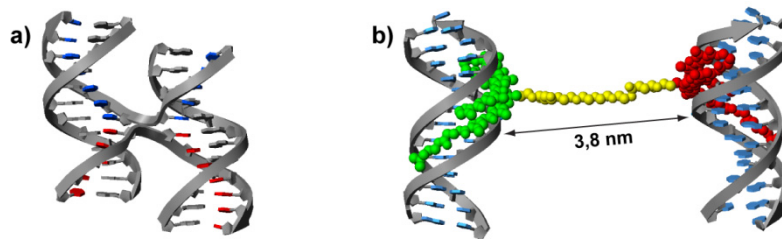


Abbildung 79: Vergleich zwischen einem antiparallelen crossover (a) und einem ternären Komplex mit der Polyamid-Stütze (b).

Wollte man das Design verbessern, so sollte die Anzahl der Verbindungen zwischen den Ebenen auf mindestens drei erhöht und die Linker der Stütze deutlich verkürzt werden. Da aber die ersten Ansätze des Röhrendesigns keine Anfangserfolge zeigten und die prinzipiellen Probleme mit der Polyamid-Stütze nach und nach erkannt wurden (Abschnitt 3.2.9), wurde dieses Projekt nicht weiter verfolgt. Stattdessen sollte versucht werden, in einem Folgeprojekt eine Röhre mit *crossovers* aufzubauen (3.12).

3.6 Polyamid-Anker

Wie in Kapitel 3.2 ausgeführt, bietet die Polyamid-Stütze die Möglichkeit, unmodifizierte DNA miteinander zu verkleben. Dieser Ansatz hat aber auch einige Nachteile (siehe 3.2.9), die in einem alternativen Ansatz umgangen werden sollten. Es wurde geplant, ein Polyamid über einen Linker kovalent mit einem DNA-Ring zu verbinden. Ein solcher Ring hätte den Vorteil, dass es nun nur noch eine eingebaute Sollbruchstelle gibt statt zweien bei der Polyamid-Stütze. Ein Polyamid, welches an einem Linker an einem viel größeren Oligonukleotid oder gar an einem *minicircle* hängt erinnert an einen Anker an einem Schiff, doch ist ein „Ankern“ nur in der *minor groove* von DNA mit der korrekten Bindestelle für das Polyamid möglich.

Zu diesem Ring mit Polyamid-Anker könnte nun ein Ring mit einer Bindestelle für das Polyamid gegeben werden, so dass ein Heterodimer entstünde. Doch bei einem solchen Ansatz müssten die Stöchiometrien wieder genau beachtet werden und zwei verschiedene *minicircles* designt und synthetisiert werden. Stattdessen sollte nur ein Ring entworfen werden, der zusätzlich zum Polyamid-Anker selbst die Bindungsstelle trägt. Dabei muss der Linker so kurz oder die Bindungsstelle so weit vom Anknüpfungspunkt entfernt sein, dass es nicht zu einer Bindung des Polyamids an denselben Ring kommen kann. Ein solcher Ring sollte dann in entsprechenden Puffern von selbst Homodimere ausbilden.

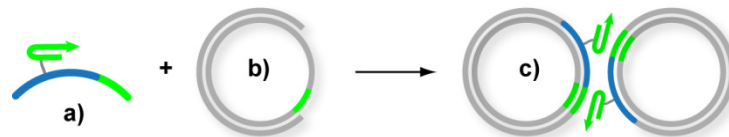


Abbildung 80: Das Konzept der Polyamid-Anker DNA-minicircles. a) Ein Polyamid (grüner Pfeil) soll über einen Linker kovalent mit einem Oligonukleotid (blau) verknüpft und zusammen mit anderen Strängen in einen Ring eingebaut (b) werden. Enthält der Ring zusätzlich eine Bindestelle für das Polyamid (grün), sollen die Ringe dimerisieren (c).

Solch ein Ring hat drei Vorteile: Erstens muss nur ein einziger Ring designt und dargestellt werden, zweitens muss die Konzentration der Ringe nicht mehr genau bestimmt und eingestellt werden, und schließlich kann wie bei der kooperativen Bindung mehrerer *sticky ends* bei dem Kristallwachstum von DNA-Kacheln²⁰⁶⁻²⁰⁸ oder einem 3D-Kristall⁸³ eine stärkere Bindung der Ringe als mit nur einer Interaktion erwartet werden.

Da der Linker nicht so lang sein darf, dass der Anker an denselben Ring bindet, aber andererseits auch die Frage nach der elektrostatischen Abstoßung eines solchen Komplexes im Raum stand, sollen hier ein paar allgemeine Betrachtungen vorangestellt werden, die beim Design des Linkers eine Rolle gespielt haben.

3.6.1 Elektrostatischen Abstoßungen in DNA-Nanoarchitekturen

Bei dem ersten Design der Polyamid-Stütze wurde ein möglichst langer Linker gewählt, um eine Komplexbildung trotz der elektrostatischen Abstoßung zweier DNA-Doppelstränge zu ermöglichen. Doch ist ein solch langer Linker überhaupt nötig?

Schon bei der Hybridisierung von zwei Einzelsträngen zu einem Doppelstrang wirken die Abstoßungen der Ladungen der Phosphatrückgrate den Watson-Crick-Basenpaarungen entgegen und müssen durch Salze kompensiert werden. Dieser Zusammenhang findet sich in der starken Salzabhängigkeit der Schmelztemperaturen von DNA wieder. In vielen Modellen zur Voraussage von Schmelzpunkten^{195,221,222} fließt daher die Salzkonzentration als Parameter ein, wobei ein höherer Salzgehalt zu einer höheren Schmelztemperatur führt. Es ist aber auch bekannt, dass nicht alle Salze die Phosphatladungen gleich gut abschirmen. So hat etwa Magnesium eine deutlich stärker stabilisierende Wirkung als Natrium.

Wie aber verhalten sich zwei DNA-Doppelstränge in nächster Nähe zueinander? In zahlreichen DNA-Nanoarchitekturen wie *DX tiles* oder DNA-Origami (siehe Abschnitt 1.3) kommen sich auch die DNA-Doppelstränge bis auf Bruchteile eines Nanometers nahe. Man kann einwenden, dass diese Architekturen immer noch durch Watson-Crick-Basenpaarungen zusammengehalten werden und dass diese die noch vorhandene Abstoßung kompensieren. In Simulationen wurde aber gefunden, dass die nächste Nachbarschaft von zwei DNA-Doppelsträngen sogar energetisch begünstigt sein kann, wenn divalente Kationen wie Magnesium in der Lösung vorhanden sind.²²³ Die attraktive Wirkung der beiden Stränge entsteht laut der Studie dadurch, dass die Magnesiumionen sich zwischen die Phosphatreste der beiden Doppelstränge einlagern und sie so zusammenhalten (siehe Abbildung 81 b). Die stabilisierende Wirkung tritt schon bei 100 mM MgCl_2 auf, wohingegen monovalente Kationen selbst bei höheren Konzentrationen kaum eine Stabilisierung bewirken.

Andere Studien geben sogar Hinweise darauf, dass monovalente Kationen einen destabilisierenden Effekt haben. So ist die korrekte Faltung von DNA zu 3D-Origami nur unter Zugabe von Magnesiumchlorid möglich, wird aber durch Natriumchlorid teilweise gestört.¹⁰² In einem anderen Bericht wird jedoch eine geringe Menge an Natriumchlorid gleichzeitig mit Magnesiumchlorid zur Bildung gespannter dreidimensionaler Architekturen eingesetzt.¹⁰¹ Doch stellt der letztgenannte Bericht eine Ausnahme dar; die überwältigende Mehrheit der Nanoarchitekturen wurde ausschließlich in magnesiumhaltigen Puffern hergestellt.

Die stabilisierende Wirkung von multivalenten Kationen auf die Packung von DNA kann so weit gehen, dass DNA kondensiert (Abbildung 81 c). Dieses Phänomen kann nach meinem Kenntnisstand experimentell jedoch nur bei Salzen mit höherer Ladung als zwei gefunden werden, wie zum Beispiel bei Ni^{3+} oder Spermin.^{224,225} Auch in eigenen Experimenten erfolgte durch den Zusatz von Mg^{2+} oder Ca^{2+} in hohen Konzentrationen keine Aggregation von DNA-*minicircles* auf AFM-Bildern (Daten hier nicht gezeigt).

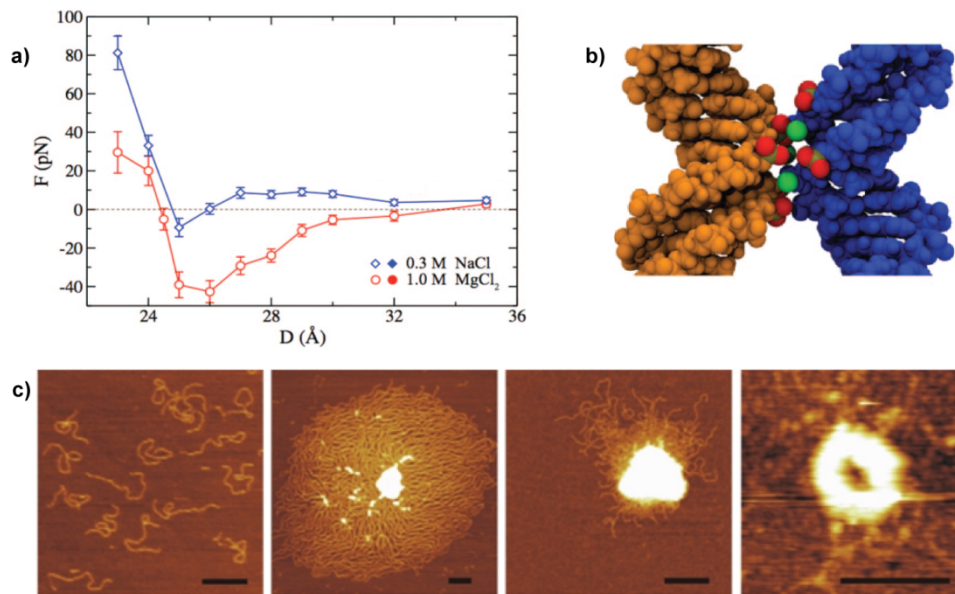


Abbildung 81 a) Effektive Kraft gegen den Abstand der Achsen zweier DNA-Doppelstränge. Die Kurve in blau ist bei 0,3 M NaCl berechnet, die rote Kurve mit 1 M MgCl₂. b) Modell der Verbrückung von Phosphaten (rot) zweier DNA-Doppelstränge mittels Magnesiumionen (grün).²²³ c) AFM-Aufnahme einer Kondensation von DNA bei Zugabe von Spermin. Links ist nicht kondensierte DNA zu sehen.^{224,225}

Die Abschirmung der negativen Ladung der DNA spielt übrigens auch eine wichtige Rolle beim Aufbringen der DNA auf die negativ geladene Glimmeroberfläche für AFM-Aufnahmen (siehe Kapitel 3.3).

3.6.2 Design des Polyamid-Anker-*minicircles*

Die obigen Betrachtungen berücksichtigend, erscheint der Linker im ersten Design der Polyamid-Stütze (Abschnitt 3.2.2) länger als nötig. Um ein Polyamid an ein Oligonukleotid anzuknüpfen, könnte man das Polyamid vor der DNA-Synthese an einen Nukleotid-Baustein konjugieren und ihn als Phosphoramidit für die Oligonukleotid-Synthese einsetzen. Dieser präsynthetische Ansatz hätte aber den Nachteil, dass viele Milligramm eines entsprechenden Polyamids für die Synthese eingesetzt werden müssten. Doch stand diese Menge zum einen nicht in ausreichender Reinheit zur Verfügung, zum anderen ist nicht bekannt, ob die Polyamide mit den Bedingungen der DNA-Festphasensynthese kompatibel sind. Deshalb sollte das Polyamid postsynthetisch an die DNA gekuppelt werden.

Für postsynthetische Kupplungen an einer internen Position eines Oligonukleotids sind verschiedene Arten von modifizierten Oligonukleotiden kommerziell erhältlich. Eine Standardme-

thode ist die Kupplung an eine Aminogruppe, welche über einen $(\text{CH}_2)_2$ (kurz C2)- oder einen C6-Linker mit einem Thymidin verbunden ist.

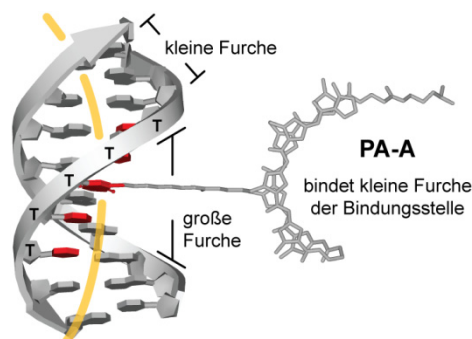


Abbildung 82: Anknüpfung eines Polyamids (rechts) über einen Linker an ein Thymidin (Thymine sind rot eingefärbt). Hier ist großenteils ein Ausschnitt des hybridisierten Syntheseproduktes aus Abbildung 85 dargestellt. Die intrinsische Krümmung des A-tracts ist übertrieben in orange eingezeichnet.

Die Stelle, an der das Amino-modifizierte T in der Sequenz eingefügt werden sollte, wurde anhand des in Abschnitt 3.1.2 diskutierten Modells ermittelt. In 5'-3' Richtung betrachtet, wurde das dritte T eines A-tracts für die Modifikation ausgewählt (siehe Abbildung 82). Die Flexibilität des Linkers lässt aber auch eine Modifikation der benachbarten T denkbar erscheinen. In einem Doppelstrang ragt das Polyamid damit in die große Furche der DNA.

Geometrische Abschätzungen am Computermodell von DNA ließen eine Linkerlänge von mindestens einem Nanometer als ideal erscheinen. Deshalb sollte die Kupplung an ein C6-Amino-modifiziertes T, oder an einem C2-Linker durch einen zusätzlichen Crosslinker erfolgen (Abschnitt 3.6.3).

Die Wahl, welches der beiden bereits synthetisierten Polyamide eingesetzt werden sollte, fiel aus zwei Gründen auf **PA-A**. Erstens bindet das imidazolreiche **PA-A** stärker an seine Bindungssequenz als **PA-B** an die seine. Dies ist bereits aus Experimenten der Gruppe um Dervan bekannt, zeigte sich aber auch in den vorausgegangenen Oberflächenplasmonresonanz-Bindungsstudien (Abschnitt 3.2.4) und in den oben beschriebenen LILBID-MS-Experimenten (Abschnitt 3.4.2).²²⁶ Allein die FCS- und FCCS- Experimente kamen aus ungeklärten Gründen zu dem gegenteiligen Ergebnis (Abschnitt 3.2.7). Trotz letzterer Experimente erscheint die festere Bindung von **PA-A** aufgrund von zwei zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen, welche von den zwei zusätzlichen Imidazolbausteinen ausgebildet werden können, plausibel. Der zweite Grund für die Wahl von **PA-A** war, dass das Sequenzdesign eines *mimicircles* mit einer Bindungsstelle für das **PA-A** einfacher ist als für **PA-B**, da die Generierung der zur Sequenzspezifität erwünschten doppelten *mismatch* an den Rändern der A-tracts nur durch wenige Sequenzen möglich ist (vgl. Diskussion in Abschnitt 3.1.9.1).

Das gewählte Sequenzdesign des *minicircles* (Abschnitt 4.6) entspricht nicht in vollem Umfang den in Abschnitt 3.1.9 aufgestellten Kriterien für ein gutes Design. So wurden die *sticky ends* mit 20 nt so lang gewählt, dass deren Schmelzpunkte in die Nähe der Schmelzpunkte der Segmente rücken. Des Weiteren sind mehrere GCGCG- und CGCGC- Blöcke zwischen den *A-tracts* eingefügt, welche sehr stabile Sekundärstrukturen bilden. Der (über den IDT OligoAnalyzer 3.1) errechnete Schmelzpunkt von einem der Oligonukleotide (TS 459) betrug 86°C. Dennoch ließen sich anders als im Design von Abbildung 48 die Ringe mit immerhin bis zu 9 % Ausbeute darstellen. Das nicht optimale Design ist vermutlich mit dafür verantwortlich, dass anders als in neueren Designs eine Aufreinigung der *minicircles* zwingend erforderlich war; anderenfalls waren auf AFM-Aufnahmen kaum Ringe, sondern fast nur lineare Fragmente zu sehen.

3.6.3 Konjugation eines Polyamides an ein DNA-Oligonukleotid

Es gibt unüberschaubar viele verschiedene Möglichkeiten, um Moleküle mit DNA zu verknüpfen.²²⁷ Im Zuge dieser Arbeit sind verschiedene Kupplungsmöglichkeiten untersucht worden, von denen eine Auswahl hier besprochen werden soll.

Zu den gängigsten Bindungsknüpfungen in der Biokonjugation gehören die Bildung eines Peptids mit einer Säure und einem Amin, die Kupplung eines Thiols an ein Maleimid und die Kupplung eines Amins an ein Isothiocyanat. Da das für die Kupplung einzusetzende Oligonukleotid in einen Ring eingebaut werden sollte, musste die Modifikation an einer internen Position eines Oligonukleotids erfolgen. Damit schied für dieses Projekt die Kupplung über ein Thiol aus, da nur terminal Thiol-modifizierte DNA erhältlich ist, und die Kupplung über Amino-modifizierte DNA die erschien so als vielversprechendste Variante.

Kupplung über Crosslinker

Eine besonders einfache Verknüpfung von Molekülen versprechen kommerziell erhältliche Crosslinker, die zwei funktionelle Enden tragen. Da sowohl **PA-A** als auch das Oligonukleotid Amino-modifiziert waren, wurden ein Linker auf Imidoester-Basis (DMS = Dimethylsuberimidat, Abbildung 83) und zwei Linker mit NHS (*N*-Hydroxysuccinimid) -Ester, BS³ (Bis(sulfosuccinimidyl)suberat) und DSS (Disuccinimidylsuberat) ausgetestet. Die Kupplung mit den erwähnten Crosslinkern führt schließlich zur Entstehung von Peptiden.

Da von den Polyamiden größere Stoffmengen als von den teuren modifizierten Oligonukleotiden zur Verfügung standen, sollte zunächst versucht werden, die Crosslinker ans Polyamid zu kuppeln, das Kupplungsprodukt aufzureinigen und dieses nachfolgend zur Amino-modifizierten DNA zu geben. Zwar kuppelten sowohl BS³ als auch DMS in wässrigen Puffern an das Polyamid, doch nach Aufreinigung mittels HPLC ergab die massenspektrometrische Analyse, dass sowohl der Sulfo-NHS Ester als auch der Imidoester hydrolysiert waren.

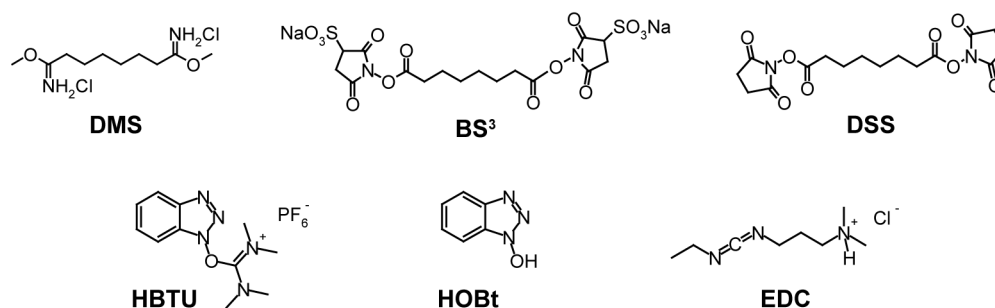


Abbildung 83: Auswahl von zu Kupplungsversuchen verwendeten Crosslinkern (oben) und Kupplungsreagenzien (unten).

Der Crosslinker DSS ist in Wasser kaum löslich, daher wurde er in DMF (Dimethylformamid) ans PA gekuppelt. Das Kupplungsprodukt konnte mittels HPLC-aufgereinigt werden, jedoch gelang eine Kupplung ans Oligonukleotid nicht. Möglicherweise war in der Kupplungsreaktion der pH-Wert zu hoch oder der Succinimidyl-Rest wurde schon vor der Reaktion, möglicherweise beim Entfernen der Lösungsmittel hydrolysiert. Auch konnte - weil nicht mehr Ausgangsmaterial zur Verfügung stand - nur ein etwa 10-facher Überschuss des modifizierten Polyamids eingesetzt werden. In anderen Kupplungsreaktionen (wie der mit dem Isothiocyanat) wurde meist erst bei höheren Überschüssen eine Kupplung beobachtet.

Der umgekehrte Weg, die Kupplung von Crosslinkern an DNA, ist auch möglich, wie HPLC-MS-Analysen der Reaktionen ergaben. Bei diesen Reaktionen mussten 100-1000-fache Überschüsse für eine erfolgreiche Kupplung eingesetzt werden. Durch die sehr ähnlichen HPLC-Retentionszeiten der Amino-modifizierten DNA und des Kupplungsproduktes mit dem Crosslinker war eine Aufreinigung jedoch nicht möglich. Dass anders als bei einer Kupplung ans Polyamid große Überschüsse an Kupplungsreagenz eingesetzt werden müssen spricht dafür, dass die Aminogruppe am Oligonukleotid weniger reaktiv als die am Polyamid ist.

Es konnte jedoch in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Koeppl ein Protokoll von Timo Mack adaptiert werden, in dem erst die Amino-modifizierte DNA mit einem 100-fachen Überschuss an in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöstem DSS-Crosslinker in wässrigem Puffer umgesetzt wurde. Die Überschüsse an DSS wurden nach nur zwei Minuten Kupplung über eine Gelfiltrations säule entfernt und sofort das zu kuppelnde Polyamid zugegeben. Durch diese Prozedur wurde ein neues Produkt erhalten, welches jedoch aufgrund des zum Zeitpunkt des Versuches nicht zur Verfügung stehenden HPLC-MS-Gerätes nicht identifiziert werden konnte. Dieses Produkt hatte jedoch fast die gleiche Retentionszeit wie das Isothiocyanat-Kupplungsprodukt, dessen Nachweis bereits gelungen war (s.u.) und ist vermutlich das gewünschte Kupplungsprodukt gewesen.

Kupplung über Peptidknüpfung

Eine direkte Kupplung von zwei Komponenten, also ohne die Verwendung von Crosslinkern, ist prinzipiell auch möglich. Die Kupplung kann zum Beispiel in Form einer Peptidknüpfung mit diversen Kupplungsreagenzien erfolgen.

EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid Hydrochlorid, Abbildung 83) ist ein wasserlösliches Carbodiimid, welches häufig als Kupplungsreagenz in der Biokonjugation eingesetzt wird.²²⁷ EDC kann beispielsweise eine chemische Ligation vermitteln (siehe Abbildung 97). Ein Versuch (TS 559) der Kupplung nach einem Protokoll von Viladkar *et al.*²²⁸ mit großen Überschüssen an EDC zwischen einem Bernsteinsäure-modifizierten Polyamid und Amino-modifizierter DNA zeigte im HPLC-Chromatogramm die Bildung eines neuen Produktes. Die Retentionszeit dieses Produktes entspricht derjenigen, die später für das Thioharnstoff-Konjugat ermittelt wurde (s.u.). Der massenspektrometrische Nachweis des Produktes gelang jedoch nicht. Möglicherweise lag dies jedoch an den damals gravierenden technischen Problemen mit dem Massenspektrometer und nicht an einem gescheiterten Versuch.

Eine Umsetzung eines Polyamides mit Säurefunktionalisierung zum NHS-Ester gelang in DMF, auch konnte der NHS-Ester massenspektrometrisch nachgewiesen werden, doch gelang die Kupplung an die DNA nicht. Vermutlich bildete sich ein Dimethylamin-Kupplungsprodukt durch die Hydrolyse von DMF (s.u.) oder die Hydrolyse des NHS Esters ging zu schnell vonstatten, da ein Puffer, der basischer als pH8 war, eingesetzt wurde.

Das Natriumsalz von DNA ist außer in DMSO (Dimethylsulfoxid) praktisch nicht in organischen Lösungsmitteln löslich. Sollen dennoch Reaktionen in organischen Lösemitteln durchgeführt werden, so kann man die DNA zunächst als lipophiles Dodecylammonium-Salz ausfällen.¹⁸⁶ Eine Kupplung von so umgefällter Amino-modifizierter DNA mit einem Bernsteinsäure-modifizierten **PA-A** gelang jedoch auch mit einer DMF und HOBt-HBTU-Mischung nicht. Unter denselben Bedingungen konnten Polyamid-Komponenten jedoch verknüpft werden. Warum dies mit DNA nicht gelang ist unklar. Mit den gleichen Kupplungsreagenzien scheiterte auch ein Kupplungsversuch in DMSO. Das HPLC-Chromatogramm zeigte zwar einen neuen Peak, jedoch war die Masse dieses Produktes identisch mit dem unmodifizierten Oligonukleotid.

Kupplung über Isothiocyanat



Abbildung 84: Darstellung eines Polyamid-Isothiocyanates (b) aus PA-A (a) nach Lit²²⁹.

Die im Rahmen dieser Arbeit am häufigsten erfolgreich durchgeführte Synthese – und die einzige, bei der die Entstehung des Kupplungsproduktes massenspektrometrisch belegt werden konnte - war eine Kupplung des Polyamids als ein Isothiocyanat. Viele Fluoreszenzfarbstoffe sind ebenfalls als Isothiocyanate kommerziell erhältlich.

Eine Konvertierung primärer Amine ins entsprechende Isothiocyanat gelingt nach einer neuen Syntheseroute²²⁹ schnell und mit hohen Ausbeuten in einer Eintopfreaktion mit CS₂ und *para*-Toluolsulfonylchlorid (siehe Abbildung 84).

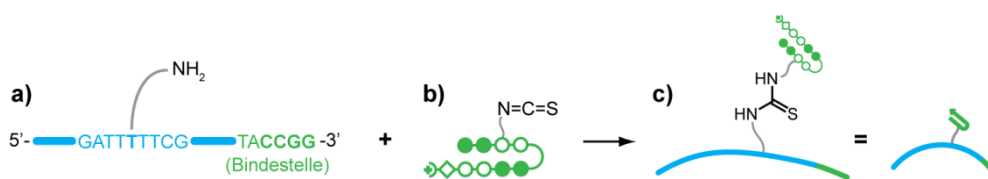


Abbildung 85: Kupplung eines Amino-modifizierten DNA-Oligonucleotides (a) mit dem Isothiocyanat von PA-A (b) zu einem PA-DNA-Hybrid.

Nach dieser Vorschrift gelang auch die Darstellung des Isothiocyanates des Polyamids schnell und in hohen Ausbeuten. Das Entfernen der Lösemittel sollte jedoch unter Kühlung oder durch Lyophilisieren erfolgen, da das Isothiocyanat hydrolyseanfällig ist (s.u.).

Dieses Isothiocyanat sollte nun an das Amino-Oligonucleotid gekuppelt werden (Abbildung 85). Wie in den vorigen Kupplungsversuchen mit Crosslinkern wurde das Isothiocyanat zunächst in DMF gelöst und zum Amino-Oligonucleotid gegeben. Nach zahlreichen vergeblichen Kupplungsversuchen wurde ein Produkt isoliert, dessen Masse exakt einem Dimethylamin-Kupplungsprodukt des Isothiocyanates entspricht (Abbildung 86 a).

DMF ist zwar das Standardlösungsmittel in der Chemie der Dervan-Polyamide; es wurde sowohl in der Festphasensynthese der Polyamide selbst als auch für nachträgliche Modifikationen wie Fluoreszenzmarkierung und zur Synthese der Polyamid-Stütze erfolgreich eingesetzt. Doch in Gegenwart von wässrigen, leicht basischen Lösungen scheint DMF Dimethylamin freizusetzen. Dieses Dimethylamin ist nukleophiler als die eigentlich zur Kupplung vorgesehenen primären Amine und stammt aus dem Lösungsmittel, wodurch es in großen Mengen nachgeliefert werden kann. Dadurch entstanden vermutlich wie in Abbildung 86 a) mit allen Elektrophilen Dimethylamin-Kupplungsprodukte und nicht das gewünschte Konjugat.

Zurückblickend betrachtet und nach der erneuten Auswertung alter Experimente dürfte diese Verunreinigung mit Dimethylamin ein Hauptgrund für das Scheitern von vielen Kupplungsversuchen sein, da die Polyamide meist in DMF gelöst zugesetzt worden sind. Dieser Effekt ist erst nach zahlreichen erfolglosen Kupplungsversuchen entdeckt worden, da die hohen Überschüsse der Polyamide und Kupplungsreagenzien meist durch Gelfiltrationssäulen abgetrennt wurden, um die HPLC-Säulen nicht zu belasten.

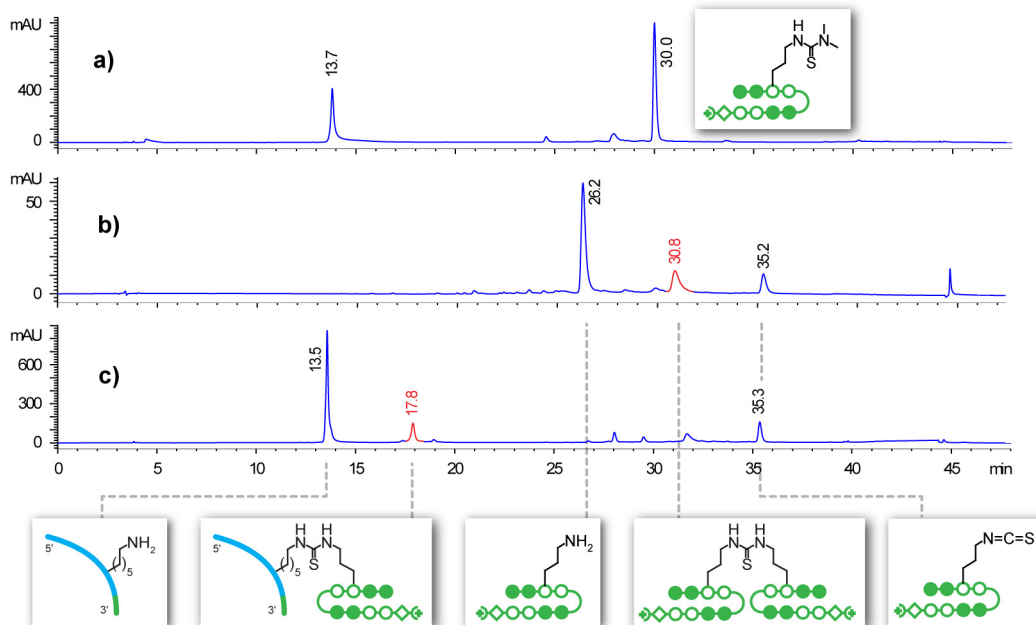


Abbildung 86: HPLC-Chromatogramme (DNA-Gradient) von a) einer missglückten Kupplungsreaktion in Puffer/ DMF, bei der ein Dimethylamin-Kupplungsprodukt entstand, b) einer bei pH 11 inkubierten Polyamid-Isothiocyanat-Lösung und c) einer Kupplung, bei der ein PA-DNA-Konjugat (rot) entstand.

Aufgrund des Problems mit Dimethylamin wurde in folgenden Experimenten auf DMF als Lösungsmittel verzichtet, wodurch auch keine Dimethylamin-Kupplungsprodukte mehr beobachtet werden konnten. Wie sich zeigte, waren die Polyamide auch problemlos in Wasser löslich. Nach Eliminierung dieser Fehlerquelle wurden die Bedingungen für die Kupplung optimiert. Als erster Parameter wurden verschiedene pH-Werte getestet.

Ein leicht basischer pH-Wert ist für die Kupplung vorteilhaft, da dadurch ein höherer Anteil der Amino-Komponente (hier der modifizierten DNA) deprotoniert vorliegt und somit als Nukleophil agieren kann. Andererseits sind Isothiocyanate im Basischen hydrolyseanfällig. Bei einer Inkubation des Isothiocyanates bei pH 11 (Abbildung 86 b) hydrolysierte es innerhalb von Minuten zu großen Teilen zum Amin. Dieses konnte nun an noch vorhandenes Isothiocyanat kuppeln und es entstand eine Polyamid-Stütze mit Thioharnstoff-Linker. In einer Reihe von Versuchen wurde ermittelt, dass das Isothiocyanat bis pH 9 ausreichend hydrolysestabil ist.

Als weitere Parameter wurden in parallelen Ansätzen unterschiedliche Temperaturen und Lösungsmittelzusätze ausgetestet. Den höchsten Umsatz zeigte eine Kupplung bei 50°C und Zugabe von 50 Volumenprozent Acetonitril zum Borat-Puffer bei pH 8,5 (Abbildung 86 b). Ohne einen Zusatz von organischen Lösungsmitteln (DMSO oder Acetonitril) war der Umsatz niedriger, ebenso wenn bei Raumtemperatur gekuppelt wurde. Bei Reaktionen ohne den Zusatz eines

organischen Lösungsmittels wurde teilweise eine Trübung der Reaktionslösung beobachtet. Diese beiden Beobachtungen sprechen für ein Löslichkeitsproblem der Polyamide im Basischen. Aber auch nach der HPLC-Aufreinigung des Kupplungsproduktes und Einengung zur Trockne gab es beim Wiederauflösen des DNA-Polyamid-Hybrides in reinem Wasser vermutlich ein Löslichkeitsproblem, da die gemessene Konzentration des Kupplungsproduktes nach dem Wiederauflösen teilweise eine Größenordnung unter der laut Integral des HPLC-Chromatogramms zu erwartenden Konzentration lag. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen ist, die Probe nach der HPLC-Aufreinigung nicht vollständig zu trocknen, sondern stattdessen eine aufkonzentrierte Lösung zur Synthese der *minicircles* einzusetzen. Dies gelingt entweder durch eine Membran-Mikrozentrifugation oder Einengung über Butanolextraktion mit anschließender Natriumacetat-Ethanol-fällung.

Die Masse des Kupplungsproduktes wurde über HPLC-ESI-MS nachgewiesen. Bei manchen erfolgreichen Kupplungen wurden zusätzlich zur korrekten Masse eine um 16-18 Da zu niedrige Masse gefunden. Möglicherweise ist diese Massendifferenz dadurch zu erklären, dass im leichteren Produkt der Thioharnstoff zum Harnstoff hydrolysiert war.

Unglücklicherweise war auch die Kupplung mit Isothiocyanat nicht immer zuverlässig reproduzierbar. Bei der nachträglichen Analyse verschiedener Kupplungsversuche zeigte sich, dass die Kupplung nur dann erfolgreich war, wenn das Isothiocyanat längstens 2 Wochen vor der Reaktion dargestellt wurde, selbst wenn es in trockenem Zustand und tiefgefrorenen gelagert wurde. Eine massenspektrometrische Analyse eines mehrere Monate alten und nach HPLC-MS-Analyse zuvor sauberen Polyamid-Isothiocyanates zeigte verschiedene nicht näher identifizierte Zerfallsprodukte und kaum Ausgangsmaterial. In einem anderen Fall war schon beim Entfernen der Lösungsmittel in der Vakuumentrifuge ein nennenswerter Anteil zerfallen. Eine schonendere Einengung könnte bei 4°C möglich sein oder durch Lyophilisieren gelingen.

Diskussion der Kupplungsversuche

Für das Scheitern vieler Kupplungsversuche gibt es meiner Ansicht nach diese Hauptursachen:

- 1) Dimethylamin-Kontamination aus der gleichzeitigen Verwendung von DMF und basischem Puffer (s.o.)
- 2) Vorzeitige Hydrolyse der Crosslinker durch zu basischen pH-Wert der Kupplungsreaktion oder Hydrolyse während der Aufreinigung
- 3) Misslingen des massenspektrometrischen Nachweises von möglicherweise erfolgreichen Kupplungen
- 4) Zu geringe Überschüsse an Kupplungsreagenz/ Crosslinker
- 5) Rasche Zersetzung des Isothiocyanates (s.o.)

ad 2) Bei den Kupplungen wurden meist Puffer mit pH-Werten von 8 und zum Teil weit darüber verwendet. Zwar liegt der pK_s -Wert primärer Amine bei 9-10, d.h. bei einem neutralen pH-Wert liegt weit mehr als die Hälfte des Amins protoniert vor, doch wird der reagierte Anteil durch das Gleichgewicht nachgeliefert und so können Kupplungen auch bei neutralem bis leicht basischen pH-Wert gelingen. Entscheidender als der nicht protonierte Anteil des Amins scheint eher die Hydrolyseempfindlichkeit der Aktivester zu sein. Nach Hermanson²²⁷ ist ein pH-Wert von 8,5 für NHS-Ester schon zu basisch, da sie bei diesem pH-Wert nur noch eine Halbwertszeit von 2 Minuten haben. Stattdessen müssen die Kupplungen mit NHS-Estern bei etwa pH 7,5 durchgeführt werden. Auf eine Aufreinigung nach Reaktionen mit Crosslinkern kann verzichtet werden, wenn Überschüsse an Crosslinkern, wie oben beschrieben, durch Gelfiltration entfernt werden und die Umsetzung mit einem Amin sofort angeschlossen wird.

ad 3) Aus nicht geklärten Gründen gelang der Nachweis von Kupplungsprodukten mit DNA in dieser Arbeit ausschließlich über HPLC-ESI-MS, über MALDI-MS (Matrixassistierte Laser-Desorption) hingegen nicht. Möglicherweise waren die zur Analyse eingereichten Proben zu verdünnt oder nicht sauber genug. Leider stand das HPLC-MS-Gerät wegen technisch bedingter Ausfallzeiten oder durch Belegung von anderen Arbeitskreisen für weite Teile der Zeit, in denen Kupplungsexperimente durchgeführt wurden, nicht zur Verfügung. Dadurch sind einige möglicherweise erfolgreich verlaufene Reaktionen unerkant geblieben.

ad 4) Bei Kupplungsexperimenten mit DNA scheint der Grundsatz „viel hilft viel“ zu gelten. Erfolgreiche Kupplungen erfolgten oft erst bei 100- oder gar 1000-fachen Überschüssen des Isothiocyanates, von Crosslinkern oder Kupplungsreagenzien. Anscheinend ist die Aminogruppe an der DNA weniger reaktiv als andere Aminogruppen.

Weitere Kupplungsversuche, etwa über „Click-Chemie“ wurden in der Diplomarbeit von Julie Thevarpadam in Zusammenarbeit mit Tatjana Stöß und mir unternommen.²³⁰

3.6.4 Synthese des Polyamid-Anker-DNA-*minicircles*

Die Synthese des Polyamid-Anker-*minicircles* erfolgte durch Hybridisieren eines nach der HPLC-Aufreinigung nicht vollständig eingegangenen DNA-Polyamid-Hybrides mit 5 weiteren Oligonukleotiden (siehe Abbildung 87 a), welche anschließend ligiert wurden. Nichtzirkuläre Ligationen wurde enzymatisch entfernt und die *minicircles* über ein PCR-Isolationskit isoliert. Den aufgereinigten Polyamid-Anker-*minicircles* wurde bei möglichst hoher finaler Konzentration ein magnesiumhaltiger Puffer zugesetzt und mehrere Stunden inkubiert. Die Ringe wurden anschließend für AFM-Aufnahmen frisch verdünnt. Die AFM-Bilder zeigten eine sehr hohe Anzahl an Dimeren, während andere Arten von Komplexen oder Monomere selten zu sehen waren (siehe Abbildung 88 a-g). Eine weitere Aufnahme von den mehrere Stunden bei ca. 3 nM End-

konzentration inkubierten *minicircles* zeigte einen unverändert hohen Anteil an Dimeren. Dies ließ den Schluss zu, dass die Komplexe entweder sehr langsam zerfallen oder dass sie auch bei dieser niedrigen Konzentration thermodynamisch stabil sind. Das hieße, dass auch die Dissoziationskonstante deutlich unter 3 nM liegen muss und dass damit die neuen Anker-*minicircles* mindestens eine Größenordnung stabiler sind als der durch Polyamid-Stütze zusammengehaltene Komplex.

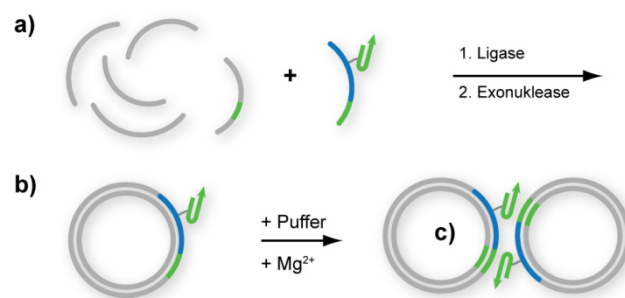


Abbildung 87: Darstellung des Polyamid-Anker-*minicircles* (b) aus dem Polyamid-DNA-Hybrid und 5 weiteren Oligonukleotiden (a). Die Bindungsstelle des Polyamides ist grün eingefärbt. Erst bei Zugabe von magnesiumhaltigem Puffer zu den *minicircles* bilden sich Homodimere (c).

Die thermodynamische Stabilität konnte in Folgeexperimenten (s.u.) bestätigt werden. Ein alternativer Nachweis der Interaktion wurde mit einem nativen PAGE-Gel mit Magnesiumchlorid im Laufpuffer durchgeführt (siehe Abbildung 88 h). Während die Kontroll-*minicircles* C mit dem Amino-modifizierten Oligonukleotid nur eine Bande mit hoher elektrophoretischer Mobilität zeigten, bildeten die Polyamid-Anker-*minicircles* quantitativ eine Bande geringerer Mobilität, die Homodimere. Ein anderes Gel ohne Magnesiumzusatz zeigte keine Dimer-Bande, was die komplexstabilisierende Rolle von Magnesium belegt.

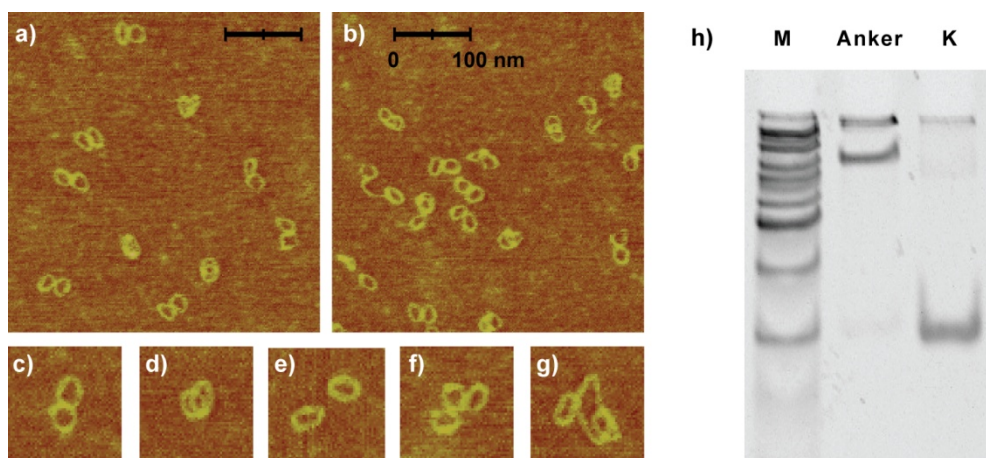


Abbildung 88: Nachweise der Homodimerisierung der Polyamid-Anker-minicircles.

a-g) AFM-Aufnahmen, in denen hauptsächlich Dimere zu sehen sind. c-g) Vergrößerungen aus den Bildern. d) Übereinander gerutschte minicircles; e) möglicherweise bei der Adsorption auf die Oberfläche auseinander gerissene Dimere; f) wenige Komplexe zeigen drei Ringe; g) Komplex aus einem doppelt so großen Ring mit zwei Polyamid-Ankern und zwei Bindestellen und zwei kleinen minicircles. h) Natives PAGE-Gel (mit Mg^{2+}). M= Marker, K= Kontroll-minicircle ohne Polyamid-Anker. Die Bahn „Anker“ zeigt eine praktisch vollständige Dimerisierung.

Auch das PAGE-Gel demonstriert die höhere Robustheit des Polyamid-Anker-Ansatzes gegenüber der Polyamid-Stütze. Während eine Komplexbildung durch die Polyamid-Stütze (siehe Abschnitt 3.2.5) nur bei hohem Überschuss von vorinkubierter Stütze und entsprechender DNA möglich war, waren hier praktisch ausschließlich Komplexe zu sehen. Hierfür dürften vier Faktoren verantwortlich sein: Erstens ist das positiv geladene Polyamid kovalent mit der DNA verbunden und kann bei der PAGE im elektrischen Feld nicht in die entgegengesetzte Richtung wandern. Zweitens sind bei diesen Experimenten Magnesiumionen statt einwertige Kationen im Laufpuffer gewesen, was für eine Komplexbildung wie im Abschnitt 3.6.1 diskutiert, sicherlich die bessere Wahl war. Drittens sollte ein kooperativer Effekt von zwei Polyamid-DNA-Wechselwirkungen pro Dimer den Komplex insgesamt besser stabilisieren als eine Stütze allein, die zudem zwei inhärente „Sollbruchstellen“ hat. Und schließlich wurde für den Anker **PA-A** gewählt, welches eine stärkere Bindung gezeigt hatte als **PA-B** (vgl. Abbildung 55).

3.6.5 Langzeitstabilität und Reversibilität der Dimerisierung

Eine AFM-Aufnahme der Anker *minicircles* nach über einem Jahr und mehreren Einfrier-Auftau-Zyklen zeigte die Homodimere immer noch intakt (Abbildung 89 a). In Folgeexperimenten sollte nun untersucht werden, ob sich die Homodimere bei der Verdünnung auf die für die AFM-Experimente notwendige Konzentration von ca. 5 nM nur kinetisch stabil sind oder ob sie auch nach Aufschmelzen wieder zu Komplexen zusammenfinden. Hierzu wurde eine verdünnte Probe wenige Minuten auf 65°C geheizt, auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut abgebildet. Dabei waren mehrheitlich Monomere zu sehen (Abbildung 89 b). Ob nicht alle Dimere aufgeschmolzen wurden oder ob die Komplexbildung innerhalb von wenigen Minuten vonstattengeht, kann anhand dieser Daten nicht beantwortet werden. Daraufhin wurde die Probe mehrere Tage bei 4°C inkubiert und erneut ein Aliquot abgebildet (Abbildung 89 c). Das AFM-Bild zeigte nun wieder fast ausschließlich Dimere. Anhand der Inkubationskonzentration und der hohen Ausbeute an Dimeren lässt sich folgern, dass die Dissoziationskonstante weit besser als 5 nM sein muss und dass die Bindung wie erwartet reversibel ist.

Auffällig ist bei den Bildern, dass obwohl immer Aliquote derselben Probe abgebildet wurden, die Gesamtkonzentration an Ringen stetig abnimmt. Dieser Effekt wurde auch bei anderen *minicircles* beobachtet, die bei nanomolaren Konzentrationen über längere Zeit inkubiert wurden.

Eine mögliche Erklärung ist eine Adsorption der Moleküle an die Wand der zur Inkubation verwendeten Plastik-Schnappdeckel-Gefäße, welche bei hohen Inkubationskonzentrationen nicht auffällt. Um Adsorption als mögliche Ursache für Materialverlust in Zukunft ausschließen zu können, könnten spezielle Gefäße, wie sie beispielsweise von der Firma Eppendorf angeboten werden („LoBind microcentrifugation tubes“) verwendet werden.

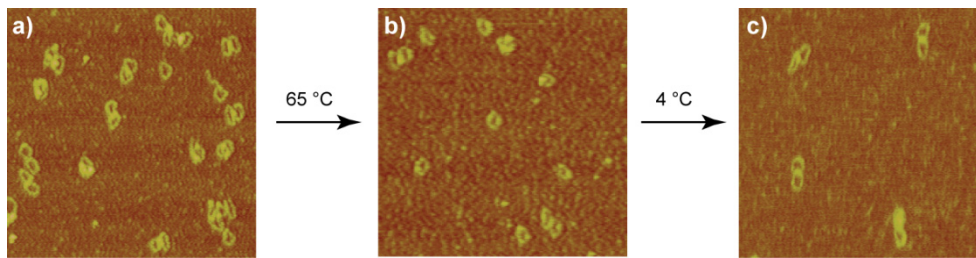


Abbildung 89: Eine ein Jahr alte Probe der Anker-minicircles wurde auf für AFM-Aufnahmen taugliche 5 nM verdünnt. a) Die Probe enthielt fast ausschließlich Homodimere. b) Die Lösung wurde aufgeheizt, langsam auf 25°C abgekühlt und erneut ein AFM-Bild aufgenommen. Die Mehrheit der Ringe lag nun als Monomer vor. c) Nach mehreren Tagen Inkubation bei 4°C waren wieder fast ausschließlich Dimere zu sehen, allerdings in deutlich geringerer Konzentration. Die Kantenlänge aller Bilder ist 500 nm.

3.6.6 Höher geordnete Architekturen mit Polyamid-Ankern

Der Erfolg der *minicircle*-Dimerisierung warf die Frage auf, ob auch größere Architekturen mit Polyamid-Ankern darstellbar sind. Als erstes sollten Ketten aufgebaut werden. Dazu wurde die Polyamid-Bindungsstelle im Ring auf die dem Anker gegenüber liegende Seite verlagert (Abbildung 90 a). Das Anker-Oligonukleotid dieses modifizierten Designs wurde wie oben synthetisiert, jedoch konnte die Identität des Kupplungsproduktes wegen technischer Probleme nicht massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Mit dem so gewonnenen Produkt wurde eine *minicircle*-Synthese durchgeführt, doch zeigten diese *minicircles* in AFM-Aufnahmen keinerlei Tendenzen zur Komplexbildung. Es wurde vermutet, dass die fehlende Kooperativität der Verbindung zweier Ringe in diesem Design möglicherweise für das Scheitern des Ansatzes verantwortlich war.

Daher wurde ein weiteres Design erstellt, welches pro Ring je zwei gegenüberliegende Bindestellen und zwei Polyamid-Anker trug (Abbildung 90 b). Die Kupplung des Polyamid-Isothiocyanates an diese Oligonukleotide lieferte so wenig mutmaßliches Kupplungsprodukt, dass keine massenspektrometrische Analyse des Produktes erfolgen konnte. Im Lichte neuerer Erkenntnisse war bei diesen Reaktionen möglicherweise das Isothiocyanat zu alt gewesen. Trotzdem gelang es, mit dem wenigen mutmaßlichen Kupplungsprodukt eine Ringsynthese durchzuführen, doch auch diese *minicircles* zeigten keinerlei Tendenzen zur Komplexbildung.

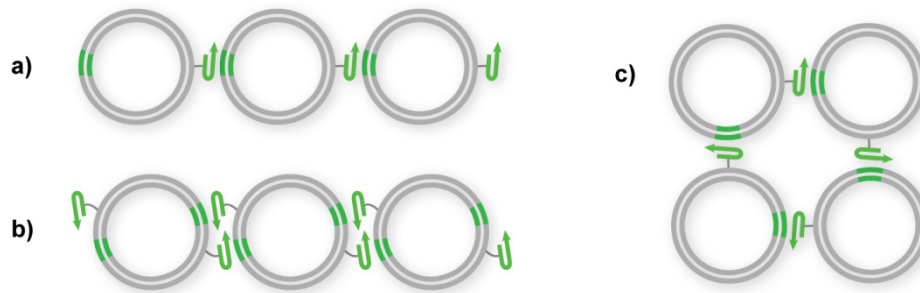


Abbildung 90: Weitere Einsatzmöglichkeiten für Polyamid-Anker-substituierte minicircles. a) Eine Kette mit einfacher Bindung, b) Kette mit doppelter Verknüpfung zum nächsten minicircle. c) Möglicher Komplex aus vier minicircles durch versetzte PA-Bindestellen.

Wegen dieser nicht ermutigenden Ergebnisse wurde ein Design, mit welchem 4-er Komplexe aus *minicircles* entstehen sollten (Abbildung 90 c), nicht experimentell verwirklicht. Da die Identität der mutmaßlichen Kupplungsprodukte nicht festgestellt werden konnte, sollte die Synthese mit frischem PA-Isothiocyanat wiederholt werden um ausschließen zu können, dass die Designs nicht funktionieren. Es erscheint möglich, dass ein Syntheseproblem für das Scheitern der Versuche verantwortlich war. Denn sonst hätten, mindestens im Design Abbildung 90 b Dimere entstehen sollen, da eine Hälfte der *minicircles* identisch mit dem Dimer-Design (Abbildung 87) war.

3.6.7 Diskussion und Ausblick

Da die Kupplung des Polyamides an die DNA oft nur wenige Picomol Kupplungsprodukt lieferte, bietet sich für zukünftige Experimente eine Ringsynthese an einem einzelsträngigen *minicircle* an. Bei einer solchen Syntheseroute konnten im Allgemeinen bessere Ausbeuten an doppelsträngigen Ringen erreicht werden als bei einer Synthese aus linearen Oligonukleotiden. Des Weiteren kann bei dieser Route möglicherweise auf einen Exonuklease-Verdau verzichtet und stattdessen über eine Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt werden. Bei einem Exonuklease-Verdau werden nämlich auch diejenigen *minicircles* abgebaut, die zwar richtig hybridisiert sind, aber bei denen nicht alle Ligationsstellen geschlossen wurden. Somit sind höhere Ausbeuten an Anker-*minicircles* möglich. Für AFM-Aufnahmen oder native Gelelektrophorese-Experimente sind auch *minicircles* geeignet, die nicht vollständig ligiert sind.

Trotz der noch nicht vollständig gelösten Synthese-Probleme haben die Dimerisierungs-Experimente gezeigt, dass die Polyamid-Anker gerade im Vergleich zu den Polyamid-Stützen eine sehr feste und trotzdem spezifische Komplexbildung erlauben. Daher erscheint es lohnend,

weiter Zeit in die Weiterentwicklung des Konzeptes zu investieren. Der Nachteil des Konzeptes ist jedoch, dass chemisch modifizierte DNA verwendet werden muss. Es ist jedoch denkbar, nur einen Bindungspartner einer DNA-Architektur mit Polyamid-Ankern zu versehen. So kann der zweite Bindungspartner weiterhin aus vollständig unmodifizierter DNA bestehen und es wäre zum Beispiel möglich, eine zukünftige DNA-Nanomaschine an einen komplett unmodifizierten DNA-Strang, vielleicht sogar aus einem biologischen Kontext, anzubringen. Eine solche Science-Fiction-Maschine könnte etwa zur Reparatur von DNA oder die Steuerung von Genaktivität eingesetzt werden.

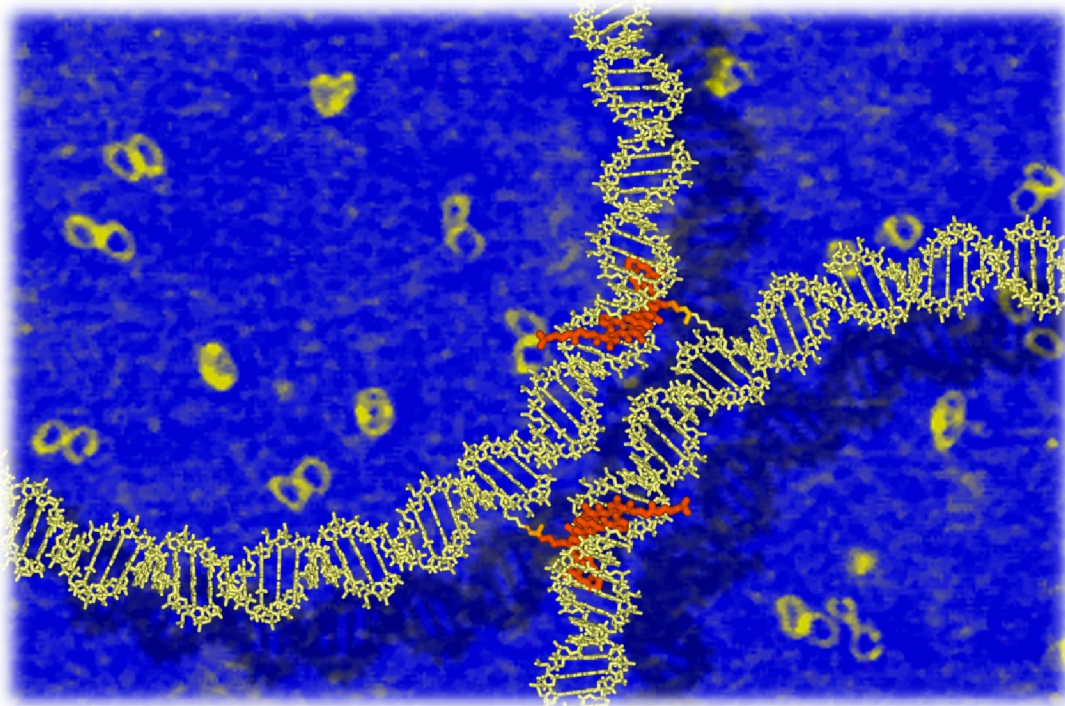


Abbildung 91: Modell eines Polyamid-Anker-Dimers vor einem AFM-Bild der Komplexe. Die Polyamide sind in Rot dargestellt.

3.7 Ein Catenan aus DNA *minicircles*

3.7.1 Versuch der Darstellung eines Catenans mit einer Polyamid-Stütze

Das Wort Catenan leitet sich von Lateinisch *catena* (Kette) ab und bezeichnet eine Klasse von Topologisch verschränkten Ringen. Nach dem erfolgreichen Nachweis der durch die Polyamid-Stütze zusammengehaltenen *minicircle*-Dimere durch FCCS (Abschnitt 3.2.7) erschien es reizvoll, ein Catenan aus *minicircles* aufzubauen. Dazu sollten die Bindestellen für die Polyamid-Stütze von außen ins Innere des Torus verlegt werden und zunächst zwei nicht geschlossene, C-förmige Segmente durch die Polyamid-Stütze so angeordnet werden, dass sie gleichsam ineinander verhakt werden (Abbildung 92 a-b). Nun sollten die für einen Ringschluss notwendigen Ringfragmente hinzugegeben werden. Durch den Ringschluss sollten catenierte Ringe entstehen (Abbildung 92 c).

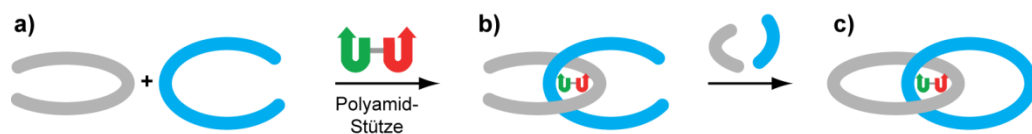


Abbildung 92: Konzept der Catenierung zweier *minicircles* mit Polyamid-Stütze. a) Zwei C-förmige *minicircle*-Fragmente mit innen liegenden Bindestellen für die Polyamid-Stütze werden mit der Stütze inkubiert. b) Anordnung der Fragmente durch die Stütze. c) Bei Zugabe der fehlenden Ringfragmente entsteht ein Catenan.

Für dieses Projekt wurden wieder zwei verschiedene *minicircles* entworfen, eines mit der Bindestelle A, ein anderer mit der Bindestelle B. Zusätzlich zu den Bindestellen für die beiden Polyamide sollten die *minicircles* noch jeweils eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym tragen (Abbildung 93). Damit sollte es möglich sein, einen oder beide Ringe des Catenans selektiv zu schneiden und so den Nachweis über die Bildung des Catenans über denaturierende PAGE führen zu können.

Die Sequenzen wurden, wie im Projekt zur Röhrenbildung (3.5), so entworfen, dass die zu ligierenden *nicks* im Torus außen zu liegen kommen. Die beiden Segmente **gamma** sollten zum Schließen der Ringe zugegeben werden und möglichst kurz sein.

Bei den Synthesen der Ringe zeigte sich, dass **Ring A** sich nicht bildet. Der Grund dafür war lange unklar, lag aber vermutlich in der Bildung einer besonders stabilen Haarnadel-Struktur im Segment **gamma** (siehe Abschnitt 3.1.9.2).

Da **Ring A** nicht synthetisierbar war, sollte das Experiment so abgewandelt werden, dass zwei identische **Ringe B** mit einer Polyamid-Stütze aus zwei **Polyamiden B** vororganisiert und dann geschlossen werden sollten.

Trotz sorgfältiger Aufreinigung aller beteiligten Komponenten wurde bei einer Ligation der entsprechend vorinkubierten Komplexe in der PAGE keine Bande mit erniedrigter elektrophoretischer Mobilität gefunden, wie sie von einem Catenan zu erwarten gewesen wäre.

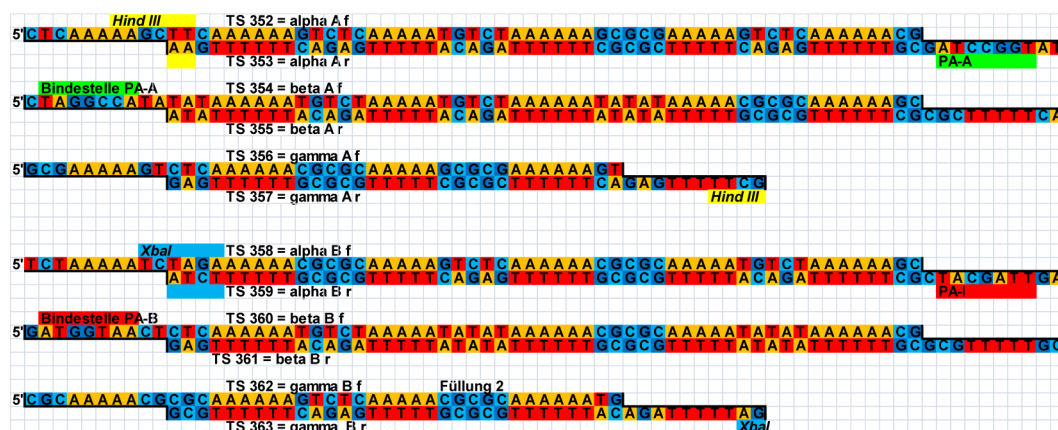


Abbildung 93: Sequenzdesign der beiden minicircles A (oben) und B (unten). Die Bindestellen für die Polyamide sind grün (für PA-A) und rot (für PA-B) markiert, die Bindestelle für Hind III in Gelb und die für XbaI in Blau markiert.

Für das Scheitern der Catenierungs-Experimente sind verschiedene Gründe denkbar. Zum einen war der Linker der Stütze sehr lang und könnte daher möglicherweise nicht nur die in Abbildung 92 b gezeigte, verschränkte Konformation bilden, sondern auch eine Konformation, in der die C-förmigen Fragmente übereinander zu liegen kommen. Damit könnten, trotz Komplexierung durch die Stütze, nach einem Ringschluss kein Catenan, sondern nur zwei unabhängige Ringe gebildet worden sein. Zwei weitere Schwachpunkte dieses Designs sind die nur mäßigen Komplexausbeuten mit der Polyamid-Stütze und die Schwierigkeit, die genaue Stöchiometrie trotz der Adsorptionstendenz der Polyamid-Stütze zu treffen (siehe Diskussion in Abschnitt 3.2.9). Und schließlich waren die Ringschlussausbeuten zum damaligen Zeitpunkt noch so gering (meist deutlich unter 10 % Gesamtausbeute), dass die zu erwartenden Ausbeuten eines Catenans damit sehr gering waren, da beide Ringe geschlossen werden müssen. So geringe Mengen konnten allerdings nicht nachgewiesen werden.

3.7.2 Versuch der Darstellung eines Catenans mit Polyamid-Ankern

Als die Polyamid-Anker (Kapitel 3.6) entwickelt waren, und die Prinzipien für ein gutes *minicircle* Design (Abschnitt 3.1.9) nach und nach erkannt worden sind, sollte ein weiterer Anlauf für die Darstellung eines Catenans unternommen werden (Abbildung 94). Gegenüber dem vorigen Design sollten mehrere Punkte verbessert werden. Erstens sollte die Vororganisation der C-förmigen Fragmente nicht mehr nur durch eine Stütze, sondern durch zwei Polyamid-Anker stattfinden. Die Anordnung sollte dadurch fester werden, da die Anker kürzer sind, fester binden und da der kooperative Effekt von zwei Wechselwirkung unterstützend wirkt. Die korrekte Topologie sollte dadurch erzwungen werden, dass eine die Ausbildung beider PA-DNA-Bindungen nur dann gleichzeitig stattfinden kann, wenn ein Doppelstrang einmal ober- das andere Mal unterhalb des zweiten Stranges verläuft (Abbildung 94 b).

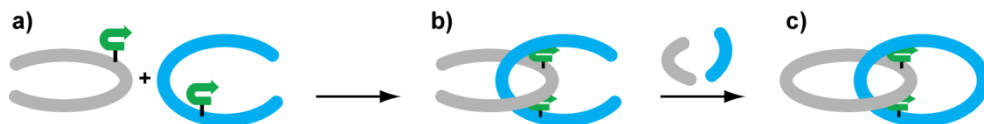


Abbildung 94: Konzept der Darstellung eines Catenans aus zwei Polyamid-Anker-modifizierten *minicircle*- Fragmenten (a). b) Komplexbildung mit verschränkten Fragmenten c) Ringschluss durch Zugabe der Ringschluss-Oligonukleotide. Zur Verdeutlichung der Topologien sind die beiden Fragmente in unterschiedlichen Farben gezeichnet, im verwirklichten Design jedoch identisch.

Um das Design und das experimentelle Vorgehen so einfach wie möglich zu halten, sollte der nachfolgende Ringschluss nur noch durch ein Oligonukleotid erfolgen (Abbildung 95). Des Weiteren sollte das Catenan nach den guten Erfahrungen mit homodimeren Systemen (3.6) aus zwei identischen Fragmenten aufgebaut werden.

Die 5 verwendeten Oligonukleotide des *minicircle*-Designs hatten unterschiedliche Längen (Abbildung 95). Die Oligonukleotide **TS 648**, **TS 649** und **TS 651** waren jeweils 84 nt lang. Diese Oligonukleotide waren in der ersten Lieferung von guter Reinheit, in Nachbestellungen schien die Länge oder die Phosphorylierung Probleme bei der Synthese oder Aufreinigung bereitet zu haben (siehe Abschnitt 3.1.9.4). Das Ringschluss-Oligonukleotid **TS 363** und das Amino-modifizierte Oligonukleotid waren kürzer. Die Stelle, an der das Amino-modifizierte T in die Sequenz von **TS 650** eingefügt wurde, lässt die Modifikation – bei einer Aufsicht auf den Torus - senkrecht nach oben ragen. Die Bindestelle für das Polyamid zeigt in derselben Aufsicht nach unten. Die Bindestelle war etwa 1/3 des Kreisumfanges neben der Anker-Modifikation untergebracht, damit die Ringe so ineinander verschlungen zu liegen kommen, dass die Kreisumfangslinie eines Ringes durch den Mittelpunkt des anderen Ringes geht.

Um zu testen, wie die Ringschlussausbeuten mit den Oligonukleotiden dieses Designs liegen, wurden zunächst Zyklisierungsexperimente mit dem Oligonukleotid **TS 650** ohne PA-Modifikation durchgeführt. Diese zeigten in der PAGE-Analyse der Ligationsprodukte hohe bis quantitative Ausbeuten (Abbildung 45 b), obwohl auch in diesem Design einige Haarnadel-Strukturen ausgebildet werden können. Offensichtlich sind diese jedoch nicht stark genug, um die Synthese merklich zu beeinträchtigen. Deswegen wurde dieses Design leicht modifiziert auch in weiteren Projekten weiter verwendet (G-Quadruplex-Module, Kapitel 3.8 und gecagete *mini-circles*, Kapitel 3.9).

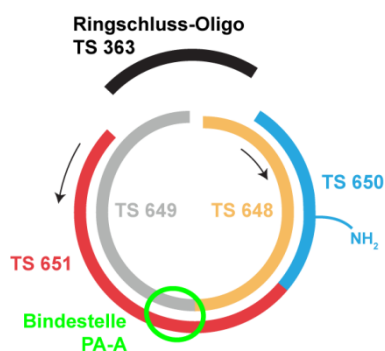


Abbildung 95: Schema der Oligonukleotide für das Catenan mit Polyamid-Ankern.

Die Bildung der Catenane selbst konnte nicht getestet werden, da die Kupplung des Polyamides an das Amino-modifizierte Oligonukleotid **TS 650** keine ausreichenden Ausbeuten lieferte. Durch Probleme mit der Reproduzierbarkeit der Kupplung wurde das Projekt vorläufig auf Eis gelegt. In der neuerlichen Analyse der Kupplungsexperimente ist aufgefallen, dass die Kupplung mit einem mehrere Monate alten Polyamid-Isothiocyanat versucht worden ist. Da nach jetziger Erkenntnis das Isothiocyanat nur wenige Wochen stabil ist, könnte zersetztes Isothiocyanat für das Scheitern verantwortlich sein. Sollte die Kupplung mit frisch dargestelltem Polyamid-Isothiocyanat jedoch gelingen, so könnte innerhalb kürzester Zeit die Synthese eines Catenans getestet werden. Dazu müssten lediglich alle Oligonukleotide außer dem Ringschluss-Oligonukleotid langsam hybridisiert und nach einigen Stunden Inkubation bei 4°C das Ringschluss-Oligonukleotid langsam zugegeben werden. Die Ringe könnten nun ligiert werden und eventuell gebildete Catenane per denaturierender PAGE nachgewiesen werden. Alternativ kann die Aufreinigung der hybridisierten Produkte über Anionenaustausch-Chromatographie und der Nachweis per AFM erfolgen.

3.8 G-Quadruplex-Module

3.8.1 Einführung

In diesem Projekt sollte untersucht werden, ob die salzinduzierte Ausbildung von G-Quadruplexen zum Zusammenbau von DNA-Nanoarchitekturen genutzt werden kann. G-Quadruplexe sind, wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, nicht kanonische DNA- oder RNA-Strukturen, in denen jeweils vier Guanine um ein zentrales Metallatom angeordnet sind. Intramolekulare G-Quadruplexe, wie der in Abbildung 7 gezeigte intramolekulare Komplex, sind die am häufigsten vorkommenden und wohl auch die einzigen biologisch relevanten G-Quadruplexe, doch es gibt auch noch eine Reihe weiterer Komplexe mit G-Quartetten. Hierzu gehören bi- und tetramolekulare Komplexe (Abbildung 96) und einige lineare Strukturen mit prinzipiell unendlicher Ausdehnung, wie beispielsweise „G-Lego“,²³¹ „Frayed-wires“²³² und „G-wires“.²³³ Im weiteren Sinne sind die letzteren schon Beispiele von Nanoarchitekturen auf G-Quadruplex-Basis, doch wurden mit ihnen noch keine diskreten Objekte aufgebaut.

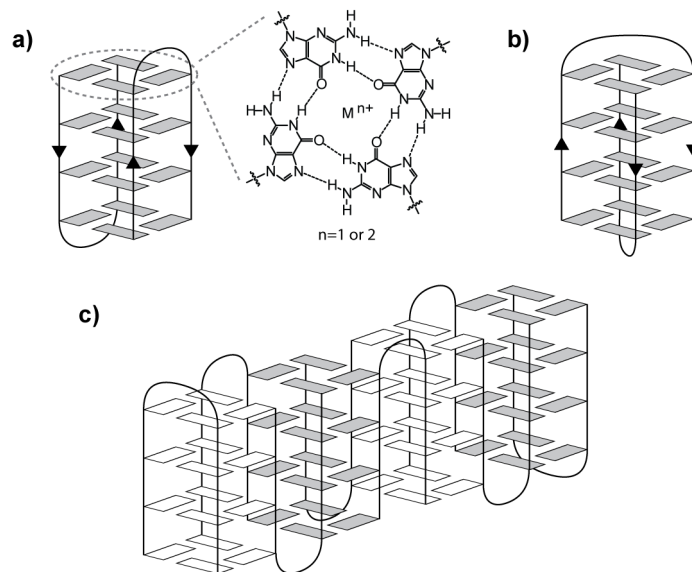


Abbildung 96: Oben: zwei mögliche bimolekulare G-Quadruplexe. a) edge looped-Quadruplex, b) diagonally looped-Quadruplex. c) Eine an Nishigaki²³¹ angelehnte „G-Lego“ genannte Struktur.

Ebenfalls mithilfe von G-reichen Strängen hat die Gruppe um Chad Mirkin Gold-Nanopartikel zu großen Clustern aggregiert.²³⁴ Eine *synapsable* G-Quadruplex oder *pinched duplex* genannte Verbindung von zwei Doppelsträngen mit internen G-Fehlpaarungen wurde von der Gruppe

um Sen entwickelt.²³⁵⁻²³⁸ Diese wurden aber noch nicht zum Zusammenführen größerer Baueinheiten genutzt, was hier jedoch geschehen sollte.

3.8.2 Der Haarnadel-*minicircle*

Anstoß zu diesem Projekt war ein Bericht von Chen *et al.*²³⁹, in dem zwei G-reiche Stränge eine G-Quadruplex-Struktur ausbildeten, so dass die Enden der beiden Stränge jeweils zusammen zu liegen kamen. Die vororganisierten Enden wurden dann chemisch ligiert, so dass zwei kurze *minicircles* entstanden (siehe Abbildung 97).

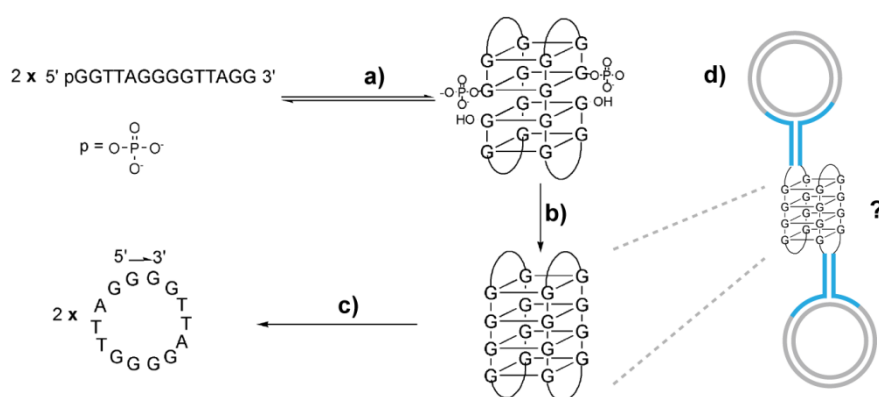


Abbildung 97 a-c) Synthese von zwei ss DNA-*minicircles* nach Chen *et al.*²³⁹ a) Zwei G-reiche Einzelstränge bilden einen G-Quadruplex aus. b) Die Enden der Stränge werden chemisch ligiert. c) Unter denaturierenden Bedingungen wird der G-Quadruplex in zwei ss DNA-*minicircles* getrennt. d) Projektidee: Kann solch ein G-Quadruplex auch zwei große DNA-*minicircles* zusammenhalten?

In Zusammenarbeit mit Dr. Diana Gonçalves und Dr. Martin Koeppel sollte untersucht werden, ob eine derartige Komplexbildung auch noch dann funktioniert, wenn die G-reichen Stränge Teil einer viel größeren Architektur, beispielsweise von doppelsträngigen *minicircles* sind (Abbildung 97 d). Schließlich mussten in dem Bericht von Chen immerhin denaturierende Bedingungen gewählt werden, um den ligierten Komplex zu trennen. Die in Abbildung 97 gezeigte Topologie entspricht einem *edge looped* (Seite an Seite)-G-Quadruplex. Eine andere häufige Topologie von bimolekularen G-Quadruplexen ist die *diagonally looped* (diagonal gekreuzte)-Form (siehe Abbildung 96 oben). Um eine solche *edge looped*-Topologie in einen größeren Kontext einzubauen, sollte eine G-reiche Haarnadel über eine flexible Verbindung von 2 Basen an einen Doppelstrang angefügt werden, der wiederum über eine dreiarmlige Kreuzung mit dem Ring verbunden werden sollte (Abbildung 98). Dieser Doppelstrang („Stamm“) sollte in AFM-Aufnahmen als Kontrolle dafür dienen, ob die dreiarmlige Kreuzung aus dem Ring heraus weist und die G-Quadruplex-Region räumlich von den sterisch anspruchsvollen Ringen trennen. Um eine hohe

Ausbeute bei der Ringsynthese zu erhalten, sollte die Synthese an einzelsträngigen Ringen erfolgen.

Die Sequenz des *minicircle*-Teils ist dieselbe wie sie für die Catenierung mittels Polyamid-Anker entworfen worden ist (Abschnitt 3.7.2). Dieser *ss minicircles* war aus nur noch zwei 84-meren aufgebaut (Abbildung 129). Die Sequenzen enthielten zwar noch einige Sekundärstrukturmotive, doch war die Bildung der gewünschten Strukturen dadurch nicht beeinträchtigt.

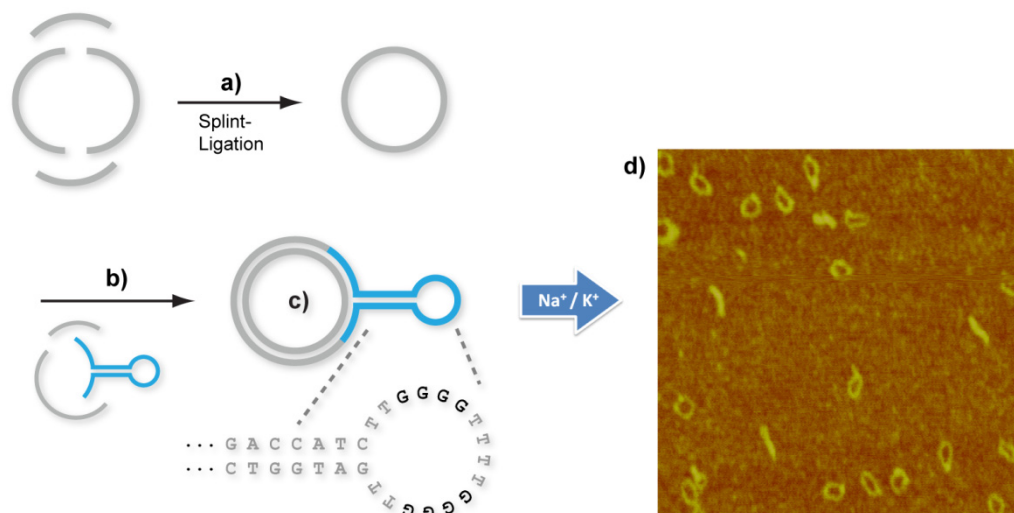


Abbildung 98 a) Über Splint-Ligation wird ein *ss minicircle* erzeugt. b) Dieser dient als Templat für den Zusammenbau des Haarnadel-*minicircles*. An den 168 bp großen Ring ist über eine dreiarmlige Kreuzung eine Haarnadel-Struktur angebracht, die in der Schleife eine G-reiche Sequenz enthält. d) Ein AFM-Bild nach Inkubation der Haarnadel-*minicircles* mit Na^+ oder K^+ zeigt fast ausschließlich Monomere (Kantenlänge = 500 nm).

Die Synthese der *ss minicircles* verlief mit Oligonukleotiden der Fa. Metabion problemlos, eine Nachlieferung der Fa. Sigma Aldrich war von so geringer Qualität, dass hiermit die Synthese nicht gelang. Experimente aus dem Projekt mit gecageten Oligonukleotiden (3.9) zeigten jedoch, dass selbst ohne die vorherige *ss minicircles* Synthese ein befriedigendes Ergebnis durch Hybridisieren aller Oligonukleotide erzielt werden konnte.

Zu diesen *ss minicircles* wurden die übrigen Stränge gegeben und die Haarnadel-*minicircles* PAGE-aufgereinigt. Alternativ kann auch eine Anionenaustausch-HPLC durchgeführt werden. Im PAGE-Gel (siehe Abbildung 101) ist eine Bande mit geringerer elektrophoretischer Mobilität gegenüber einer Kontrollbande aus einem unverzweigten, doppelsträngigen DNA-*minicircle* zu sehen. Auch die AFM-Bilder (siehe Abbildung 98) lassen den Haarnadel-Anhang bei vielen Ringen erahnen, wobei die Wahl der Abgangsstelle der dreiarmligen Kreuzung bezüglich den *A-tracts* korrekt zu sein scheint, da der Appendix in allen Fällen, wo er zu sehen ist, nach außen weist.

Dennoch zeigten die synthetisierten Ringe praktisch keine Tendenz, mit Na^+ oder K^+ zu dimerisieren. Hieraus lässt sich folgern, dass die G-Quadruplex-Bildung behindert oder zu schwach ist. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass die G-Quadruplexe nicht wie angenommen die *edge looped*-Topologie, sondern die gekreuzte *diagonally looped*-Topologie bevorzugen. Eine solche Topologie hätte aber bei Chen²³⁹ (Abbildung 97) ein cateniertes Ligationsprodukt zur Folge haben müssen. Warum das nicht der Fall gewesen ist, ist nicht ganz klar. Die Schleifen-Region des Haarnadel-*minicircles* und die Länge der G-Sequenz sind dieselben wie bei Chen. Ein offensichtlicher Unterschied sind jedoch die Enden der Stränge. Während bei Chen die Stränge – vor Ligation – mit zwei Guanosinen enden, haben wir in unserem Design die „Schnittstelle“ gleichsam um vier Nukleotide verschoben, so dass die G_4 -Sequenzen nicht unterbrochen sind. Daher wollten wir testen, ob das Haarnadel-System allein noch G-Quadruplexe auszubilden vermag. Dazu wurde das G-reiche Haarnadel-Oligonukleotid zum einen in einer KCl-Lösung, zum anderen in einer MgCl_2 -Lösung von 95°C langsam abgekühlt und jeweils ein Zirkulärdichroismus (CD) -Spektrum aufgezeichnet. Da der Strang zusätzlich zu der G-reichen Haarnadelschleife zwei lange einzelsträngige Regionen und den doppelsträngigen Teil der Haarnadel mitbringt, ist der Anteil von potenziellen G-Quadruplexen am Signal recht gering. Daher musste ein Differenzspektrum der beiden Spektren erstellt werden. Dieses zeigt ein Minimum etwas unterhalb von 260 nm und ein Maximum zwischen 290 und 300 nm. Dies ist der typische Fingerabdruck von antiparallelen G-Quadruplexen (siehe Abbildung 99).

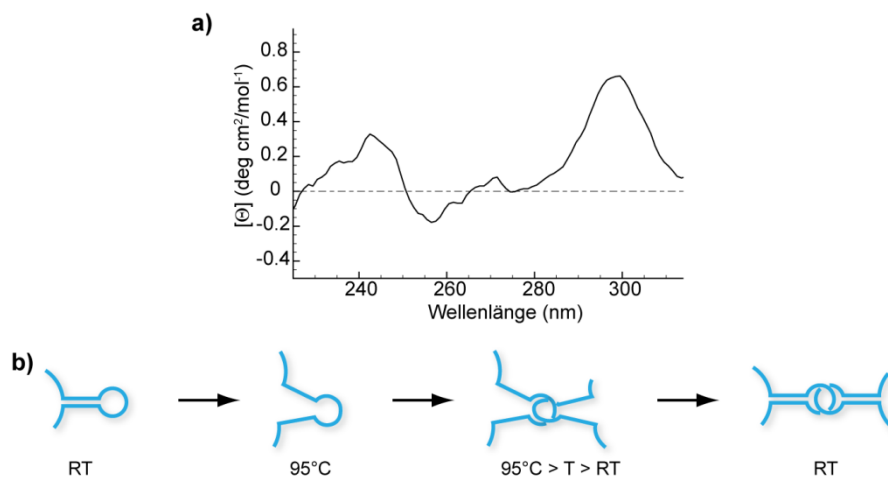


Abbildung 99 a) Differenz-CD-Spektrum des Haarnadel-Oligonukleotids. Ein Minimum bei etwa 260 nm und ein Maximum bei etwa 290 nm sind typisch für antiparallele G-Quadruplex Formationen. b) Hypothetische Bildung eines catenierten Haarnadel-Paares in kaliumhaltigem Puffer durch Ausbildung eines G-Quadruplexes vor der Hybridisierung der Haarnadel-Doppelstränge.

Anhand dieses Differenzspektrums kann zwar nicht auf eine *edge*- oder *diagonally looped*-Topologie geschlossen werden, doch es ist es ein klarer Beweis dafür, dass mit K^+

G-Quadruplexe entstanden sind. Da bei der Inkubation von bereits vollständig gebildeten (monomeren) Haarnadel-*minicircles* allerdings keine Dimerisierung erfolgte, stellten wir die Hypothese auf, dass beim Abkühlen in KCl eine gekreuzte *diagonally looped*-Topologie entstanden sein könnte (Abbildung 99 b). Dies wäre denkbar, da MgCl_2 , die G-Quadruplex-Bildung kaum begünstigt, K^+ hingegen in hervorragender Weise.³⁴ Die Stabilisierung von DNA-Duplexen wiederum ist durch Magnesium deutlich stärker als mit Natrium. Über den Einfluss von Kalium als einzigem Kation auf die Stabilisierung von DNA-Duplexen ist mir keine Studie bekannt, doch dürfte sie durch den größeren Atomdurchmesser noch geringer sein als die Stabilisierung durch Natrium. Beim Abkühlen in KCl könnte demnach zunächst ein *diagonally looped* G-Quadruplex entstehen, bevor sich die Doppelstrangregion der Haarnadelstruktur ausbildet (Abbildung 99 b), während beim Abkühlen mit Mg^{2+} sich die Haarnadel schon bei höheren Temperaturen schließt. Diese Haarnadel kann nun aus topologischen Gründen keine *diagonally looped* G-Quadruplexe mehr bilden, da die Schleifenregionen sich dabei im Weg stehen. Das bereits gebildete Catenan aus dem K^+ -Experiment sollte in magnesiumhaltigen Puffern auch ohne Kalium stabil sein. (vgl. Abbildung 100 a).

3.8.3 Ein G-Quadruplex-Catenan

Wenn ein Haarnadel-Catenan wie postuliert entstanden ist, so sollte sich dieses zum Zusammenbau von catenierten *minicircles* einsetzen lassen. Daher wurden zu den mit K^+ oder Na^+ vorhybridisierten Haarnadel-Oligonukleotiden ohne abermaliges Aufheizen auf 95°C die fehlenden Oligonukleotide gegeben (Abbildung 100 a) und per PAGE analysiert. Die gelektrophoretische Analyse der Reaktion (Abbildung 100 c, mittlere Bahn) zeigt zusätzlich zu der Monomer-Bande bei etwa 400 nt eine weitere Bande zwischen 750 und 1000 nt. Diese Bande war sowohl in nativer als auch in denaturierender PAGE zu sehen, was den Schluss nahe legt, dass es sich bei dieser Bande tatsächlich um die catenierten *minicircles* handelt.

In einem Kontrollexperiment (Abbildung 100 b) wurden alle Oligonukleotide gemeinsam von 95°C mit Na^+ oder K^+ abgekühlt, die entsprechenden Reaktionen wurden mit nativen oder denaturierenden PAGE-Gelen untersucht. Dabei zeigte sich im Bezug auf die verwendeten Kationen kein nennenswerter Unterschied und es entstand wie beim Abkühlen mit Magnesium nur das *minicircle*-Monomer.

Zwar sind verhältnismäßig wenig catenierte Dimere entstanden, doch ließe sich dieser Anteil durch eine Modifikation des Designs der Haarnadel-Region vermutlich steigern. So könnte man durch eine Verkürzung des Stammes die Schmelztemperatur der Duplexregion absenken und so die Konkurrenz zwischen G-Quadruplex-Bildung und Haarnadel-Hybridisierung zugunsten des G-Quadruplexes stärken. Diese Annahme erscheint auch deshalb plausibel, da der gegenteilige Effekt in der Kontrollreaktion b) beobachtet wurde, in der sich Catenane trotz Inkubation mit

K^+ oder Na^+ nicht finden ließen. Vermutlich ist durch die zusätzlichen Watson-Crick-Basenpaarungsmöglichkeiten des Haarnadel-Stranges mit dem einzelsträngigen Ring die Schmelztemperatur der B-DNA-Regionen so weit angestiegen, dass sich im Abkühlungsprozess die B-DNA vor der Schmelztemperatur der G-Quadruplexe bildet.

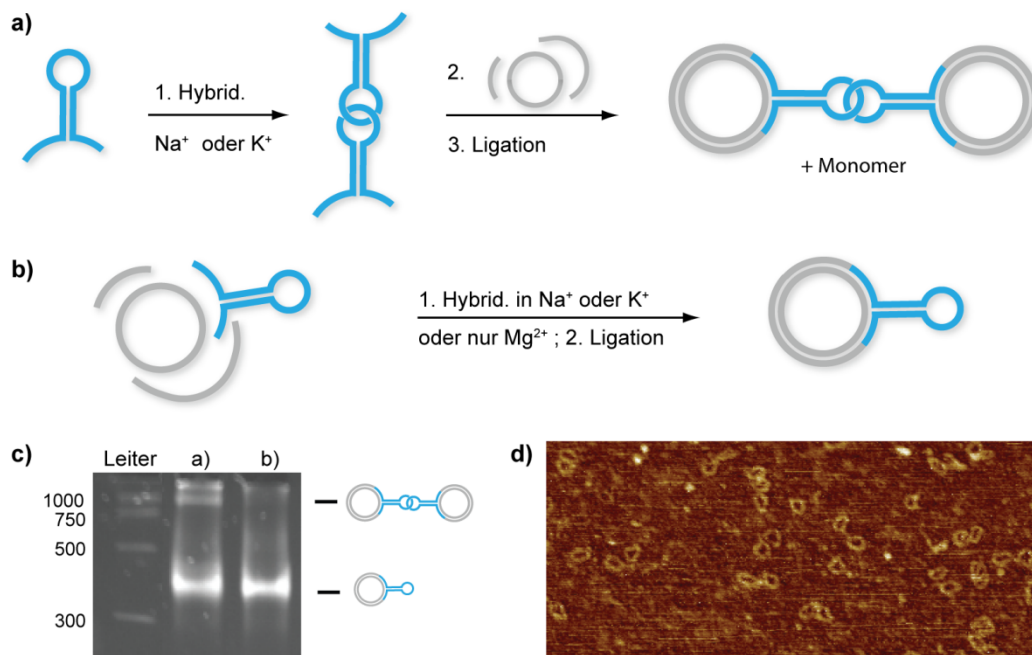


Abbildung 100: Die Darstellung eines Catenans. a) Das Haarnadel-Oligonukleotid wird zunächst allein mit Na^+ oder K^+ inkubiert, wobei catenierte Haarnadeln entstehen. Zu diesen werden die übrigen Bauelemente des Haarnadel-minicircles gegeben. Es entstehen neben Monomeren auch Catenane. b) Werden alle Oligonukleotide des minicircles gemeinsam von $95^\circ C$ abgekühlt, entstehen nur Monomere. c) PAGE-Gel der Reaktionen d) Eine AFM-Aufnahme der Catenane.

Die entsprechende Bande des Catenans wurde ausgeschnitten, eluiert und für eine AFM-Aufnahme in einem Na^+ und K^+ freien Puffer verdünnt, was eventuelle G-Quadruplexe zerstören sollte. Auf der AFM-Aufnahme sind aber hauptsächlich Dimere zu sehen (Abbildung 100 d), bei denen oftmals die Haarnadel-Regionen zwischen den beiden Ringen als ein die Ringe verbindender Steg zu erkennen ist. Dies kann als abschließender Beleg für eine Catenierung gesehen werden.

Allerdings war das Ziel dieses Projektes, eine salzabhängige Bildung von Nanoarchitekturen zu induzieren. Daher sollte das Design modifiziert werden.

3.8.4 Der Stimmgabel-*minicircle*

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, bildet der Haarnadel-*minicircle* in der hier gewählten Sequenz offenbar keine *edge looped*- sondern nur eine *diagonally looped*-Topologie aus. Um der G-Quadruplex-Region eine höhere konformative und topologische Freiheit zu ermöglichen, wurde deshalb ein zweiter *minicircle* mit einem an eine Stimmgabel erinnernden Appendix entworfen. Vom Haarnadel-*minicircle* unterscheidet sich das Design dadurch, dass die Schleifenregion zwischen den Guaninen entfernt wurde und dass zwischen dem Stamm des Appendix und der G₄-Sequenz nun drei statt zwei Thymidine als noch flexiblere Verbindung eingefügt wurden.

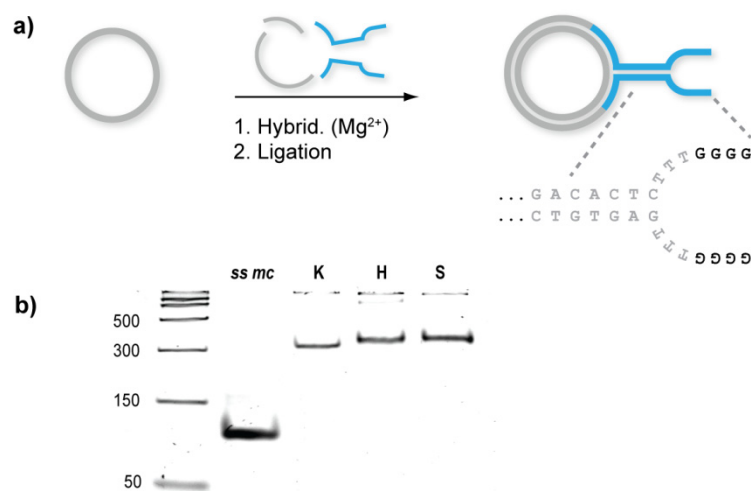


Abbildung 101 a) Synthese des Stimmgabel-*minicircles* und b) PAGE-Gel mit *ss minicircle* (*ss mc*), einem 168 bp Kontrollring ohne Appendix (K), dem Haarnadel-*minicircle* (H) und dem Stimmgabel-*minicircle* (S).

Ein nach Abschluss der Experimente gefundener Bericht über die Stabilität von intramolekularen G-Quadruplexen³⁶ lässt es denkbar erscheinen, dass die längere Verbindung zwischen den G-reichen Sequenzen nicht zu einer höheren Stabilität der ausgebildeten G-Quadruplexe führt, sondern im Gegenteil zu deren Schwächung. Diese Vermutung könnte in Folgeexperimenten überprüft werden.

Das PAGE-Gel der Synthese des Stimmgabel-*minicircles* an dem einzelsträngigen Ring (Abbildung 101 b) zeigt ein neues Produkt. Da der Appendix des Stimmgabel-*minicircles* nicht kovalent geschlossen ist, kann nur noch native PAGE erfolgen. Der Kontrollring K hat wie erwartet eine geringfügig höhere Mobilität als die substituierten Ringe. Die Aufreinigung der *minicircles* kann wieder über PAGE oder Anionenaustausch-HPLC erfolgen. Bei letzterer zeigten sich zwei Peaks, was ein erster Hinweis auf eine Dimerisierung ist, da zum Eluieren ein NaCl-Puffer eingesetzt wird, der die Dimerisierung auslösen könnte. Diese Tendenz zur Komplexbil-

dung konnte auch in nativen Gelen mit einwertigen Kationen oder auch auf den AFM-Aufnahmen gefunden werden. Überraschenderweise hing jedoch die Art der gebildeten Komplexe von dem verwendeten Kation ab. Natrium und etwas schwächer auch Nickel führten zu einer Homodimerisierung (Abbildung 102 b).

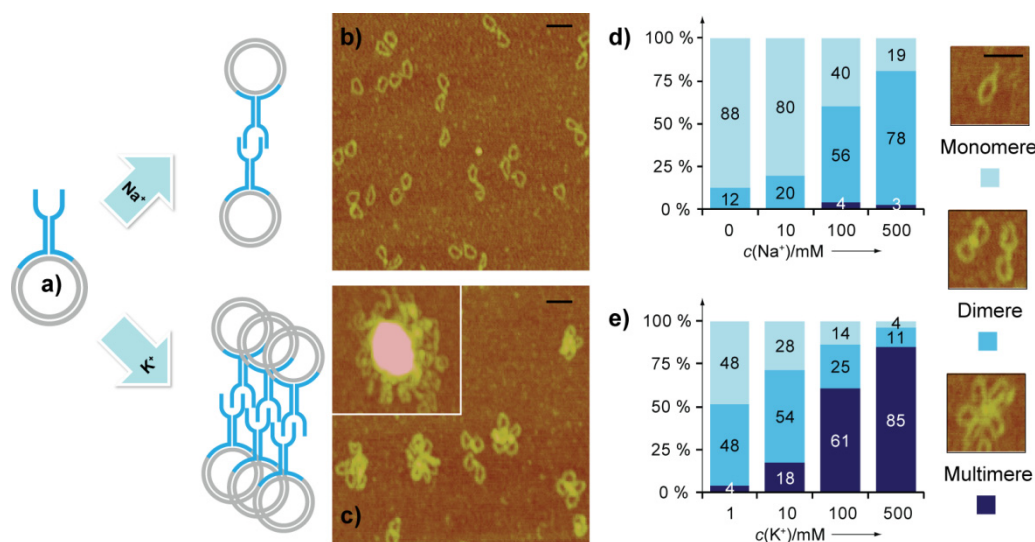


Abbildung 102 a) Der Stimmgabel-minicircle bildet, abhängig von der Art des zugegebenen Metallsalzes, unterschiedliche Komplexe aus. Mit Na⁺ (b und d) bilden sich hauptsächlich Homodimere, mit K⁺ (c und e) bei niedrigen Konzentrationen ebenfalls Dimere und in höheren Konzentrationen Multimere. Die Referenzbalken in den AFM-Bildern entsprechen 50 nm. In den Balkendiagrammen (d und e) sind die jeweiligen Anteile der Monomere und der unterschiedlichen Komplexe an der Gesamtanzahl der Ringe bei den jeweiligen Metallionenkonzentration nach Auszählung der entsprechenden AFM-Aufnahmen aufgetragen.

Die Ausbeute an komplexierten Ringen, bestimmt nach Auszählung mehrerer AFM-Bilder, war abhängig von der Konzentration des Metallsalzes und erreichte für Na⁺ 78 % (Abbildung 102 d).

Kalium-Ionen führten hingegen schon bei niedrigeren Konzentrationen als Natrium-Ionen zu einer Dimerisierung (Abbildung 102 e). Beim Erhöhen der Salzkonzentration bildeten sich jedoch vermehrt Multimere, bis sich die Ringe bei 500 mM K⁺ zu großen Konglomeraten zusammenschlossen, in denen einzelne Ringe kaum mehr ausgemacht werden konnten (Einschub in Abbildung 102 c). Strontium führte, wenn auch in schwächerem Maße, ebenfalls zu Multimeren. Diese Multimere lassen sich nicht mehr durch bimolekulare G-Quadruplexe jedweder Topologie erklären. Stattdessen könnte eine Struktur ähnlich der von Nishigaki²³¹ postulierten G-Lego-Struktur (Abbildung 96 c) ausgebildet worden sein. Die genaue Topologie lässt sich mit dem AFM-Ansatz jedoch nicht ermitteln, da hierfür die Auflösung nicht ausreicht.

In der abschließenden Bewertung erscheinen sowohl das catenierte Haarnadel-Design als auch das Stimmgabel-Design geeignet, um größere Strukturen aufzubauen. Ein Vorteil der catenierten Haarnadeln ist, dass sie sich vor einer Synthese der größeren Architektur aufreinigen lassen und so nur die tatsächlich catenierten Haarnadeln eingesetzt werden könnten. Somit wäre auch die Frage nach der Ausbeute der Catenierungs-Reaktion zweitrangig, da die Edukte kommerziell erhältliche Oligonukleotide sind und die Reaktion der erste Schritt eines mehrstufigen Prozesses wäre. Entstehende Architekturen wären dann auch ohne die Anwesenheit von Na^+ oder K^+ stabil.

Die salzabhängige Bildung des Stimmgabel-Motivs könnte ausgenutzt werden, indem Architektur-Elemente in Magnesium zusammengesetzt und möglicherweise aufgereinigt werden. Erst in einem nachgelagerten Schritt könnte dann Natrium zugegeben werden. Ein solcher schrittweiser Aufbau ist, wie in Abschnitt 3.12.3 diskutiert, vorteilhaft bei der Konstruktion von größeren 2D- und 3D-Objekten.

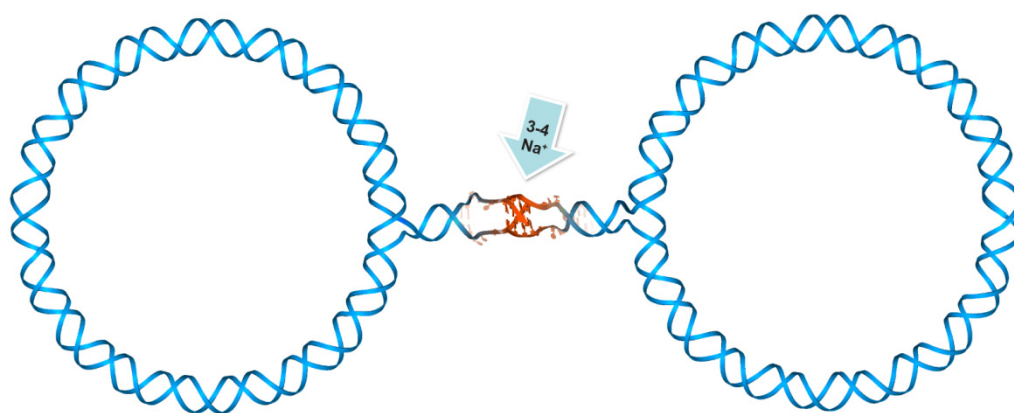


Abbildung 103: Größenrichtiges Modell eines Stimmgabel-minicircle Dimers. Dieses hat eine Masse von über 220 kDa und wird nur von 3-4 Natrium-Ionen zusammengehalten.

3.9 „Gecagete“ Architekturen

3.9.1 Einführung

Das Feld der DNA-Nanotechnologie ist mittlerweile sehr breit gefächert und reicht, wie in der Einleitung dargestellt, von Nanoarchitekturen über Motoren auf Basis von DNA bis zu DNA-basierten Rechnern und Sensorik. Die gemeinsame Basis für praktisch alle diese Technologien ist die gezielte Hybridisierung von DNA. Bei den etablierten Technologien lässt sich der Zeitpunkt, wann Hybridisierung stattfindet nur schwer steuern. So kann man die Länge und den G-C-Gehalt eines Hybridisierungsabschnittes so designen, dass er eine höhere bzw. niedrigere Schmelztemperatur hat und so beim langsamen Hybridisieren durch Abkühlen früher bzw. später hybridisiert. Zum anderen kann man die beteiligten Oligonukleotide auch nach und nach zum Experiment dazugeben.

Ein neuerer Ansatz zur Kontrolle der Hybridisierung von DNA ist die reversible Schaltung von modifizierten Oligonukleotiden mit Licht zweier verschiedener Wellenlängen. Dieser Ansatz ist daher so reizvoll, da Licht als Reagenz bzw. Energiequelle eingesetzt werden kann. Hierfür werden Oligonukleotide mit mehreren Azobenzol-Einheiten versehen und erlauben beispielsweise das Schalten von DNA-Pinzetten²⁴⁰ oder von DNAzymen.²⁴¹

Ziel dieses Projektes war es, eine andersartige, lichtgesteuerte Kontrolle von DNA-Hybridisierung für die DNA-Nanotechnologie nutzbar zu machen. Dabei soll in Zusammenarbeit mit Julie Tevarpadam und Dr. Martin Koeppel untersucht werden, ob sich mit „cages“ (engl. für Käfige) versehene Nukleinsäuren auch in der DNA-Nanotechnologie einsetzen lassen könnten. *Cages* in diesem Kontext sind temporäre Schutzgruppen, welche an einer funktionellen Gruppe eines Moleküls angebracht sind und damit die Funktion des Moleküls stören. Die *cages* können durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge wieder entfernt werden; dadurch wird die Funktion des Moleküls wieder hergestellt. *Caging* ist als Konzept schon Jahrzehnte alt und wurde erfolgreich für verschiedenste Moleküle, meist mit biologischem Fokus angewandt.²⁴² Nukleinsäuren mit *cages* auf den Nukleobasen sind hingegen eine neuere Entwicklung aus dem Arbeitskreis Heckel.²⁴³ In diesem Falle sind die *cages* so angebracht, dass die Watson-Crick-Basenpaarungen gestört werden und nach Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht wieder hergestellt werden können (siehe Abbildung 104 a-b).²⁴⁴ Nach der Bestrahlung, dem „Entcagen“, der irreversiblen Abspaltung der Photoschutzgruppe, sind die Oligonukleotide identisch mit nicht gecageten „Wildtyp“ (wt) -Oligonukleotiden. Dadurch haben die entcageten Oligonukleotide auch dieselben strukturellen und physikochemischen Eigenschaften (z.B. Durchmesser und Basen pro Helixwindung, Schmelzpunkte usw.) wie wt-Oligonukleotide und lassen sich mit natürlichen Enzymen manipulieren. Des Weiteren sind die Ausbeuten beim Entcagen meist besser als bei der reversiblen Schaltung von z.B. Azobenzolen. Aus diesem Grund könnten gecagete

Oligonukleotide für manche Anwendungen den dauerhaft modifizierten reversibel schaltbaren Oligonukleotiden überlegen sein.

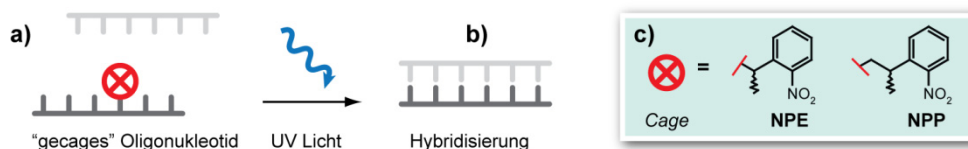


Abbildung 104 a) Schematische Repräsentation eines gecageten Oligonukleotids und des Gegenstranges. Bei Bestrahlung mit UV-Licht fällt der cage ab und die Stränge hybridisieren.

3.9.2 Design mehrerer gecageter *minicircles*

In einer Reihe von exemplarischen Versuchen sollte untersucht werden, ob gecagete Oligonukleotide im Kontext von größeren DNA-Architekturen deren Komplexbildung stören können, ob die Störung vollständig entfernbar ist und ob DNA-Nanoarchitekturen von der Entcaging-Prozedur beeinträchtigt werden. Als Testsystem sollten mit einem Fortsatz versehene DNA-*minicircles* zum Einsatz kommen, wie sie sich schon für die Untersuchung der G-Quadruplex-induzierten Architekturen bewährt haben (siehe Abschnitt 3.8). Die Enden der Fortsätze wurden variiert, so dass 10 verschiedene *minicircles* mit und ohne *cages* erhalten wurden (siehe Abbildung 105).

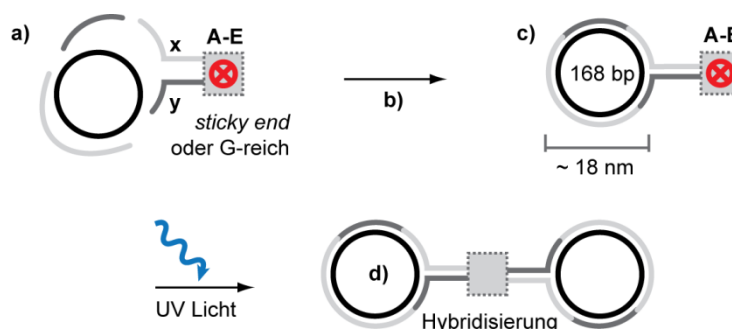


Abbildung 105 a) Aufbau von verschiedenen *minicircles* mit und ohne *cages* (A-E) durch Hybridisieren und Ligieren (b). Nach Belichtung der *minicircles* mit verschiedenen Fortsätzen (c) können diese zu Dimeren hybridisieren (d).

Wir haben insgesamt 4 verschiedene Designs ausgetestet (siehe Abbildung 106), wobei alle Ringe sowohl mit *cages* als auch ohne *cages* (wt) zur Kontrolle des Dimerisierungsverhaltens nach Bestrahlung der gecageten Ringe synthetisiert wurden. Diese verschiedenen Systeme sollen in

der Lage sein, nach Entfernung der *cages* zu hybridisieren, so dass Homo- oder Heterodimere entstehen (Abbildung 105 d).

Die ersten beiden Designs (Abbildung 106 **A** und **B**) waren mit selbstkomplementären *sticky ends* von 6 bzw. 8 nt Länge versehen. Selbstkomplementäre *sticky ends* haben den Vorteil, dass sie Homodimere ausbilden und somit die Konzentrationen nicht genau eingestellt werden muss, was bei den niedrigen Konzentrationen und Stoffmengen der Ringsynthesen von Vorteil sein kann. Ein 8 nt langes *sticky end* sollte gegenüber dem 6 nt langen *sticky end* einen höheren Schmelzpunkt aufweisen, jedoch kann eine längere selbstkomplementäre Sequenz potentiell auch Haarnadel-Strukturen ausbilden, was einer Dimerisierung entgegen steht. Ein drittes selbstkomplementäres Design sind die Stimmgabel-artigen G-reichen Stränge, wie sie in Abschnitt 3.8.4 beschrieben sind und welche mit Na^+ oder K^+ G-Quadruplexe ausbilden können (Abbildung 106 **C**). Dieses Design bietet somit die Möglichkeit, die Störung von anderen Interaktionen als Watson-Crick-Basenpaarungen durch *cages* zu untersuchen. Die Verhinderung der G-Quadruplex Bildung durch *cages* ist zwar bereits aus den Untersuchungen des gecageten Thrombin-Aptamers bekannt,²⁴⁵ doch besteht dieses nur aus einem Strang und damit ist die Bildung ein intramolekularer Prozess. Hier entsteht hingegen ein bimolekularer Quadruplex, an dem zudem vergleichsweise große *minicircles* hängen, und darum ist die Situation in diesem Fall kaum mit dem im Aptamer zu vergleichen.

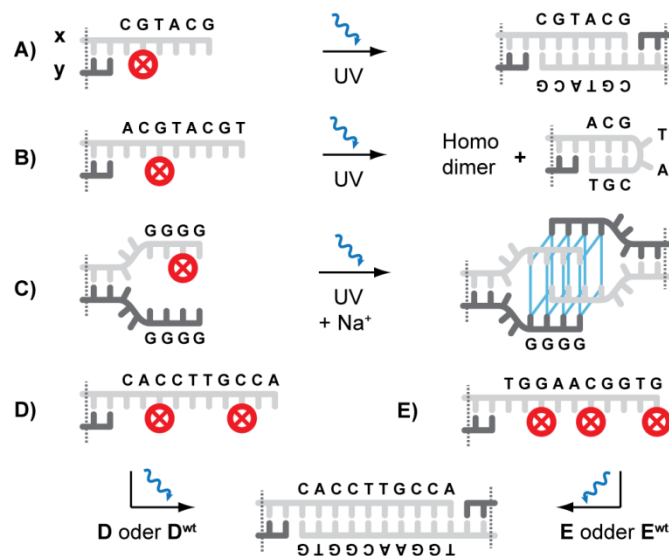


Abbildung 106: Verschiedene Designs für die Enden der Fortsätze der *minicircles* für die Lichtinduzierte Bildung von Dimeren. **A-C** hybridisiert nach Belichtung zu Homodimeren, **D** mit **E** zu Heterodimeren. **A** und **B** sind mit selbstkomplementären *sticky ends* ausgestattet; **C** hat zwei G-reiche Sequenzen, welche G-Quadruplexe ausbilden können. **D** und **E** besitzen komplementäre *sticky ends* von 10 nt Länge.

Des Weiteren wurden auch zwei komplementäre 10-mer-*sticky ends* entworfen, um eine noch stärkere Bindung zu erhalten und auch längere Sequenzen zu untersuchen (Abbildung 106 **D** und **E**). Zur Verstärkung des Effektes der *cages* sind diese Sequenzen mit zwei bzw. drei *cages* versehen worden. In verschiedenen Kombinationen dieser Ringe kann deren Dimerisierungsverhalten mit 2 *cages* (**D** + **E**^{wt}), 3 *cages* (**D**^{wt} + **E**), sowie mit 5 *cages* (**D** + **E**) vor und nach der Bestrahlung getestet werden.

Als *cages* wurden in diesen Studien die bewährten Schutzgruppen NPP (2-(2-nitrophenyl)-propyl) und NPE (1-(2-Nitrophenyl)ethyl) verwendet. Mit diesen Schutzgruppen lassen sich prinzipiell alle Nukleotide cagen; hier wurden dC^{NPE} und dG^{NPP} eingesetzt. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte aus den entsprechenden Phosphoramiditen nach etablierten Protokollen, welche bereits an anderer Stelle beschrieben wurden.²⁴³

Der Nachweis der Komplexbildungen sollte sowohl durch ein natives PAGE-Gel erbracht werden, als auch per AFM-Aufnahmen, die eine Auszählung der Einzerringe und der Komplexe erlauben.

3.9.3 Synthesen der *minicircles* und Bestrahlungsexperimente

Die Synthesen der gecageten Oligonukleotide und der *minicircles* sowie die Bestrahlungsexperimente wurden bereits an anderer Stelle²³⁰ beschrieben und sollen hier daher nicht mehr detailliert wiedergegeben werden.

Die *minicircles* wurden hybridisiert und über Anionenaustausch-HPLC aufgereinigt. Die Ringe **A**^{wt} und **B**^{wt} dürfen nicht ligiert werden, da nicht nur die *nicks*, welche Teil des Ringes sind, ligiert werden, sondern auch die Ringe untereinander über die *sticky ends*. Die dadurch entstehenden Dimere werden nicht mehr über die *sticky ends* zusammengehalten, sondern kovalent verknüpft. Darum können die Dimer-Ausbeuten dieser Experimente auch nicht mehr mit jenen nach der Bestrahlung der gecageten Ringe verglichen werden.

Cages auf den *sticky ends* konnten die Ligation zu Dimeren wirkungsvoll verhindern. Möglicherweise ließe sich die Blockierung der Ligation auch gezielt für Experimente nutzen, in denen nicht alle *nicks* ligiert werden sollen. So könnte z.B. ein sequenzieller Aufbau von Strukturen erreicht werden.

Für die Experimente mit zwei unterschiedlichen *minicircles* (**D** und **E**) wurden Aliquote der aufgereinigten Ringe erst in äquimolaren Verhältnissen gemischt und anschließend mit UV-Licht bestrahlt; Aliquote der anderen *minicircles* (**A-C**) wurden direkt bestrahlt. Nach Inkubation auf Eis wurden die verschiedenen Experimente entweder über native Gelelektrophorese (Abbildung 107 a und b) oder per AFM analysiert (Abbildung 107 c-f).

Die Analyse der vorläufigen Daten (Abbildung 107) zeigt einen klaren Effekt des *cages* in allen Experimenten. Im System **A** sind in Gelen und in den AFM-Bildern (Abbildung 107 c) nur dann

ausschließlich Monomere zu sehen, wenn das *sticky end* gecaget ist. In den entcageten und wt-Bahnen des Gels sind keine klaren Banden zu sehen. In den AFM-Bildern sind sowohl Monomere als auch Dimere zu sehen (Abbildung 107 d) Das spricht dafür, dass das Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren nicht eindeutig in eine Richtung verschoben ist und daher die Banden im Gel durch die ständige Assoziation und Dissoziation der *sticky ends* während der Elektrophorese verschmieren.

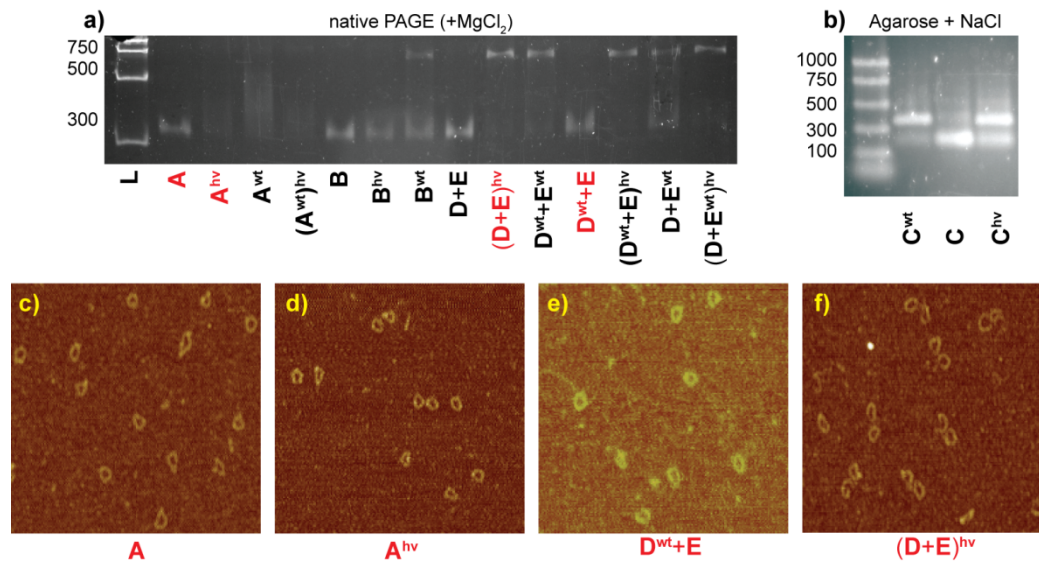


Abbildung 107 a) Native PAGE von gecageten, bestrahlten (*hv*) und Wildtyp (*wt*)-minicircles. b) Natives Agarosegel mit NaCl. c-f) AFM-Bilder von ausgewählten Experimenten (rot).

Beim Bestrahlen von A^{wt} ist wie beim Wildtyp keine eindeutige Bande zu sehen. Jedoch ist dieser Bahn noch weniger Material vorhanden, da bei allen Experimenten beim Bestrahlen (wahrscheinlich durch Adsorption an die Glasküvetten) substantiell Material verloren ging. In AFM-Bildern wurde wie erwartet keine Veränderung der Form und strukturellen Integrität der Ringe durch die UV-Bestrahlung bei 366 nm beobachtet, da DNA in diesem Bereich schließlich nicht absorbiert.

Im PAGE-Gel zeigen die bestrahlten Ringe **B** (B^{hv}) eine Monomerbande, die Wildtyp-Ringe hingegen sowohl eine Monomer- als auch eine Dimerbande. Dieser Unterschied ist möglicherweise kinetisch bedingt: Während B^{wt} langsam von 95°C abgekühlt wurde, fand die Bestrahlung bei Raumtemperatur statt. Bei hohen Temperaturen kann die Haarnadel-Struktur des selbstkomplementären *sticky ends* (siehe Abbildung 106) aufgeschmolzen werden und es bildet sich vermutlich (wenigstens teilweise) das thermodynamisch begünstigte Dimerprodukt. Bei der Bestrahlung bei Raumtemperatur bildet sich möglicherweise die kinetisch favorisierte Haarnadel und so kann keine Dimerisierung mehr erfolgen.

Bei den Experimenten mit den Ringen **D** und **E** verhinderten die *cages* auch meist die Dimerisierung. Allein im Experiment (**D** + **E^{wt}**) ist bereits eine schwache Dimerbande zu sehen. Das spricht dafür, dass 2 *cages* auf den gewählten 10 nt sticky ends eine Dimerisierung - bei den Temperaturen der nativen PAGE - nicht hinreichend unterbinden können, 3 *cages* hingegen zuverlässig.

Die Experimente mit Ring **C** erforderten zur Stabilisierung der G-Quadruplexe den Zusatz von NaCl zum Gel und Laufpuffer, daher wurde dieses System in einem separaten Agarosegel aufgetragen. Wieder zeigt der *cage* eine destabilisierende Wirkung auf die Dimere. Die Bande **C^{hv}** zeigt hingegen scheinbar einen leicht höheren Anteil an Monomeren als die Wildtyp-Bahn. Leider ist jedoch das Bild zu hell aufgenommen, so dass die Dimer-Bande von **C^{hv}** ausgebrannt ist und der wahre Anteil an Dimer möglicherweise deutlich höher liegt als aus der komplett weißen Bande erkennbar ist. In den AFM-Bildern jedenfalls war kein Unterschied zwischen einem Wildtyp- und einem bestrahlten Experiment zu sehen. Das spricht dafür, dass auch hier nach Bestrahlung die Dimerisierungseffizienz des Wildtyp-Systems erreicht wurde.

3.9.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die hier vorgestellten Experimente zeigen, dass gecagete Oligonukleotide genauso einfach wie ungecagete Oligonukleotide in größere Architekturen einzubauen sind. Nach unserem Wissen sind die gecageten *minicircles* bislang der größte selektiv gecagete DNA-Kontext. Auch hier konnten die *cages* eine Hybridisierung – sei es über Watson-Crick-Basenpaarungen, sei es über G-Quadruplex-Interaktionen – verhindern. Das Verhalten der entcageten Ringe ist außer im System **B** nicht von den Wildtyp-Ringen zu unterscheiden gewesen. Auch ist, wie erwartet, durch die Bestrahlung keine Veränderung der strukturellen Integrität der *minicircles* zu erkennen gewesen, so dass gecagete Oligonukleotide mutmaßlich im gesamten Feld der DNA-Nanotechnologie eingesetzt werden könnten.

So ist es beispielsweise denkbar, dass gecagete Oligonukleotide in DNA-Origami oder *tiles* eingebaut werden, um bestimmte Hybridisierungen – beispielsweise eine Dimerisierung der Strukturen – erst zu einem bestimmten Zeitpunkt durch Bestrahlung mit UV-Licht auszulösen. Das könnte von Vorteil sein, da diese Monomere zunächst aufgereinigt werden könnten und erst dann die Bildung von größeren Aggregaten induziert werden kann.

Bei den DNA-Motoren wie den Fußgängern von Seeman¹²⁶ oder der Spinne von Stojanovic^{129,246} könnten ein „Bein“ des Fußgängers oder bestimmte Oligonukleotide auf dem Pfad gecaget werden und so die Bewegung des Fußgängers durch Licht gestartet werden.

Durch die Verwendung von gecageten Oligonukleotiden im Bereich des DNA-*computings* und der logischen Gatter könnte Licht als Eingabesignal nutzbar gemacht werden.

3.10 DNA-Rotaxane

Rotaxane sind eine Klasse von mechanisch zusammengehaltenen Molekülen. Sie bestehen aus einem Ring oder Makrozyklus, der sich auf der Achse einer Hantel-artigen Einheit frei bewegen kann. Die Enden der Hantel sind Stopper, welche so beschaffen sind, dass der Mittelring nicht über die Stopper gleiten kann. Rotaxane gehören seit Jahrzehnten zu den bekanntesten Molekülen der makromolekularen Chemie.²⁴⁷ Durch externe Stimuli ist es möglich, die Mittelringe entsprechend designter Rotaxane zwischen zwei Zuständen hin und her zu schalten, so dass daraus sogar schon ein Speicher mit 160 kbit Speicherkapazität mit Speicherdichte von 10^{11} bits pro cm^2 hergestellt worden ist.²⁴⁸ Bis zu den diesen Arbeiten wurde noch kein Rotaxan aus DNA vorgestellt, was aber aufgrund der hervorragenden Eigenschaften von DNA als molekularem Baumaterial (siehe Abschnitt 1) erstrebenswert erschien. Design und die Synthese stammen maßgeblich von Dr. Damian Ackermann aus der Gruppe von Prof. Michael Famulok an der Universität Bonn entwickelt und sollen deshalb hier nicht in allen Einzelheiten dargestellt werden (siehe hierzu die kürzlich erschienene Publikation²⁴⁹). Der eigene Beitrag zu dem Projekt war hauptsächlich der Nachweis der Struktur mithilfe von hochauflösender Rasterkraftmikroskopie.

3.10.1 Ein Rotaxan mit ringförmigem Stopper

Ein Schlüsselschritt bei der Synthese von Rotaxanen ist das Einfädeln eines Makrozyklus auf eine lineare Stange, deren Enden anschließend durch sterisch anspruchsvolle Stopper mechanisch blockiert werden. Das Einfädeln sollte bei dem DNA-basierten Rotaxan über Watson-Crick-Basenpaarungen geschehen. Hierzu kam ein DNA-*minicircle* mit einer 13 nt langen Einzelstrangregion, wie er schon in einem vorausgegangenen Projekt entwickelt wurde,¹⁸⁷ zum Einsatz. Acht Nukleotide dieser Einzelstrangregion sind komplementär zu einer 8 nt langen Region auf der zentralen Mittelstange (siehe Abbildung 108). Durch Hybridisierung dieser Einzelstrangregionen fädelt sich der Ring auf die Stange auf. Daraufhin werden die Enden der Stangen über *sticky ends* mit Stoppern blockiert und anschließend ligiert. Der mittlere Ring bleibt dabei hybridisiert und daher wird so ein Komplex Pseudorotaxan genannt (siehe Abbildung 109 a).²⁵⁰ Die Pseudorotaxane konnten über native Agarosegel-Elektrophorese oder durch Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt und per AFM visualisiert werden (Abbildung 109 c). Auf den AFM-Bildern kann man an den Knicken der Stangen erkennen, dass die einzelsträngigen Regionen eine deutlich höhere Flexibilität besitzen als die doppelsträngigen Regionen. Durch Zugabe von Ablöse-Oligonukleotiden, die eine *toehold*-Strangverdrängung (siehe Abbildung 22) bewirken, wird der Ring von der Stange befreit und ein echtes Rotaxan erzeugt.

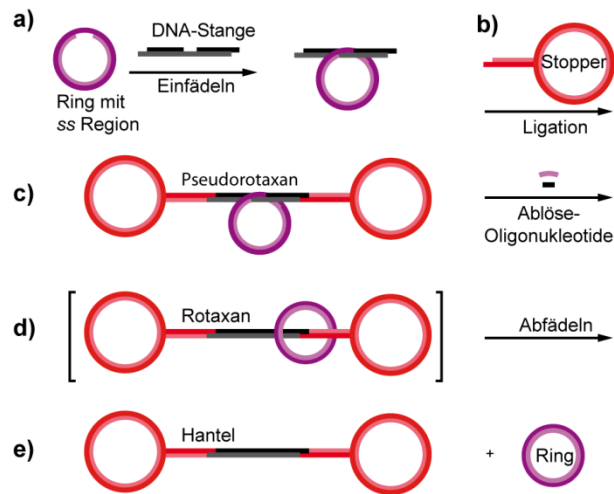


Abbildung 108: Schematische Darstellung Synthese und des Auseinanderfallens des Rotaxans mit ringförmigem Stopper. a) Ein DNA-minicircle mit einer Einzelstrangregion hybridisiert mit einer Einzelstrangregion einer DNA-Stange. b) Die Enden werden über sticky ends mit Stoppern blockiert und ligiert. c) Durch Zugabe der Ablöse-Oligonucleotide wird der mittlere Ring gelöst. d) Das Rotaxan fällt auseinander, indem sich der Ring über die Stopper schiebt und Hantel und Ring freigibt (e).

Um zu zeigen, dass die Zugabe der Ablöse-Oligonucleotide wirklich eine freie Beweglichkeit des Ringes auf der Stange ermöglicht, wurden der Ring und die Stange in einem Experiment mit einem Fluoreszenz-Quencher-Paar ausgestattet. Im hybridisierten Zustand waren Fluorophor und Quencher in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander angeordnet und damit die Fluoreszenz unterdrückt. Durch die Zugabe der Ablöse-Oligonucleotide wurde die Fluoreszenz innerhalb weniger Minuten wiederhergestellt, was die freie Beweglichkeit des Makrozyklus belegt (Daten hier nicht gezeigt). Agarosegel-elektrophoretische Experimente von Rotaxanen mit unterschiedlichen Ringgrößen nach Zugabe der Ablöse-Oligonucleotide zeigten, dass das nachfolgende Abfädeln des *minicircles* abhängig von der Größe des Ringes und der Größe der Stopper nur einige Minuten bis wenige Stunden dauert.

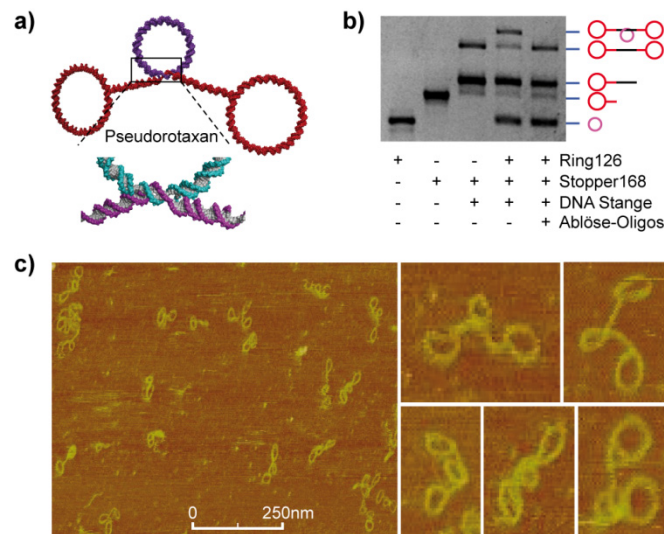


Abbildung 109 a) Ein Pseudorotaxan mit einfachem Stopper. Die Einzelstrangregionen der Mittelstange und des mittleren Ringes sind miteinander hybridisiert. b) Analytisches Agarosegel der unterschiedlichen Komponenten des 126/168 Rotaxans. Die letzte Bahn zeigt, dass die Zugabe der Ablöse-Oligonukleotide zum Zerfall des Rotaxans führte. c) AFM-Aufnahmen von aufgereinigten Pseudorotaxanen, rechts Ausschnitts-Vergrößerungen.

3.10.2 Ein [3]Rotaxan

Um die Machbarkeit des mehrfachen Einfädels zu überprüfen und damit evtl. auch die Stabilität der Rotaxane zu steigern, wurde ein weiteres Rotaxan entworfen, bei dem zwei Hanteln durch den Ring verlaufen (Abbildung 110). Ein solches Rotaxan wird nach der Anzahl der beteiligten Komponenten [3]Rotaxan genannt. Die Synthesestrategie war die gleiche wie bei den vorangegangenen Experimenten, nur dass der mittlere Ring zwei gegenüberliegende Einzelstrangregionen aufwies. Auch das Pseudo[3]Rotaxan konnte aufgereinigt und mit AFM abgebildet werden. Die Bilder (Abbildung 110 b) lassen die Stopper-Ringe und in manchen Fällen sogar den nur 128 bp kleinen zentralen Ring erkennen.

Nach Zugabe der Ablöse-Oligonukleotide zum Pseudo[3]Rotaxan lag die Lebensdauer des [3]Rotaxans immerhin schon bei mehreren Stunden. Beim Ausfädeln einer Hantel aus dem [3]Rotaxan entsteht ein [2]Rotaxan, welches wiederum zerfällt, und eine Hantel. Im Gel ist die Bande des intermediär auftretenden [2]Rotaxans (Abbildung 110 c, mittlere Bande) zu jedem Zeitpunkt schwächer ausgeprägt als die übrigen Banden, was belegt, dass das [2]Rotaxan schneller auseinanderfällt als das [3]Rotaxan.

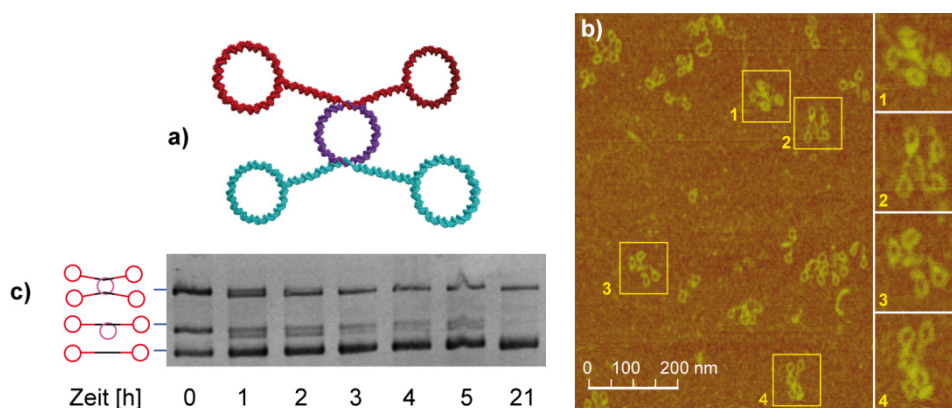


Abbildung 110 a) Modell eines Pseudo[3]Rotaxan. b) AFM-Bilder der aufgereinigten [3]Rotaxane. Die Vergrößerungen rechts lassen teilweise alle 5 Ringe erkennen. c) Ein Agarose Gel zeigt den Fortlauf des Auseinanderfallens des Pseudo[3]Rotaxans nach Zugabe der entsprechenden Ablöse-Oligonukleotide

3.10.3 Rotaxan mit sphärischem Stopper

Da auch das [3]Rotaxan nicht die erwünschte Langzeitstabilität zeigte, wurde ein Rotaxan mit alternativem Stopper entworfen. Über zwei Holliday-Kreuzungen wurden zwei doppelsträngige *minicircles* zu einer Sphäre verbunden (Abbildung 111 a), deren genaue Geometrie jedoch unbekannt ist. Bei einzelnen Holiday-Kreuzungen liegen die Winkel zwischen 40° und 60° und sind zudem sehr flexibel, doch lässt sich daraus nicht ableiten, wie sich zwei verbundene Kreuzungen in der sphärischen Anordnung zueinander verhalten. Der Anschaulichkeit halber sind die Winkel im Modell daher idealisiert mit 90° dargestellt.

Der Aufbau der sphärischen Stopper erfolgte aus 15 Oligonukleotiden in drei Schritten (Abbildung 111 b). Zunächst wurde eine Viertelsphäre, daran dann eine Halbsphäre und im letzten Schritt die vollständige Sphäre mit der Andockstelle für die Achse aufgebaut.

Eine entscheidende Verbesserung der Synthese gelang, als die die Ligationsprodukte der Zwischenschritte über Anionenaustausch-Chromatographie statt über ein Agarosegel aufgereinigt wurden, da so die Ausbeuten der Ligationen durch saubererer Edukte erheblich höher lag. Des Weiteren waren auf AFM-Bildern von über Elektroelution erhaltenen Rotaxanen häufig Fremdkörper und Rotaxan-Bruchstücke zu sehen, während die Bilder der säulenchromatographisch aufgereinigten Produkte deutlich weniger Fremdpartikel, dafür aber strukturell intakte Rotaxane enthielten. Für das Aufkonzentrieren wurden Membran-Mikrozentrifugations-Filter verwendet, da eine Ethanol-fällung die Strukturen beschädigte.

Der Zusammenbau der Rotaxane mit den sphärischen Stoppere folgte der gleichen Strategie wie bei den vorangegangenen Experimenten. Nach Zugabe der Ablöse-Oligonukleotide entstand ein Produkt mit einer gegenüber dem Pseudorotaxan leicht erhöhten gelelektrophoretischen Mobili-

tät (Abbildung 111 c). Diese Bande war über eine Woche stabil und auch die AFM-Aufnahmen, die erst Tage nach der Aufreinigung der Rotaxane entstanden sind, zeigten meist komplett zusammengesetzte Rotaxane (Abbildung 111 d und Abbildung 112).

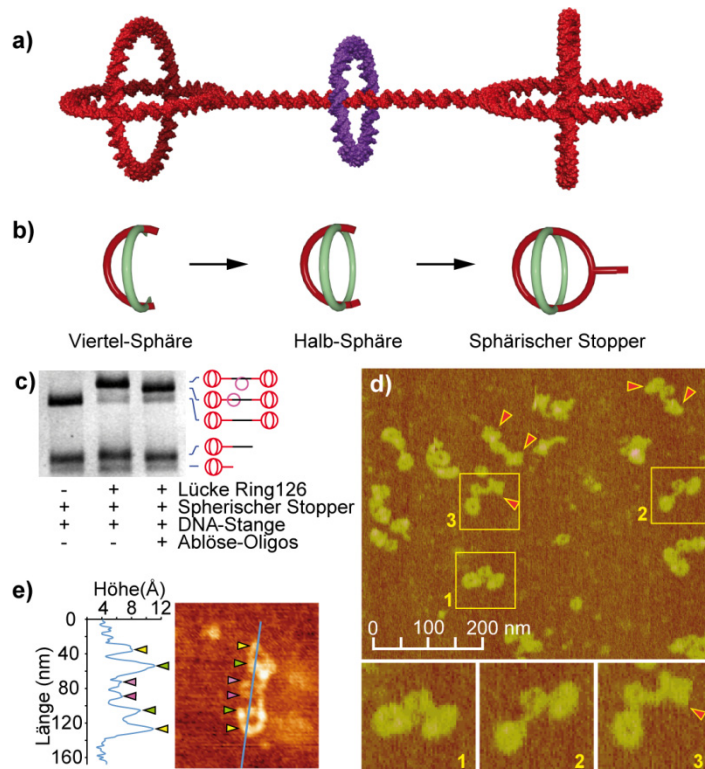


Abbildung 111 a) Modell eines Rotaxans mit sphärischen Stopperelementen (168 bp) und einem 126 bp Mittelring. b) Schrittweiser Aufbau der sphärischen Stopper. c) Analytisches Agarosegel (2%). Bahn 1: Hantel. Bahn 2: Pseudorotaxan. Bahn 3: Rotaxan nach Zugabe der Ablöse-Stränge. d) AFM-Bilder. Die Pfeile markieren Stopper, deren gekreuzte Natur zu erkennen ist. e) Höhenprofil eines Rotaxans

In den Vergrößerungen kann man klar erkennen, dass der Mittelring kleiner als die Stopper ist. Die genaue Form der Stopper ist jedoch nicht ohne weiteres aus den AFM-Experimenten zu ermitteln. Obwohl die Wechselwirkung von DNA mit der durch Polyornithin positivierten Glimmer Oberfläche so stark ist, dass sogar eine Stauchung von *minicircles* bei hohen Beladungen induziert werden kann (Abbildung 66), können nicht-planare Objekte wie die Sphäre beim Scannen von der Spitze offenbar etwas verschoben oder gestaucht werden und bleiben daher oft unscharf. Bei einigen Rotaxanen auf der Aufnahme in Abbildung 111 erscheinen manche Stopper zumindest kreuzförmig. Das Höhenprofil (Abbildung 111 e) zeigt, auch wenn die gekreuzten Stränge nicht zu sehen sind, eine höhere Höhe der Stopper im Vergleich zum mittleren Ring. In Abbildung 112 sieht man an der roten Farbe in den Stopper Regionen, dass die sphärischen Stopper höher sind als der Rest der Strukturen.

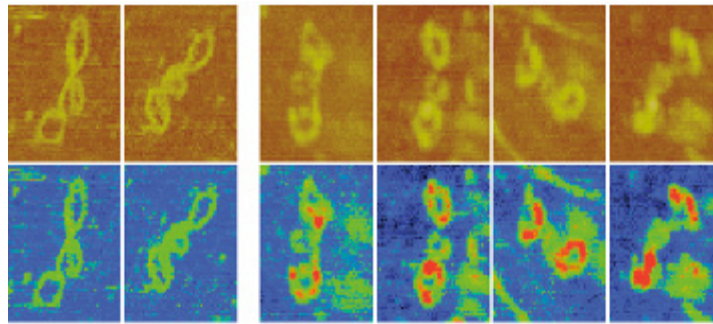


Abbildung 112: Vergleich der Höhenprofile von zwei 126/168 Pseudorotaxanen mit Ringstoppnern (Bilder links) und von vier Rotaxanen mit sphärischen Stoppnern (rechts). Die unteren Bilder zeigen die gleichen Ausschnitte wie oben, jedoch mit einer anderen Farbcodierung. Rot eingefärbte Bereiche sind am höchsten und nur bei den sphärischen Stoppnern zu finden.

Rotaxane könnten in Zukunft als Teil von molekularen Motoren oder einer anderen molekularen Maschine Verwendung finden. Des Weiteren ist denkbar, die mittleren Ringe – etwa durch Hybridisierung mit verschiedenen Regionen auf der Achse – als Schalter einzusetzen.

3.11 DNA-Superhelix

Ein weiteres Projekt basiert auf einzelsträngigen Ringen und wurde inspiriert von einer Arbeit aus der Gruppe von Simmel, in der ein über *rolling circle amplification* erzeugter Einzelstrang als Templat für die Anordnung von Gold-Nanopartikeln diente.²⁵¹ *Rolling circle amplification* (RCA) ist ein Prozess, bei dem periodische einzelsträngige DNA an einem zirkulären Templat erzeugt wird (Abbildung 113).

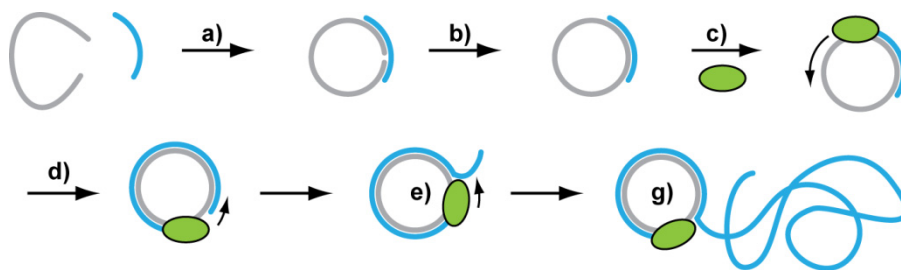


Abbildung 113: *Rolling circle amplification*. Ein Einzelstrang und ein Splint werden hybridisiert (a) und anschließend ligiert (b). c) Der Splint kann nun nach Zugabe einer Polymerase (z.B. $\Phi 29$ Polymerase) und dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate) als Primer für eine Replikation des zirkulären Templates dienen. d) Viele Polymerasen würden beim Erreichen des Primers die Replikation beenden, doch Polymerasen mit einer hohen Strangverdrängungs-Fähigkeit winden den Gegenstrang vom Templat ab (e). Dieser Prozess läuft immer weiter (g) und erzeugt hintereinander gehangene Kopien des minicircles mit Längen von vielen kbp Länge.

Es stellte sich die bei der Arbeit mit den *minicircles* die Frage, ob ein Doppelstrang auch dann noch linear auf einer Glimmer-Oberfläche zu liegen kommt, wenn er aus *A-tracts* besteht, oder ob die intrinsische Krümmung der *A-tracts* eine Art Spiralisierung induzieren würde (Abbildung 114 a). Und wenn eine Spiralisierung zu erkennen ist, könnte diese Spiralisierung stabilisiert werden, indem die Lagen der Spirale untereinander stabilisiert werden (Abbildung 116). Um diese Frage zu beantworten wurde ein *A-tract*-haltiger einzelsträngiger *minicircle* aus zwei 84-meren und zwei Splinten hergestellt und über denaturierende PAGE aufgereinigt. An diesem *minicircle* wurde eine *rolling circle amplification* durchgeführt und zu dem Amplifikat ein Überschuss an komplementären Strängen gegeben (Abbildung 115 a). Das Produkt wurde aufgereinigt, indem es einer kurzen Agarosegelelektrophorese unterzogen wurde, wobei der Überschuss an komplementären Einzelsträngen abgetrennt wurde (Abbildung 115b).

Die langen Doppelstränge drangen in der kurzen Elektrophorese nicht in das Gel ein und konnten vorsichtig aus der Tasche des Gels entnommen werden. Es verblieben nur die Einzelstränge im Gel (c).

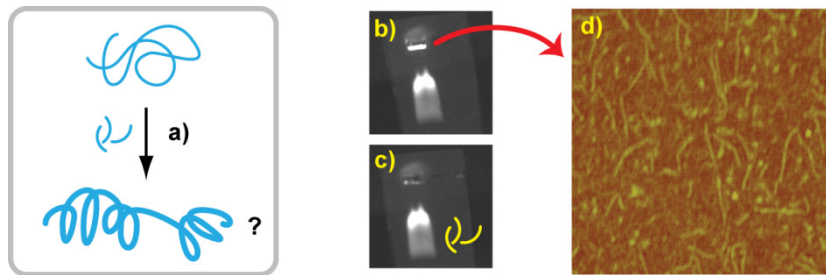


Abbildung 115 a) Diente ein A-tract-reicher minicircle als Templat für die rolling circle amplification, so könnten hypothetisch nach Zugabe der komplementären Einzelstränge (a) Doppelstränge entstehen, die durch die intrinsische Krümmung der A-tracts leicht vorspiralisiert vorliegen. b) Agarosegel des RCA-Amplifikates. c) Die lange Doppelstränge wurden aus der Tasche des Gels entnommen und eine AFM Aufnahme gemacht (Kantenlänge 500 nm).

Die AFM-Aufnahme der Produkte (Abbildung 115 d) Zeigte jedoch nicht wie erhofft einen Einfluss der intrinsischen Krümmung. Im Rückblick betrachtet wäre das Ergebnis wie in Abbildung 115 a) angenommen wegen der Persistenzlänge von DNA von nur etwa 150 bp auch nicht zu erwarten gewesen. Da schon eine einzige Umdrehung der Superhelix in dieser Größenordnung liegt, kann eine zweite Krümmung nicht mehr mit der ersten korreliert sein. Es ist jedoch nicht klar, wieso sehr viele kleine Bruchstücke auf dem AFM Bild zu sehen sind und wieso selbst die längsten Doppelstränge nur wenige 100 nm lang sind, obwohl per RCA eigentlich deutlich längere Stränge erzeugt werden sollten. Möglicherweise könnten durch eine Verringerung der Primer-Konzentration gegenüber den *minicircles* oder beider Konzentrationen gleichermaßen weniger, dafür aber längere Amplifikate erreicht werden.

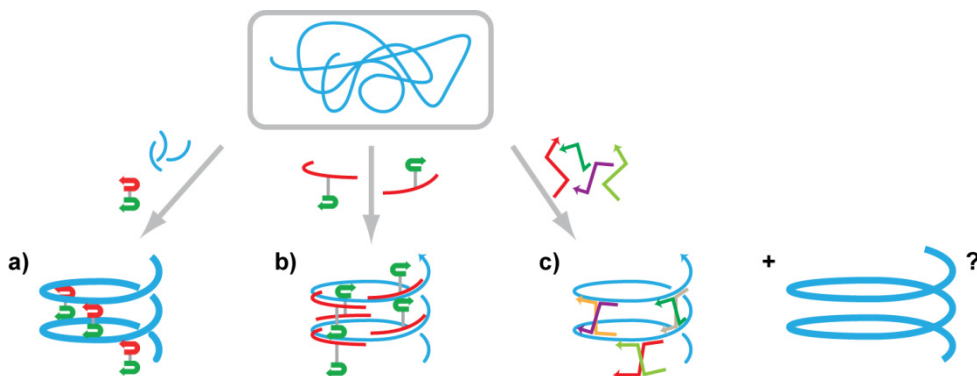


Abbildung 116: Verschiedene mögliche Arten der Stabilisierung einer Superhelix an einem langen Einzelstrang aus einer rolling circle amplification. a) Zugabe von komplementären Oligonukleotiden und Polyamid-Stütze. b) Zugabe von Polyamid-Anker-Oligonukleotiden und c) Zugabe von kurzen staple strands für parallele Kreuzungen. Neben den kleinstmöglichen Superhelices könnten auch Röhren mit mehrfachem Durchmesser entstehen.

Doch scheint es denkbar, die einzelnen Windungen der Spirale untereinander zu stabilisieren und so zu einer Art „Superhelix“ (die ja aus einer DNA-Doppelhelix besteht) zu gelangen. Zur Stabilisierung der Lagen kommen mehrere Strategien infrage (Abbildung 116). So könnte nach Zugabe von den komplementären Stücken (wie in Experiment aus Abbildung 115) ein Doppelstrang erzeugt werden. Wenn dieser Strang Bindestellen für die Polyamid-Stütze eingebaut hat, so könnte eine Zugabe der Stütze die Lagen untereinander verkleben (Abbildung 116 a). Da die Lagen Interaktion mit dem Polyamid-Anker noch robuster war, könnten stattdessen zum RCA-Amplifikat komplementäre Oligonukleotide mit einem Polyamid-Anker hinzugegeben werden (Abbildung 116 b).

Eine dritte Möglichkeit könnte ein Origami-artiger Ansatz sein. Wird das einzelsträngige RCA-Amplifikat als Gerüst-Strang verwendet, so könnte durch die Zugabe von passenden *staple strands* eine Faltung in eine Superhelix-Röhre erzwungen werden (Abbildung 116 c). Dieser Ansatz dürfte die kompaktesten und stabilsten Röhren liefern, da wie in Abbildung 79 zu sehen die Kreuzungen so beschaffen sind, dass es keinen nennenswerten Abstand zwischen zwei benachbarten Helices gibt. Da jedoch die Polarität des Gerüststranges nach jedem Umlauf in die gleiche Richtung zeigt wie die Nachbarwindungen, müssen die Stränge über parallele Kreuzungen und nicht über die in der Literatur fast ausschließlich verwendeten antiparallelen Kreuzungen verbunden werden (siehe Abbildung 17). Antiparallele Kreuzungen standen lange im Verdacht, nicht stabil zu sein, da sich entsprechende Kacheln nicht ausbildeten. Man vermutete, dass die Phosphatgruppen sich beim überkreuzen in die Quere kommen.⁸⁸ Doch konnte die Gruppe um William Sherman kürzlich zeigen, dass doppelte (also wenn ein Strang gleich zweimal die Helix wechselt) parallele Kreuzungen unter Beachtung von kinetischen Aspekten durchaus stabil sind. Aus solchen Kacheln mit parallelen Kreuzungen konnten sogar große 2D-Flächen aufgebaut werden.⁸⁹

Demnach sollte die Polarität der Kreuzungen keinen Hindernisgrund für die Superhelix sein. Dabei könnten sowohl doppelt gekreuzte Motive eingesetzt werden, als auch einfach gekreuzte Motive (half-crossovers, siehe Abschnitt 3.12.3). Der große Vorteil von einer Röhre mit einem einzigen Strang als Templat sollte wie bei DNA-Origami die Robustheit aus dem entropischen Vorteil sein.

Ein prinzipielles Problem, was sich bei allen drei Spiralen-Stabilisierungs-Strategien ergeben könnte, ist den Durchmesser der Spirale zu steuern. Aus der repetitiven Sequenz des RCA-Amplifikates ergibt sich eine Symmetrie, die auch die Bildung von Superhelices mit doppeltem (oder mehrfachem) Durchmesser erlaubt. Möglicherweise könnte die Größe durch die Zugabe von zirkulären „Keimen“, die die erste Windung der Superhelix templatisieren, gesteuert werden. Aus Zeitmangel und aufgrund der vorläufig nicht zufriedenstellenden Länge der RCM-Amplifikate wurde dieses Projekt vorläufig auf Eis gelegt.

3.12 Eine Röhre aus DNA-*minicircles* mit *staple strands*

In Kapitel 3.5 wurde der Versuch beschrieben, eine Röhre aus *minicircles* zu konstruieren, deren Lagen über Polyamid-Stützen miteinander verklebt werden sollten. Da Kreuzungen durch Einzelstränge eine festere und engere Packung der Ringe erlauben sollten, erschien dieser Ansatz erfolgversprechender (vgl. Abbildung 79).

Wurden im Projekt mit den Stützen erst doppelsträngige *minicircles* erzeugt, so empfiehlt sich für die Konstruktion mit gekreuzten Strängen die Synthese an einzelsträngigen *minicircles*. Angelehnt an die Nomenklatur aus dem DNA-Origami sollen diese *ss minicircles* als Gerüststränge, die überkreuzenden Stränge als *staple strands* bezeichnet werden. Bei der Anordnung der Gerüststränge hat man dabei zwei Möglichkeiten: Entweder sie werden mit paralleler Polarität des Rückgrates oder antiparallel übereinander gestapelt (Abbildung 117). Da es sowohl parallele als auch antiparallele Architekturen gibt,⁸⁹ sollten im Prinzip auch beide Arten von Röhren realisierbar sein.

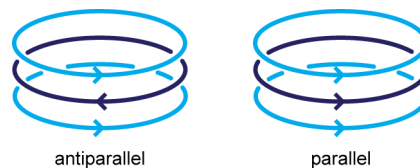


Abbildung 117: Röhre mit antiparallelen bzw. parallelen *ss minicircles* als Gerüststränge.

3.12.1 Entwurf von *staple strands*

Es wurden in diesem Projekt in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Koeppl und Simon Ahrens drei verschiedene antiparallele Entwürfe gemacht, da antiparallele Designs in der Literatur weiter verbreitet sind. Welche Möglichkeiten es zum Übereinanderstapeln der Doppelhelices und zum Austausch der *staple strands* gibt, soll Abbildung 118 illustrieren.

In a) wird einer von zwei identischen DNA Doppelsträngen, um 180° gedreht, so unter den anderen Strang gelegt, dass kleine Furche auf kleiner Furche zu liegen kommt. An den Berührungsstellen (umkreist) verlaufen die Stränge parallel. In diesem Falle ließen sich nur parallele Kreuzungen (vgl. auch Abbildung 17) realisieren. b) Der untere Strang wird etwas nach links verschoben. Jetzt gibt es nur noch zwischen den grauen Strängen direkt untereinander stehende Berührungsstellen. Die roten Stränge sind durch die unterschiedliche Weite der kleinen und großen Furche etwas versetzt angeordnet (gepunktet umkreist). Die Stränge verlaufen an den

Berührungspunkten antiparallel. c) Der untere Strang wird weiter verschoben, jetzt liegen die Berührungspunkte der roten Stränge untereinander und die der grauen Stränge sind versetzt. b) und c) sind identische Fälle, solange die Symmetrie nicht – etwa durch Krümmungen durch *A-tracts* – gebrochen ist. Tauschen jeweils nur rote oder graue Stränge aus, liegen gerade Anzahlen von halben Helixwindungen zwischen den Kreuzungspunkten (**E** in der Nomenklatur aus Abbildung 17), Tauschen auch Stränge der anderen Farbe aus, ist die Anzahl der halben Helixwindungen ungerade (**O**).

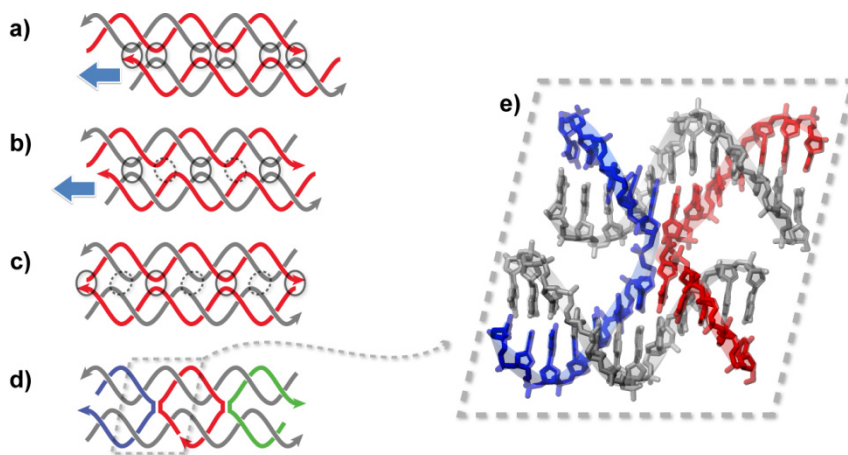


Abbildung 118 a-c) Generierung von möglichen Kreuzungspunkten bei zwei übereinander angeordneten Doppelhelices (Erläuterungen siehe Text). d) An zwei Berührungsstellen der roten Stränge in c) tauschen die Stränge zwischen den Helices aus. Dadurch entsteht ein antiparalleler double crossover (DAE). e) Atomar aufgelöstes Modell einer Kreuzung.

Aus dem Schema wird ersichtlich, dass gemischte Kreuzungen von Strängen unterschiedlicher Farbe geometrisch und damit energetisch leicht benachteiligt sind, doch können auch sie gebildet werden. Sie kommen beispielsweise auch in DNA-Origami vor, wo sowohl der Gerüststrang als auch die *staple strands* innerhalb einer Struktur zwischen den Ebenen austauschen (vgl. Abbildung 19).

In den Beispielen von Abbildung 118 könnte beispielsweise der A-reiche Strang grau sein, der T-reiche Strang rot. Soll nun ein *ss minicircle* als Templat dienen, müssen die roten Stränge durch *staple strands* ersetzt werden. Im DNA Origami gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, wie die *staple strands* verlaufen können. Die Bindestellen können unterschiedlich lang sein, ein *staple strand* kann 2, 3 oder sogar 4 unterschiedliche Lagen des Origami miteinander verbinden usw. Um die *staple strands* für die Röhre zu entwerfen, hat sich eine (in der Literatur so noch nicht verwendete) vereinfachte Schreibweise bewährt.

Ist erst einmal eine Sequenz der grauen *minicircle*-Stränge entworfen, so sind damit die Stellen der Abgänge (also der möglichen Kreuzungspunkte) und die Sequenz der *staple strands* festgelegt.

Die einzigen Freiheitsgrade, die noch bleiben, sind die Definition der Enden und genutzten Übergänge für die *staple strands*.

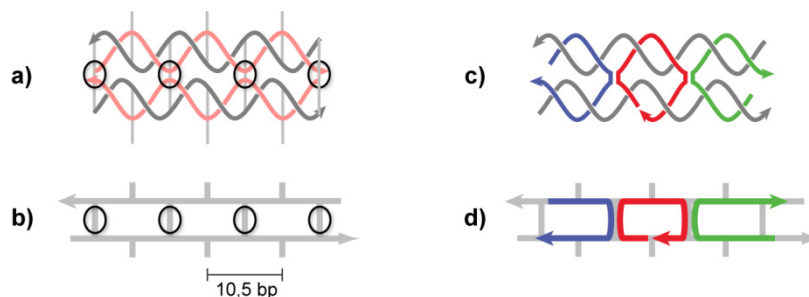


Abbildung 119 a) Dieselben beiden Stränge wie in Abbildung 118. Die Berührungspunkte und damit die möglichen Kreuzungspunkte der roten Stränge zur nächsten Ebene sind durch senkrechte Linien markiert. b) Vereinfachte Darstellung derselben Geometrie. Hier sind nur noch das Gerüst der grauen Stränge und die möglichen Kreuzungspunkte der Komplementärstränge zu sehen. c) Durch die Zugabe des blauen, roten und grünen Stranges entsteht ein double crossover d) Vereinfachte Schreibweise desselben double crossovers.

Abbildung 119 a) zeigt dieselben beiden Doppelstränge wie in Abbildung 118 c). Die möglichen Übergänge der roten Stränge sind mit senkrechten grauen Linien eingezeichnet. In der vereinfachten Darstellung (Abbildung 119 b) des Paares werden die roten Stränge verworfen und es bleibt nur noch das Gerüst der grauen Stränge übrig. Der Einfachheit halber werden die Gerüststränge als graue, gerade Pfeile gezeichnet, mögliche Übergänge nach oben und unten sind mit kurzen grauen Strichen angedeutet. Will man dieses beiden „Gerüststränge“ zu dem DAE *crossover* c) verbinden, so muss man die blauen, roten und grünen Stränge wie in hinzugeben. In Abbildung 119 d) ist derselbe Komplex in der vereinfachten Darstellung zu sehen. Der Vorteil der vereinfachten Schreibweise ist, dass man Muster der austauschenden Stränge leicht designen kann.

3.12.2 Design mit einem einzigen *A-tract*-haltigen *minicircle*

Im ersten Design sollte nur ein einziger *A-tract*-haltiger *minicircles* verwendet werden. Diesem Ansatz lag die Annahme zugrunde, dass analog zu den minimalistischen Designs von Mao^{96,252} oder Turberfields Tetraedern⁸⁶ eine geringe Anzahl von Komponenten zu hohen Ausbeuten führen könnte.

Um aus einem Typ von *minicircles* eine antiparallele Röhre aufbauen zu können, müssen benachbarte Lagen jeweils um 180° gedreht sein (Abbildung 120). Schneidet man die Röhre gewissermaßen auf und klappt sie auseinander, so ergibt sich ein ziegelmauerartiges Muster (b), welches

nun durch die *staple strands* so ausgefüllt werden muss, dass die komplette Fläche ohne Lücken ausgefüllt wird.

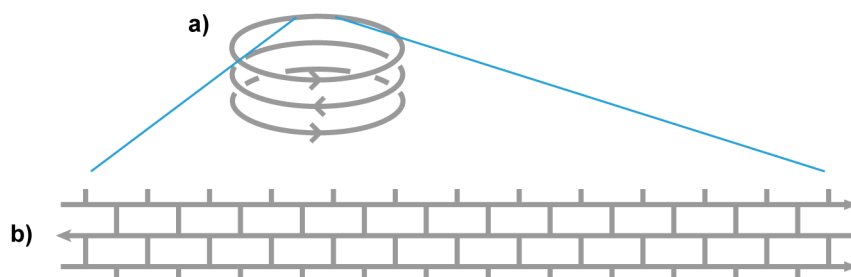


Abbildung 120 a) Erster Röhren-Entwurf mit nur einer Art von minicircles. b) Die Gerüststränge werden aufgeklappt in der vereinfachten Schreibweise (s.o.) dargestellt.

Um eine möglichst feste Verbindung der Ringe untereinander zu bewerkstelligen, sollten die *staple strands* jeweils drei Lagen miteinander verbinden. Eine der Möglichkeiten das Muster zu füllen, bieten S-förmige *staple strands* (Abbildung 121). Diese haben den Vorteil, dass die langen Mittelteile eine viel höhere Schmelztemperatur aufweisen als die kurzen Abschnitte und somit im Abkühlungsprozess ein schrittweiser Aufbau stattfinden sollte.

Aus Symmetriegründen kann eine Helixwindung jedoch nicht wie üblich 10,5 bp betragen, sondern muss 10,67 bp betragen. Damit entsprechen 3 Helixwindungen nicht mehr 31,5 bp, sondern 32 bp. So kann ein kurzer Arm eines S-förmigen *staple strands* aus 8 nt, das lange Mittelstück aus 16 nt bestehen. Diese Art von *staple strands* finden sich im Übrigen auch bei DNA-Origami, und auch hier wird die natürliche Gangweite der Helix leicht erweitert. Dies ist auch der Grund, warum zweidimensionales DNA-Origami nicht wirklich 2-dimensional, sondern leicht gekrümmt ist. Der DNA-Smileys oder das Rechteck sind demnach auch keine Scheiben sondern haben vermutlich eher eine Schüssel-Form (persönliche Kommunikation von Prof. John Reif und Niels Voigt).

Die S-förmigen *staple strands* sind in diesem Entwurf so angeordnet, dass jeweils 2 kurze Abschnitte auf einen langen Abschnitt folgen. Die Länge des Gerüst-Ringes muss demnach ein Vielfaches von 3 Helixwindungen lang sein um dieses Muster unterzubringen. Wir entschieden uns für eine Länge von 128 bp und einen *A-tract*-haltiges Design. Damit gab es 4 Kreuzungen in die eine, 4 Kreuzungen in die andere Richtung. Es stellte sich heraus, dass die Kreuzung in Darstellung Abbildung 122 a), die nach unten abgehen, genau in einem *A-tract* liegen. Da aber eine symmetrische Sequenz (bspw. A-A) keinen migrationsstabilen *crossover* ausbilden kann, mussten 4 der 12 *A-tracts* durch andere Sequenzen ersetzt werden (Abbildung 122 c). Die möglichen Kreuzungspunkte sind in der Sequenz durch horizontale Striche ober oder unterhalb des A-reichen Stranges angedeutet.

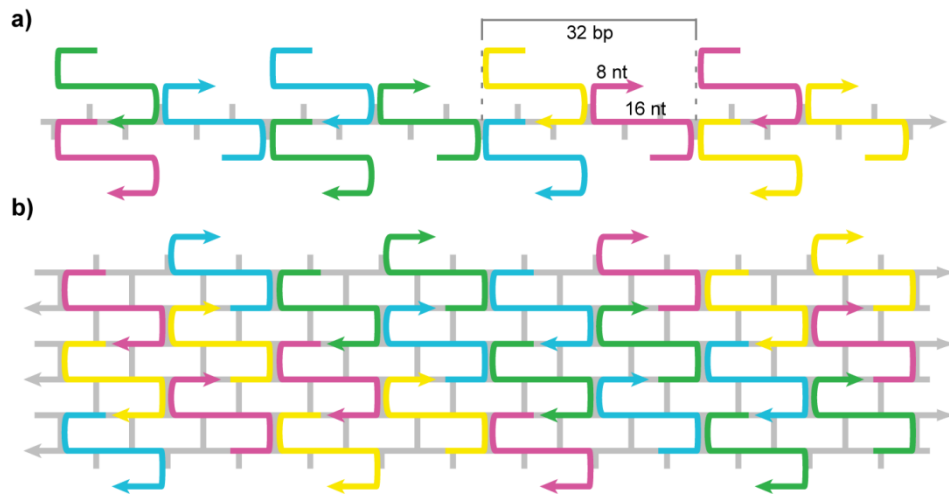


Abbildung 121: Erstes Design. a) Ein aufgeklappter Gerüststrang mit staple strands. b) Fläche, die eine aufgeklappte Röhre bilden würde.

Der Gerüststrang wurde im Sinne einer leichteren Oligonukleotid-Synthese in zwei 64 bp lange Stücke aufgeteilt (MK 75 und MK 76), die über zwei Splinte (MK 77 und MK 78) miteinander zu einem *ss minicircle* ligiert wurden. Die Splinte waren so designt, dass es grob drei Schmelztemperaturen gab, die für eine schrittweise Hybridisierung der Oligonukleotide sorgen sollten (vgl. Abbildung 50).

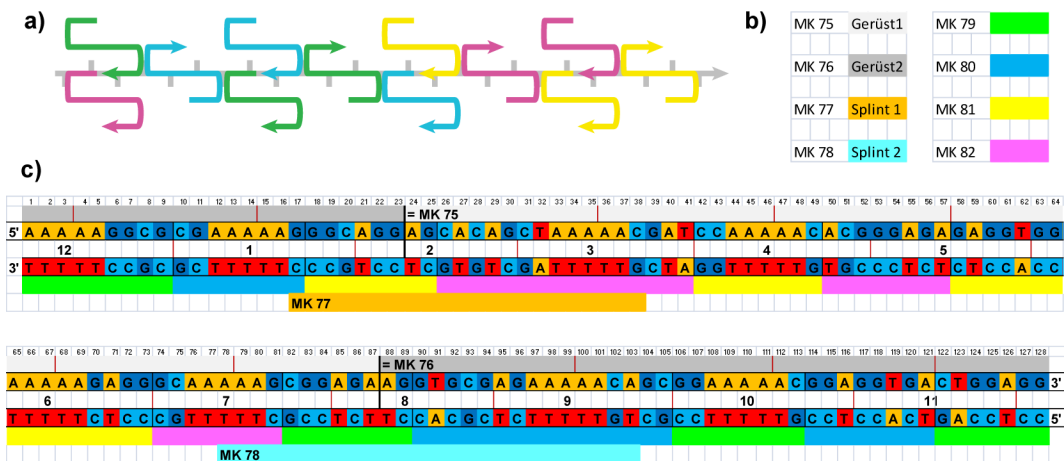


Abbildung 122: Sequenzdesign des ersten Entwurfes der Röhre. a) Schematische Darstellung eines Gerüststranges mit staple strands. b) Zuordnung des Farbcodes und c) Sequenzen. Die A-reichen Stränge gehören zum Gerüststrang, die T-reichen Stränge zu den staple strands (siehe Farbcode ober- bzw. unterhalb der Sequenzen).

Die Sequenzen zwischen den A-tracts wurden mit G-C reichen Sequenzen aufgefüllt, damit die Schmelztemperaturen der 8 nt kurzen Abschnitte der staple strands deutlich über Raumtempera-

tur zu liegen kamen. Die Nukleotide G und C wurden jedoch nicht gleichmäßig auf die beiden Stränge verteilt, sondern der A-reiche Strang war gleichzeitig G-reich, der T-reiche Strang gleichzeitig C-reich. Diese Asymmetrie sollte Sekundärstrukturbildung des Gerüststranges und der *staple strands* minimieren. Nach Beendigung der Arbeiten erfuhren wir, dass eine solche asymmetrische Basenverteilung auch im Labor von Prof. Shih bei einem Origami-Design implementiert worden ist. Es schien jedoch, dass zwar Sekundärstrukturbildung des Gerüststranges verhindert werden konnte, aber dennoch die Faltung von Origami schlechter gelang als mit einem Gerüststrang mit gleichmäßiger Verteilung der Basen (persönliche Kommunikation W. Shih).

Die Synthese des *ss minicircle* war problemlos möglich, eine Synthese von Röhren gelang jedoch nicht. Dabei wurden mehrere Versuche unternommen, in denen die stöchiometrischen Verhältnisse von *staple strands* zu Gerüststrang (von 1:1 bis 10:1) verändert wurden und kurze (1 h) bis sehr lange (1 Woche) Temperaturgradienten gefahren wurden. Doch auf keinen der angefertigten AFM Aufnahmen waren röhrenartige Gebilde zu sehen. Stattdessen schienen die Ringe wie in der Aufnahme in Abbildung 123 a) kollabiert vorzuliegen.

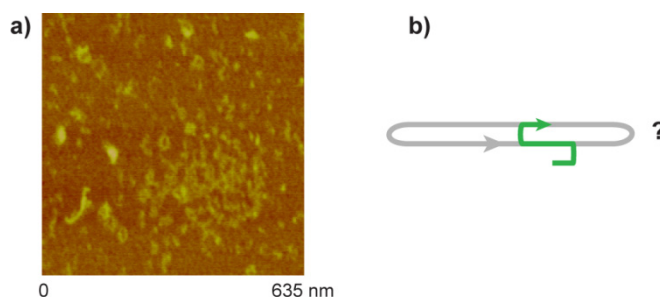


Abbildung 123 a) AFM-Aufnahme eines Röhren-Synthese-Versuches des ersten Designs. b) Hypothetische Struktur eines kollabierten Ringes.

Auch ein natives Agarosegel zeigte keine großen Komplexe, sondern nur eine breite, verschmierte Bande oberhalb des einzelsträngigen Ringes. Ein möglicher Grund für das Scheitern der Synthesen könnte eine intramolekulare Bindung von zwei Abschnitten eines *staple strands* an denselben Ring sein (Abbildung 123 b). Diese Möglichkeit wurde beim Design nicht bedacht. Daher sollte das Design dahingehend verbessert werden, dass nicht mehr nur ein *ss minicircle* als Templat dienen sollte, sondern zwei verschiedene.

3.12.3 Eine *half crossover*-Röhre

Das zweite Design sollte gegenüber dem oben beschriebenen Entwurf in mehreren Punkten abweichen. Erstens sollten, wie erwähnt zwei *ss minicircle* als Templat dienen. Zweitens sollten

keine *A-tracts* mehr verwendet werden, da diese ebenfalls eine mögliche Fehlerquelle sein könnten. Ringe mit einer Länge von 128 bp sind auch ohne *A-tracts* zu erzeugen,^{184,253} doch ist dabei „oben“ und „unten“ in den Tori nicht mehr definiert. Es wurde aber angenommen, dass, angetrieben durch die Ausbildung der Kreuzungen, die gewünschte Rotation der Tori erreicht werden kann. Auch sollten alle 4 Basen annähernd gleichmäßig verteilt sein.

Des Weiteren sollte eine andere Art von Kreuzungen ausgetestet werden, die *half crossovers* (HX, halbe Kreuzungen, Abbildung 124). Bei dieser von Peng Yin entwickelten Art von Kreuzung tauschen nicht zwei Stränge an einem Kreuzungspunkt aus, sondern nur noch einer.¹⁰⁸ Und als letzte Änderung sollten jeweils nur noch zwei Lagen der Röhre von einem *staple strand* miteinander verbunden werden, da sonst wieder die Möglichkeit besteht, dass ein *staple strand* an zwei Stellen an einen *ss minicircle* bindet (Abbildung 123 b).

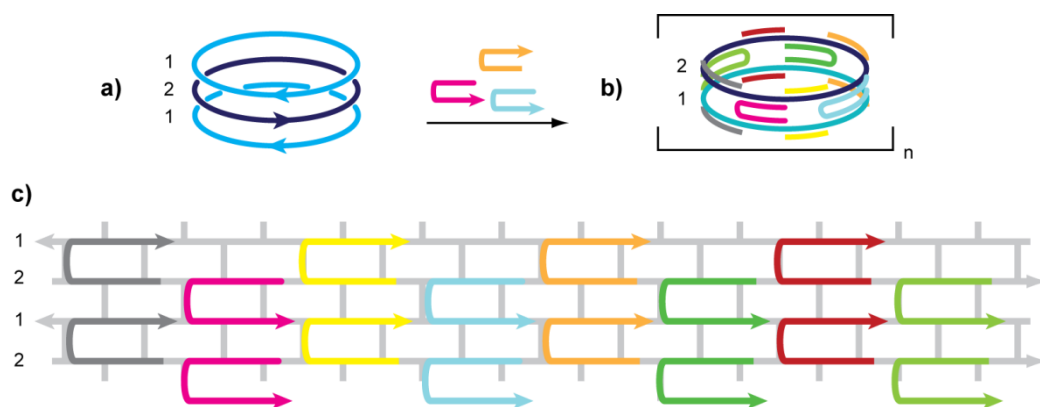


Abbildung 124: Design der half crossover-Röhre. a) Es werden zwei verschiedene Gerüst-minicircles (1 und 2) in antiparalleler Ausrichtung verwendet. b) Nur ein staple strand tauscht an den Kreuzungspunkten aus. c) Staple strand-Design in der vereinfachten Schreibweise.

Zum Zeitpunkt dieses Projektes erwogen wir einen Wechsel des Oligonukleotid-Anbieters. Laut Angaben von Sigma-Aldrich sollte auch eine Synthese eines 128-mers standardmäßig möglich sein und darum bestellten wir die beiden Stränge für die Gerüst-minicircles von diesem Anbieter. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Splint-Ligationen zu den *minicircles* kaum messbare Ausbeuten lieferten. Eine Qualitätskontrolle der Oligonukleotide per denaturierender PAGE und Anionenaustausch-Chromatographie führte zu der Erkenntnis, dass ein großer Anteil an Abbruchfragmenten trotz der bestellten HPLC-Aufreinigung mitgeliefert worden war. Selbst eine Nachlieferung war von nur wenig besserer Qualität und musste nachgereinigt werden, um zu nennenswerten Mengen an *ss minicircles* zu gelangen (siehe auch Diskussion in Abschnitten 3.1.3 und 3.1.9.4).

Zur Synthese der Röhren wurden äquimolare Mengen der *ss minicircles* und der *staples* in TEAMg-Puffer (siehe Kapitel 4.12.4) über einen Zeitraum von ca. 1 Woche von 95°C auf Raumtempera-

tur abgekühlt. Doch die AFM-Aufnahmen zeigten wiederum keine Röhren sondern nur nicht definierbare Bruchstücke von uneinheitlichen Größen bis etwa 30 nm (Abbildung 125).

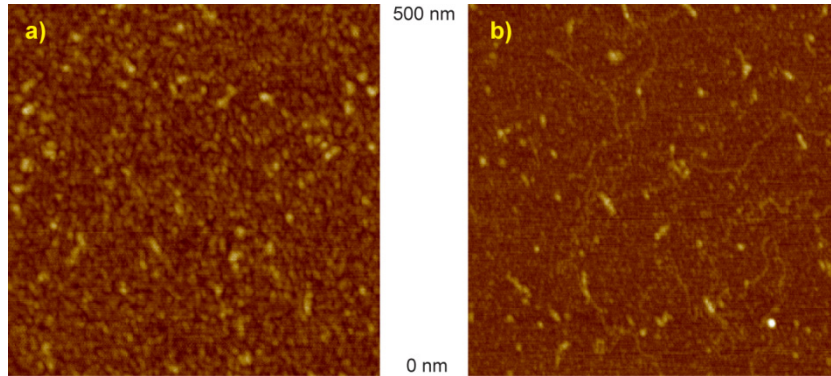


Abbildung 125: AFM-Aufnahmen einer *half crossover*-Röhren Synthese. a) unverdünnte Lösung der Hybridisierungsreaktion. b) Verdünnung.

Trotz langer Diskussion aller Beteiligten ist der Grund für das Scheitern dieser Synthese nicht klar. Möglicherweise ist die gewählte Ringgröße von 128 bp zu klein, und die gebildeten Architekturen daher zu gespannt, um eine stabile Röhre ausbilden zu können. Dagegen spricht jedoch, dass wie oben erwähnt sogar deutlich kleinere Ringe darstellbar sind.^{184,253} Zudem sollten die 8 – labilen - *half crossovers* pro Ring die Struktur zusätzlich entspannen. Und schließlich lassen auch die kleinen Radien in Histonen (Abbildung 13 B) oder die stark gekrümmten 3D-Origami-Strukturen von Hendrik Dietz¹⁰¹ mit Radien von bis zu nur 6 nm die Krümmung als Ursache für das Scheitern unwahrscheinlich erscheinen.

Ein Einwand von Prof. Seeman legt nahe, dass ein schrittweiser Aufbau der Architekturen von Vorteil sei (persönliche Kommunikation). Demnach sei auch beim Aufbau von 2-D Kristallen aus *tiles* darauf zu achten, dass im Laufe des Abkühlungsprozesses sich erst die individuellen Kacheln bilden, bevor diese über *sticky ends* Flächen ausbilden. Ein ähnlicher Gedanke für einen schrittweisen Aufbau von Strukturen ist für den Aufbau von *minicircles* oben (Abbildung 50) diskutiert worden. Aber auch wenn sich Strukturen mit nicht getrennten Schmelzpunkten nicht sauber bilden, so sollten sie doch wenigstens in einer unspezifischen Art und Weise multimerisieren. Hierfür liefern jedoch die AFM-Bilder (Abbildung 125) keinen Hinweis. Doch die Publikationen von Mao und Yin^{184,253} zeigen deutlich, dass auch Architekturen ohne klar definierte Intermediate aufgebaut werden können.

3.12.4 Ausblick

Um das Projekt doch noch zum Erfolg zu führen, könnten eine Reihe von Folgeexperimenten angeschlossen werden. Zunächst könnten die Sequenzen der Gerüststränge jeweils in zwei Teile geteilt werden und mit je einem zusätzlichen Splint die Synthese der *ss minicircles* wiederholt werden. So wäre auszuschließen, dass die zweifelhafte Qualität der Gerüst-Oligonukleotide für das Scheitern der Synthese verantwortlich ist.

Dann könnten zunächst nur zwei *minicircles* miteinander verbunden werden. Dies könnte gelingen, indem den beiden Gerüst-*minicircles* nur jene *staple strands* hinzugefügt werden, die beispielsweise von Ring 1 nach oben abgehen (Abbildung 124 rot, blau, dunkelgrün und hellgrün). Diese Dimere sollten in nativen Gelen eine klar definierte Bande ergeben. In parallelen Experimenten könnte auch untersucht werden, ob schon bei vier *staple strands* wie bei DNA-Origami eine Toleranz von Überschüssen von *staple strands* zu beobachten ist. Diese sandwichartigen Komplexe könnten auch per AFM abgebildet werden.

Ein weiterer Parameter der geändert werden könnte ist das Design der *staple strands*. Verkürzt man wie in Abbildung 126 eine Seite die Bindestelle für einen der beiden Stränge jeweils von 1,5 auf 0,5 Helixwindungen (5 nt), so sollten zunächst die langen Abschnitte der *staple strands* an die Ringe binden. Die kurzen Abschnitte sind so schwach, dass ihre Schmelztemperaturen einzeln unter der Raumtemperatur liegen dürften, jedoch 6 von den kurzen Abschnitten möglicherweise stark genug sind, um die Röhre kooperativ zusammenzuhalten. Eine solche Kooperativität nutzte im Übrigen auch Seeman aus, um mit nur 2 nt langen sticky ends einen 3D-Kristall zusammenzusetzen.⁸³ Sollte sich diese Verbindung als zu schwach erweisen, könnten alternativ 1,5 und 2,5 Helixwindungen lange Abschnitte verwendet werden.

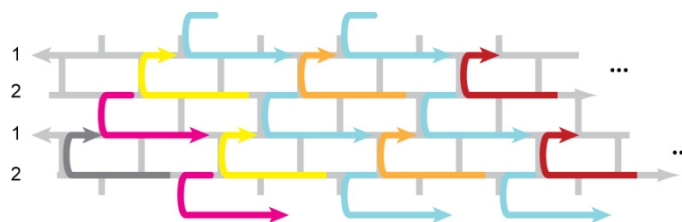


Abbildung 126: Vorschlag für eine half crossover-Röhre mit asymmetrischen staple strands.

Trotz aller Schwierigkeiten erscheint dieses Projekt immer noch vielversprechend. Im Gegensatz zu allen bekannten Röhren in der Literatur wäre ein System mit den hier vorgeschlagenen *ss minicircles* als Templat der erste Röhren-Ansatz, bei dem die Helixachsen ausschließlich quer zur Achse der Röhre und nicht parallel verlaufen (Röhren aus dem Labor von H. Sleiman sind Systeme mit gemischten Achsenrichtungen²⁵⁴⁻²⁵⁶). Dieser Unterschied könnte diesen Röhren eine höhere Stabilität gegenüber Druckbelastung senkrecht zur Röhrenachse geben. Wenn Analogien

aus der makroskopischen Welt auch in diesem Fall greifen, so entsprächen diese Röhren den PVC-Röhren mit Querrillen, wie sie im Bau zur Verlegung von Kabelkanälen benutzt werden. Dafür würde die Persistenzlänge dieser Röhren geringer ausfallen als beispielsweise *6-helix-bundles*¹⁰⁵ und starke Krümmungen ermöglichen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Darstellung und Aufreinigung der DNA-*minicircles*

Kinasierung

Die Kinasierung von 100-200 pmol unphosphorylierten Oligonukleotiden erfolgte in 50 oder 100 µl-Ansätzen nach dem Protokoll des Herstellers mit 2 µl Kinase. Abweichend vom Standard-Kinase-Protokoll kann die Kinasierung ohne nennenswerten Aktivitätsverlust auch in Ligase-Puffer durchgeführt werden.

Die Kinasierung mit ³²P-ATP ist wie an anderer Stelle beschrieben durchgeführt.^{199,187}

Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurden alle beteiligten Stränge in Hybridisierungspuffer (s.u.) zusammen gegeben und für 5 min auf 95°C geheizt. Anschließend wurde der Heizblock ausgeschaltet und nach ca. 60-90 min war Raumtemperatur erreicht. Eine langsamere Hybridisierung kann in PCR-Hybridisierungsöfen programmiert werden.

Ligation

Zur Ligation wurden typischerweise 200 pmol der zu ligierenden Oligonukleotide gemeinsam in 90 µl Hybridisierungspuffer hybridisiert. Anschließend wurden 10 µl 10x Ligase-Puffer und 2-4 µl Ligase hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert.

Exonuklease-Verdau

Nach der Ligation wurden die *ds minicircles* aus Ethanol ausgefällt oder über ein PCR-Isolationskit aufgereinigt. Die Ringe wurden in 25 µl Wasser gelöst und mit 25 µl des beigefügten 2x *BAL-31*-Exonuklease-Puffers und 2 µl *BAL-31*-Exonuklease versetzt. Die Reaktion wurde 1 h bei 30°C inkubiert und mit einem PCR Isolationskit aufgereinigt.

Splint-Ligation und Synthese einzelsträngiger Ringe:

200 pmol der zu ligierenden Oligonukleotide und 300 pmol des entsprechenden Splints wurden in 90 µl Hybridisierungspuffer hybridisiert und anschließend ligiert. Die Ligationsprodukte wurden über denaturierende PAGE aufgereinigt und die Banden per UV-Shadowing visualisiert,

markiert, ausgeschnitten und in Elutionspuffer über Nacht bei RT eluiert. Die entsprechenden Produkte wurden mit NaOAc aus Ethanol gefällt, wieder aufgelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Je nach Reaktion konnten nach Aufreinigung bis zu 30 % Ausbeute erzielt werden.

Native PAGE

Native Gele (und die entsprechenden Laufpuffer) enthalten zusätzlich zum typischerweise verwendeten TBE-Puffer in der Regel Salze, welche die Hybridisierungen der DNA stabilisieren und intakt lassen. Als Salzzusatz hat sich 12,5 mM Magnesiumacetat bewährt. Magnesiumchlorid ist prinzipiell auch geeignet, hat aber den Nachteil, dass bei der Elektrophorese geringe Mengen Chlorgas an der Anode entsteht, was sich durch einen unangenehmen Geruch beim Öffnen der Elektrophorese-Apparatur bemerkbar macht. Native PAGE wurde in der Regel bei 4°C durchgeführt. Dafür hat es sich als praktikabel erwiesen, die Gelkammer und den Puffer in einem Kühlschrank vorzukühlen und die Stromanschlüsse durch die Gummiabdichtung der Kühlschranktür nach außen zum Netzteil zu legen. Bei nativer PAGE muss darauf geachtet werden, dass die Spannung (und damit die elektrische Leistung) so niedrig gewählt wird, dass sich das Gel nicht nennenswert erwärmt. Eine Leistung von max. 8-10 W für vertikale Gelsysteme und etwa 5 W für ein kleines analytisches Agarosegel sollte dabei bei Proben mit geringem Schmelzpunkt nicht überschritten werden. Ohne einen merklichen Verlust in der Auflösung durch Diffusion der Probe befürchten zu müssen, können auch deutlich darunter liegende Spannungen angelegt werden und die Elektrophorese über Nacht betrieben werden.

In Gelen zur präparativen Aufreinigung mit Stoffmengen von über ca. 30 pmol für Einzelstränge und ca. 5 pmol für *minicircles* hat es sich als hilfreich erwiesen, zusätzlich zu den präparativen Bahnen jeweils eine zusätzliche Bahn mit etwa 10-50-fach niedrigeren Stoffmengen aufzutragen. Nur aus diesen analytischen Bahnen kann, wegen des internen Quenchens der Fluoreszenz bei hohen Konzentrationen (Abbildung 45 d), die Qualität der Probe ermittelt werden.

Für *minicircle*-Synthesen wurden meist 5-prozentige PAGE-Gele verwendet.

natives Acryamid-Gel (5 %, 50 ml)

6.25 ml Acrylamid/ Bisacrylamid (40%, 19:1)

10 ml 5 × TBE

550 µl 1M MgCl₂ oder MgOAc₂

evtl. 500 µl Glycerin

H₂O *ad* 50 ml

400 µl (10 Gew %) APS

30 µl TEMED

Es wurde zwar meist ein Acrylamid/ Bisacrylamid- Verhältnis von 19:1 verwendet, doch könnte ein Verhältnis von 39:1 bei der Analyse von Komplexen über der Größe von *minicircles* von Vorteil sein, da bei diesen Gelen die elektrophoretische Mobilität von Banden mutmaßlich höher ist.

Denaturierende PAGE

Die Durchführung einer denaturierenden PAGE ermöglicht die Auftrennung von DNA unter Trennung aller doppelsträngigen Bereiche durch Brechen der Watson-Crick-Basenpaarungen. Dazu wurden meist 5-prozentige Acrylamid-Gele mit 6 M Harnstoff verwendet.

Die gesamte Gelkammer mit Laufpuffer ($1 \times$ TBE) wurde vor dem Auftragen der Proben etwa 2 h bei 45-50°C in einem Trockenschrank vorgewärmt. Die Elektrophorese fand bei 50°C bei 10-15 W Leistung statt.

denaturierendes Acrylamid-Gel (5 %, 50 mL)

6.25 mL Acrylamid/ Bisacrylamid (40%, 19:1)

10 mL $5 \times$ TBE

18.2 g Harnstoff

evtl. 500 μ L Glycerin

H₂O *ad* 50 mL

400 μ L (10 Gew %) APS

30 μ L TEMED

Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese kann ebenfalls eine Auftrennung und Nachweis von DNA unter Erhalt der Watson-Crick-Basenpaarungen erzielt werden. Für das Agarose-Gel (meist 2 % oder 2,5 %) wurde 1 g Agarose in 50 mL $0.5 \times$ TBE-Puffer mit 10 mM MgOAc₂ und evtl. 50 mM NaCl (für G-Quadruplex-Interaktionen) gelöst und kurz aufgeköcht, bis auf etwa 50°C abgekühlt und das Gel gegossen. Vor dem Gießen kann evtl. Ethidiumbromid zugesetzt werden (möglicherweise krebserregend, Sicherheitsbestimmungen beachten!). Ethidiumbromid hat bei Agarosegelen gegenüber dem Fluoreszenz-Färben nach der Elektrophorese (*post-staining*) den Vorteil, dass sofort abgebildet werden kann. Durch die größeren Poren der Agarose-Gele gegenüber den PAGE-Gelen ist die Diffusion der Banden bei Agarose-Gelen viel schneller und daher werden die Banden schnell unscharf.

Nach Zugabe von Laufpuffer ($0.5 \times$ TBE mit 10 mM MgOAc₂ und/oder 50 mM NaCl), Auftragen des DNA-Standards und der mit 10 μ L nativen Ladepuffer versetzten Proben in die Gel-taschen fand die Elektrophorese bei 4°C mit 5-6 W Leistung statt.

Post-staining

Zur Visualisierung der Banden in PAGE- oder Agarosegelen durch das Geldokumentationssystem wurde das Gel in ca. 50 ml Laufpuffer mit 5 µl SYBR®Gold (oder Sybr®Green, welches ein nur geringfügig schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis zeigte) versetzt und 20 Minuten unter langsamem Schütteln in einer flachen Plastischale inkubiert.

Für die Ablichtung mit einem Geldokumentationsgerät sollte mit 312 nm bestrahlt werden, da bei dieser Wellenlänge das Signal-Rausch-Verhältnis besser ist als bei 365 nm. Dies gilt insbesondere bei der Ablichtung von Agarosegelen.

Diffusionsgetriebene Elution aus Gelen

Die aus Gelen ausgeschnittenen Banden wurden mit mindestens dem 3-fachen Volumen Elutionspuffer überschichtet und ca. 14 h bei Raumtemperatur ohne Schütteln per Diffusion eluiert, wenn die Probe per AFM visualisiert werden sollte. Andere Ligationsprodukte oder ss Ringe können auch für 2 h bei 55°C unter Schütteln eluiert werden. Anschließend wurde per Ethanol-fällung oder Membranmikrozentrifugation aufkonzentriert.

Elektroelution

Für eine Elektroelution wurde die ausgeschnittene Bande in einer Elektroelutionskammer zwischen zwei beigefügten Membranen in Puffer (TBE + 12,5 mM MgCl₂) eingelegt. Es wurden 2 h lang 150-200 V angelegt, dann für 20 Sek. die Spannung umgekehrt und aus der Elutionskammer der Puffer mit dem eluierten Produkt entnommen und ethanolgefällt.

Butanolextraktion

Ein Volumen einer wässrigen Lösung wurde mit 1-2 Volumen n-Butanol überschichtet und sorgfältig durchmischt. Die Phasen wurden durch kurze Zentrifugation in einer Tischzentrifuge getrennt und die organische Phase verworfen. Bei Bedarf kann diese Prozedur mehrmals wiederholt werden. Durch Butanolextraktion können organische Verunreinigungen entfernt und das Volumen der wässrigen Lösung auf einen Bruchteil des anfänglichen Volumens eingengt werden, wobei Salze in der wässrigen Phase aufkonzentriert werden.

Ethanol-fällung

1 Volumen einer wässrigen, DNA-haltigen Lösung wurden mit 1/10 Vol 3 M NaOAc oder mit 1 Vol 6 M NH₄OAc versetzt und gut durchmischt. Zu dem neuen Gesamtvolumen wurden 3 Volumen abs. Ethanol gegeben, sorgfältig durchmischt und mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine deutlich längere Inkubation oder eine Inkubation bei -25°C konnten die Ausbeute in parallel durchgeführten Experimenten nicht messbar steigern. Die Lösung wurde dann bei 14.000 g für 30 min zentrifugiert und die ethanolhaltige Lösung verworfen. Das am

Boden des Schnappdeckel-Gefäßes befindliche Pellet kann noch einmal mit ca. 100 µl 75-prozentigem Ethanol gewaschen werden, wenn Salzreste im folgenden Schritt stören.

PCR-Isolations-Kits

PCR-Isolationskits wurden nach den Protokollen der Hersteller benützt. Es war kein signifikanter Unterschied in der isolierten Stoffmenge gegenüber Ethanol-fällung oder im Vergleich von Isolationskits von unterschiedlichen Herstellern festzustellen.

Membran-Mikrozentrifugation

Die Membran-Mikrozentrifugationssäulchen (Amicon) der Firma Millipore wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurden bis 500 µl einer Lösung (meist nach Anionenaustausch-Chromatographie) 10 min bei 14.000 g zentrifugiert, und die verbleibende Lösung 1-2 weitere Male mit jeweils 50 µl TEAMg-Puffer gespült und zentrifugiert. Die verbleibende Lösung kann ohne weitere Behandlung für AFM-Aufnahmen oder weitere Experimente eingesetzt werden. Die Verluste der Methode, ermittelt nach einer erneuten Verdünnung und Zentrifugation einer Probe lagen im Bereich von 10-20 %.

Größenausschluss-Chromatographie/ Gelfiltration:

Um Polyamide, Kupplungsreagenzien, organische Lösemittel oder andere kleine Moleküle von längeren Oligonukleotiden oder *minicircles* zu trennen wurde meist eine Gelfiltration mit G-25 Säulen der Fa. GE Healthcare nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Soll die Probe in einem bestimmten Puffer eluiert werden, wurde die Säule zunächst 2 Mal mit 500 µl des entsprechenden Puffers gespült und bei 720 g zentrifugiert, um das Gelmaterial mit dem Puffer zu äquilibrieren.

Anionenaustausch-Chromatographie

Zur Anionenaustausch-HPLC wurde die entsprechenden Oligonukleotide oder Ligationsreaktionen ohne weitere Vorbehandlung mit dem Anionenaustausch-Gradienten auf einer Säule der Fa. Dionex aufgetrennt. Die Fraktionen wurden manuell aufgesammelt und anschließend per Butanolextraktion und Ethanol-fällung oder per Membranmikrozentrifugation aufkonzentriert. Das Detektionslimit bei nicht zu inhomogenen Proben lag für *minicircles* bei unter 300 fmol.

4.2 Eine Polyamid-Stütze

Die Synthese der Polyamid-Monomere, der Polyamide und der Stütze sind bereits in meiner Diplomarbeit ausführlich beschrieben worden.¹⁵⁷

Neues Protokoll für die Peptid-Knüpfung

Abweichend vom Protokoll aus meiner Diplomarbeit¹⁵⁷ gelangen Peptid-Knüpfungen nur noch mit HOBt/ HBTU. Als Beispiel soll hier die Synthese einer Stütze **A-A** mit Bernsteinsäure-Linker beschrieben werden.

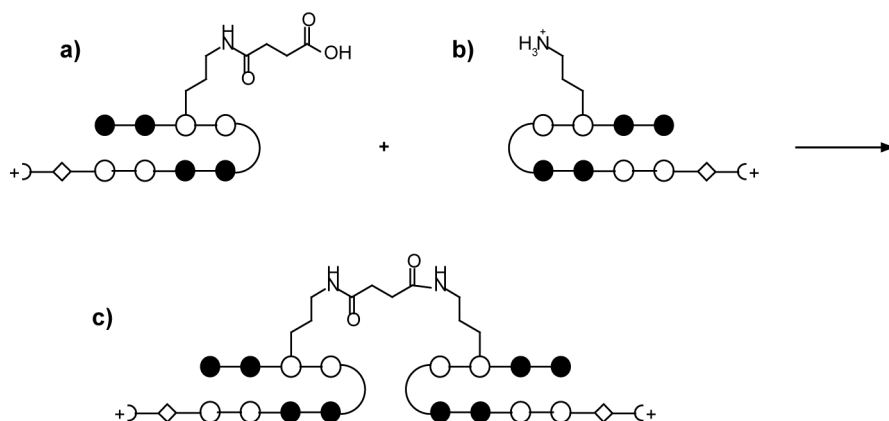


Abbildung 127 a) Bernsteinsäure-Kupplungsprodukt von **PA-A**. wird mit **PA-A** (b) zur Stütze mit Bernsteinsäure-Linker (c) umgesetzt.

PA-A wurde wie beschrieben¹⁵⁷ mit Bernsteinsäureanhydrid zum PA-A-Bernsteinsäure-Kupplungsprodukt a) umgesetzt, HPLC-aufgereinigt, und zur Trockne eingedampft.

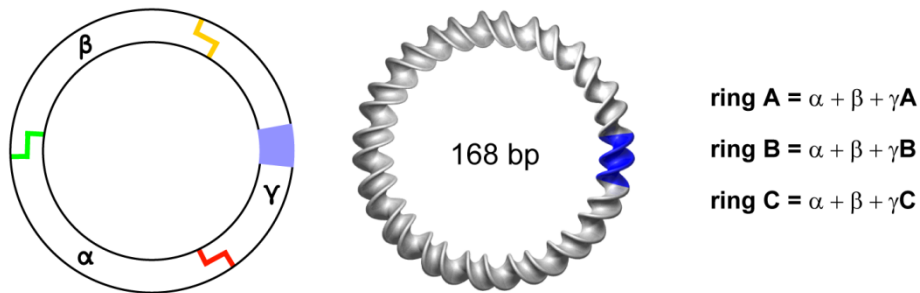
10 nmol dieses Produktes wurden in 20 μ l DMF gelöst. Diese Lösung wurde auf 12,3 nmol PA-A gegeben und gelöst. Hierzu wurden in dieser Reihenfolge je 100 nmol HBTU, HOBt und DIPEA (Diisopropylethylamin, Hünig-Base) gegeben und 15 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde HPLC-aufgereinigt (PA-Gradient).

Es wurden 2,8 nmol der Polyamid-Stütze A-A mit Bernsteinsäurelinker (c) isoliert.

Retentionszeit: 22,7 min.

M (exakt) = 2615,23 Da, gefunden: $[M+2H^+]^{2+} = 1309,1$ Da.

Minicircles für die FCCS-Experimente



5' - **TCTCT**AAAAAATATATAAAAAATCTCTAAAAAATATATAAAAAATCTCTAAAAAATAT - 3' α
 3' - TTTTTTATATATTTTTAGAGATTTTTTATATATTTTTAGAGATTTTTTATA**TA**TTT - 5'

5' - **ATAAA**AATCTCTAAAAAATATATAAAAAATCTCTAAAAAATATATAAAAAATCTCTAA - 3' β
 3' - TTAGAGATTTTTTATATATTTTTAGAGATTTTTTATATATTTTTAGAGATT**TTTTA** - 5'

5' - **AAAA**TATATAAC**ATGGCCA**TAAAAATATATA - 3' γA
 3' - TATATTG**TACCGGT**ATTTTTATATATTTTTGCGCGTTTTTTATATATTTTT**AGAGA** - 5'

(Cy5)

5' - **AAAA**TATATAAT**ATGGTAT**GAAAAATATATA - 3' γB
 3' - TATATT**A**TAC**CATA**CTTTTTATATATTTTTGCGCGTTTTTTATATATTTTT**AGAGA** - 5'

(RG)

5' - **AAAA**TATATAAT**AGCTCCA**TAAAAATATATA - 3' γC
 3' - TATATT**A**TC**GAGGT**ATTTTTATATATTTTTGCGCGTTTTTTATATATTTTT**AGAGA** - 5'

(Cy5)

Abbildung 128: Schema der Segmente des minicircles. Unten: Sequenzen der Oligonukleotide für die minicircles für FCCS-Bindungsstudien.

Die Oligonukleotide für die *minicircles* wurden hybridisiert, kinasiert, ligiert, Exonuklease-verdaut, nativ PAGE-aufgereinigt, elektroeluiert und schließlich aus Ethanol gefällt.

4.3 AFM

Die Probenvorbereitung und AFM-Messung an dem Rasterkraftmikroskop der Firma Molecular Imaging Inc. (jetzt eine Tochter von Agilent), Modell PicoScan bzw. PicoSPM I (jetzt Agilent Series 4500 SPM) erfolgte wie von Dr. Rasched entwickelt¹⁹⁹ und soll daher hier nicht weiter besprochen werden.

Stattdessen wird das Vorgehen für das Veeco Dimension 3100 AFM, betrieben mit einem DNanoscope IIIa Controller, beschrieben.

Probenhalter-Vorbereitung

Alle AFM-Messungen erfolgten auf Glimmer („muscovite grade“, Plano/ Wetzlar). Die etwa 2 x 8 cm² großen Plättchen wurden mit einer handelsüblichen Schere in etwa 1 cm² große Quadrate geschnitten und die Ecken abgerundet. Nun wurden runde Metallträger (Durchmesser ca. 2 cm) auf einer Heizplatte auf 80-100°C erwärmt und wenig (!) Heißkleber aus den Stiften für Heißklebepistolen aufgetupft. Hierauf wurden die Glimmer-Plättchen gepresst und anschließend abgekühlt. Vor jeder Probenvorbereitung wurde die oberste Glimmer-Schicht mit Transparentklebestreifen entfernt, bis eine glatte Oberfläche ohne sichtbare Risse freigelegt wurde.

Positivierung und Auftragen der Probe

30 µl einer Lösung von 0,1 mg Polyornithin (P3655, Sigma Aldrich) in 1 ml TAEMg-Puffer wurden auf ein frisch gespaltenes Glimmer-Plättchen gegeben und für ca. 2 min inkubiert. Die Lösung wurde mit wenigen ml Milli-Q-Wasser abgespült und die Oberfläche in einem Stickstoff-Strom getrocknet.

Die Probe kann nun entweder direkt auf die Oberfläche gegeben werden oder die Oberfläche kann zunächst mit einem dünnen Permanent-Fasermaler kompartimentiert werden. Werden Kreise mit wenigen mm Durchmessern auf die Oberfläche aufgezeichnet, können auch mehrere Proben gleichzeitig parallel auf einen Träger aufgegeben werden. Die hydrophoben Begrenzungen des Fasermalers verhindern das Ineinanderlaufen der verschiedenen Proben. Ein weiterer Vorteil der aufgezeichneten Kreise ist, dass die Fokussierung der Oberfläche mit dem Mikroskop-Objektiv des AFMs leichter fällt als mit dem transparenten Glimmer allein und statt 4µl sogar nur etwa 0,5-1 µl der Probe aufgetragen werden muss. Die *minicircle*-Konzentration sollte zwischen 2 und 5 nM liegen.

Die entsprechende Menge der Probe wird auf die Glimmeroberfläche aufgetragen und für eine Minute inkubiert. Längere Inkubationszeiten führen nicht zu einer höheren Dichte an DNA-Strukturen auf der Oberfläche. Bei sehr leicht auseinander fallenden Komplexen kann der Probenhalter, die Probe und die Pipettenspitzen auf Eis vorgekühlt werden. Muss eine Probe verdünnt werden, so kann zunächst 2 µl TEAMg-Puffer in einen Filzstift-Kreis pipettiert werden.

Der Puffer bildet einen gespannten Tropfen. In diesen Tropfen wird dann die gewünschte Menge der konzentrierten Probe gegeben und wie oben weiter verfahren. Diese Verdünnungs-Prozedur hat den Vorteil, die Inkubationszeit bei niedrigen Konzentrationen zu minimieren (siehe Abschnitt 3.2.9.2).

AFM-Messungen

Soll die Probe trocken an Luft gemessen werden, so wird die Oberfläche nach der Inkubationszeit mit wenigen ml Wasser abgespült und durch einen Stickstoff-Strom getrocknet.

Im Trocken-Modus wurden ACT Sonden der Firma APP Nano verwendet. Deren Federkonstanten lagen bei 25–75 N/m. Die Resonanzfrequenz der Cantilever lag zwischen 300 und 400 kHz. Der *amplitude setpoint* sollte auf 0,2-0,3 V eingestellt werden. Höhere *setpoints* führten zu unschärferen Bildern (vermutlich weil die auf die Probe übertragenen Kräfte größer sind). Die Scanfrequenzen lagen bei 0,5-2 Hz.

Die Rohdaten wurden mit der Nanoscope(R) 5.31 Software von Veeco geglättet, Höhenprofile wurden mit dem Freeware-Programm WSxM von Nanotec⁴⁷ erstellt.

Flüssig-Messung

Für Messungen in Puffer wurde der Sondenhalter DTFML-DD von Veeco verwendet. Es wurden sowohl Veeco DNP-S Sonden (0,12–0,58 N/m) oder TR800PB (0,16/ 0,61 N/m) von Olympus benutzt. Der *amplitude setpoint* wurde auch hier auf 300 mV gesetzt, die typischen Resonanzfrequenzen der Cantilever lagen bei 19-20 kHz. Scanfrequenzen waren 1-4 Hz.

UV-Bestrahlung der Sonden

Vor der erstmaligen Verwendung von Sonden wurden diese 1-15 h mit einer UV-Handlampe aus ca. 2 cm Entfernung auf einer Aluminiumfolie bestrahlt.

Regeneration der Spitze

Unschärf gewordene oder verschmutzte Spitzen konnten häufig regeneriert werden, indem sie kontrolliert auf die Glimmer-Oberfläche aufgesetzt wurden. Dazu wird die Spitze im *find surface*-Modus erst 200 µm schnell und dann langsam weiter abgesenkt, bis die Laserreflektion am Detektor deutlich vom Wert ohne Kontakt abweicht oder sie ganz verschwindet. Danach wird ein *withdraw* durchgeführt und dann eine erneute Annäherung der Spitze im automatischen *approach*-Modus.

4.4 LILBID-Massenspektrometrie

Symmetrisches Paar für Leiterexperiment

5'-GATTACAGATCGATTACACGGACTGCGGAACTGACTGTCGTCAGAGCTCCAAGTATGTC-3'
5'-TTCCGCAGTCCGTGTAATCGATCTGTAATCGACATCAGTTGGAGCTCTGACGACAGTCAG-3'

Asymmetrisches Paar für Leiterexperiment

5'-GATTACAGATCGATTACACGGACTGCGGAACTGACTGTCGTCAGAGCTCCAAGTATGTC-3'
5'-CGTGTAAATCGATCTGTAATCGACATCAGTTGGAGCTCTGACGACAGTCAGTTCCGCAGTC-3'

Gen, welches in den pGA6 Vektor inkloniert wurde

(nur ein Strang gezeigt, NF- κ B-Bindungsstelle in rot):

5' -GGTACCATGGCTAAGCACGTTGTAGTAATAGGAGGAGGAGTAGGCGGTATGGGGACTTTCC-
GTTCCCCACCTCGCAATGGGATGGAGGAAGTTTCAAGACATTTCCGTAGAGCTC-3'

Oligonukleotid-Paar für Experiment zur Salzabhängigkeit der Duplexstabilität

5' -AAAAAAAAAAAAAAAA-3'
5' -TTTTTTTTTTTTTTTT-3'

NF- κ B-*match*-Dimer

5' -Cy5-ATGGGGACTTTCCTA-3'
5' -TAGGAAAGTCCCAT-3'

Mismatch-Dimer für NF- κ B-Experiment

5' -GATTACATCAGTTGGAGCTCTCTAGACAGTCAGTTGGCCAGTCAATAC-3'
5' -GTATTGACTGGCCAACTGACTGTCTAGAGAGCTCCAAGTATGTAATC-3'

4.5 Röhre mit Polyamid-Stützen

TS322: 5'-CTCAAAGGCCTCTCAAAAACGCGCAAAAATATATAAAAACCTCTCAAAAATAG
TS323: 5'-GAGTTTTGGCCTATTTTTTGAGAGTTTTTATATATTTTTTGGCGGTTTTTGAGA
TS324: 5'-GCCAAAACCTCTCAAAAATATATAAAAACGCGTAAAGGTATCTCAAAAACGTCAAAAAC
TS325: 5'-ATTTTTGAGAGTTTTTTGACAGTTTTTGAGATACCTTTACGCGTTTTTATATATTTTTTGA
TS326: 5'-TCTCAAAAATGTGTAAAAAATAGGTAAAAATATATAAAAACGCGCAAAAACCT
TS327: 5'-GGCCTTTGAGAGTTTTTGGCGGTTTTTATATATTTTTTACCTATTTTTTACAC
(alle 5'-phosphoryliert)

Zur Synthese der *minicircles* wurden die Oligonukleotide hybridisiert, ligiert, mit Exonuklease verdaut, PAGE aufgereinigt, elektroeluiert und ethanolgefällt. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

4.6 Polyamid-Anker

TS 457 (alpha f):

5'-Pho-AGTGTGAAAAATGTCTAAAAAAGCGCGAAAAAGTCTCAAAAACGCGCAAAAATATAT

TS 458 (alpha r):

5'-Pho-CGCGCTTTTTAGACATTTTTTATATATTTTTTGGCGGTTTTTTGAGACTTTTTTCGCGCT

TS 459 (beta f):

5'-Pho-AAAAAATGTCTAAAAAGCGCGAAAAAATATATAAAAACGCGCAAAAAGCGCGAAAAA

TS 460 (beta r):

5'-Pho-TTTTTGCGCGTTTTTTGAGAGTTTTTCGCGCTTTTTTGGCGGTTTTTATATATTTTTT

TS 461 (gamma A f)

5'-Pho-CTCTCAAAAACGCGCAAAAAGCGCTAAAAAAGCGCGAAAAATCTCTAAAAA

TS 462 (gamma A r):

5'-Pho-TTTTTAGACATTTTTACACTTTTTTAGAGATTXTTCGCGCTTTTTTAGGCC

TS 495 (gamma A r), selbes Oligonukleotid wie TS 462, ohne Modifikation für unmodifizierten Ring A:

5'-Pho-TTTTTAGACATTTTTACACTTTTTTAGAGATTTTTTCGCGCTTTTTTAGGCC

Für unmodifizierten Ring mit Bindestelle B:

TS 496 (gamma B f)

5'-Pho-CTCTCAAAAAACGCGCAAAAAGGTATAAAAAAGCGCAAAAATCTCTAAAAA

TS 497 (gamma B r)

5'-Pho-TTTTTAGACATTTTTTCACACTTTTTTAGAGATTTTTTCGCGCTTTTTTATACC

Für einfache Kette (statt TS 458) TS 571:

5'-Pho-CGCGCTTTTTAGACATTTTTTATATATXTTGCAGTTTTTTGAGACTTTTTTCGCGCT

für Kette mit kooperativer Bindung

TS 583 (alpha f):

5'-Pho-AGTGTGAAAAATGTCTAAAAACTCTCAAAAAGTCTCAAAAAGAGAGAAAAAGGCCT

TS 584 (alpha r):

5'-Pho-CGCGCTTXXTTAGACATTTTTTAGGCCTTTTTCTCTCTTTTTTTGAGACTTTTTTGAGAGT

X= (C6-Amino-dT)

Synthese des Isothiocyanates

1.67 μmol PA-A wurden in 150 μl frischem (!), trockenem DMF gelöst. Hierzu werden 17 μmol (1 μl) CS_2 und 41.7 μmol (6.6 μl) trockenes DIPEA gegeben. Diese Lösung wurde 20 min bei 800 rpm (Umdrehungen pro Minute) bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 16.7 μmol (3.2 mg) Tosylchloride in 10 μl DMF gelöst und zugegeben. Nach 40 min war die Umsetzung abgeschlossen. Das Produkt wurde HPLC-aufgereinigt (PA-Gradient, Retentionszeit = 26,1 min). Die Ausbeute wurde über den OD_{310} -Wert ermittelt und lag bei 1.54 μmol . Die manuell gesammelte Fraktion nach HPLC wurde aliquotiert und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Wegen der Hydrolyseempfindlichkeit des Isothiocyanates empfiehlt sich für die Zukunft die Entfernung des Lösungsmittels bei 4°C.

Exakte Masse: 1308,7 Da, gemessen: 1309,6 Da ($\text{M}+\text{H}^+$).

Kupplung des PA-Isothiocyanates an Amino-modifizierte DNA

2 nmol des Amino-modifizierten Oligonukleotides wurden ko-evaporiert und in 10 μl Borat-Puffer (Borsäure/ NaOH pH8,5) wieder aufgelöst. Ein 50 nmol Aliquot des PA-Isothiocyanates wurde in 10 μl Wasser gelöst. Dabei war Schaumbildung zu beobachten. Die Polyamid-Lösung wurde nun langsam zur DNA-Puffer-Lösung gegeben und anschließend noch 20 μl Acetonitril hinzugefügt. Die Lösung wurde 15 Stunden bei 50°C und 800 rpm inkubiert. Der Überschuss

an Polyamid wurde über eine Größenausschlusschromatographie-Säule entfernt und anschließend das Produkt HPLC-aufgereinigt (DNA-Gradient).

Retentionszeiten: Amino-modifizierte DNA: 14,0 min., Kupplungsprodukt: 17,6-18,7 min. (teilweise als 2-3 Peaks mit identischer Masse), PA-Isothiocyanat: ca. 35 min (schwankte stark).

Das Produkt wurde manuell aufgefangen und über den OD₂₆₀-Wert die Ausbeute bestimmt. Diese lag je nach Reaktion bei bis zu 27 %.

Berechnete Masse: 17 339 Da, gefunden: 17 340 Da.

Wegen der vermuteten Löslichkeitsprobleme nach Aufkonzentration zur Trockne empfiehlt sich eine Membranmikrozentrifugation.

Synthese des *minicircles*

200 pmol einer nicht zur Trockne eingedampften Probe des Polyamid-DNA-Hybrides wurden mit 200 pmol der restlichen Oligonukleotide hybridisiert, ligiert, mit einem PCR-Kit isoliert, BAL-Exonuklease verdaut, erneut mit einem PCR-Kit isoliert und mit 70 µl Wasser eluiert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt, die Ausbeute lag bei 9,3 pmol.

Die Lösung wurde zur Trockne eingedampft und in 20 µl TEAMg-Puffer wieder gelöst. Diese Lösung wurde verdünnt und per AFM visualisiert.

4.7 Catenan

Catenan mit Polyamid-Stütze:

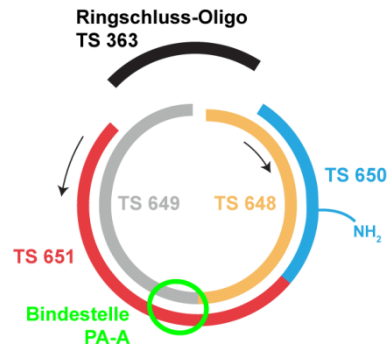
Ring A (alle 5' phosphoryliert, alle 5'-3')

```
352 CTCAAAAAGCTTCAAAAAGTCTCAAAAATGTCTAAAAAAGCGCGAAAAAGTCTCAAAAACG
353 TATGGCCTAGCGTTTTTTGAGACTTTTTTCGCGCTTTTTTAGACATTTTTGAGACTTTTTTGAA
354 CTAGGCCATATATAAAAAATGTCTAAAAATGTCTAAAAATATATAAAAAACGCGCAAAAACG
355 ACTTTTTTCGCGCTTTTTTCGCGCTTTTTTATATATTTTTTAGACATTTTTAGACATTTTTTATA
356 GCGAAAAAGTCTCAAAAACGCGCAAAAACGCGCAAAAACGCGCAAAAACGCGCAAAAACG
357 GCTTTTTGAGACTTTTTTCGCGCTTTTTTCGCGCTTTTTTCGCGCTTTTTTCGCGCTTTTTTCG
```

Ring B (alle 5' phosphoryliert, alle 5'-3')

```
358 TCTAAAAATCTAGAAAAACGCGCAAAAAGTCTCAAAAACGCGCAAAAATGTCTAAAAACG
359 AGTTACCATCGCTTTTTTAGACATTTTTTCGCGCTTTTTTAGACATTTTTTCGCGCTTTTTTCTA
360 GATGGTAACTCTCAAAAATGTCTAAAAATATATAAAAAACGCGCAAAAATATATAAAAAACG
361 CGTTTTTCGCGCTTTTTTATATATTTTTTCGCGCTTTTTTATATATTTTTTAGACATTTTTTGAG
362 CGCAAAAACGCGCAAAAAGTCTCAAAAACGCGCAAAAACGCGCAAAAACGCGCAAAAACG
363 GATTTTTAGACATTTTTTCGCGCTTTTTTCGCGCTTTTTTCGCGCTTTTTTCGCGCTTTTTTCG
```

Catenan mit Polyamid-Anker:



TS 648:

5' Pho-TCTAAAAATCTAGAAAAACGCGCAAAAAGTCTCAAAAAACGGCAAAAATGTCTAAAAAGCTCGAAAA
ACTCTCAAAAATA

TS 649:

5' Pho-TGGCAAATAGATAAAAAACGAGCAAAAATAGATAAAAAAGCCGAAAAACGCGCAAAAAGTCTCAAAA
ACGCGCAAAAATG

TS 650:

5' Pho-ACATTTTTGCCCGTTTTXXGAGACTTTTTGCGCGTTTTTCTA (X= C6Amino-dT)

TS 651:

5' Pho-CGTTTTTCGGGCTTTTTTATCTATTTTTGCTCGTTTTTATCTATTTGGCCATATTTTTGAGAGTTTTT
CGAGCTTTTTTAG

TS 652 (Splint für TS 648/9):

5' -TATTTGGCCATATTTTTGAGAGTTTTTCGA

TS 363 (Ringschluss-Oligonukleotid):

5' -GATTTTTAGACATTTTTTGC GCGTTTTTGAGACTTTTTTGCG

4.8 G-Quadruplex-Module

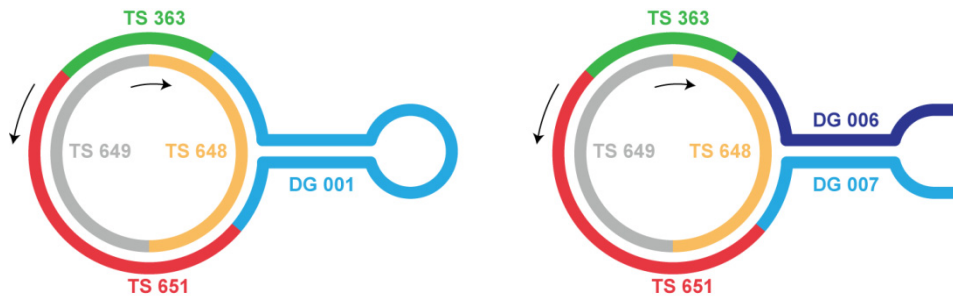


Abbildung 129: Oligonukleotid-Schema des Haarnadel-minicircles (links) und des Stimmgabel-minicircles (rechts). Die Pfeile zeigen die 5'-3' Polarität der Oligonukleotide an.

TS 648:

5' Pho-TCTAAAAATCTAGAAAAACGCGCAAAAAGTCTCAAAAACGGGCAAAAATGTCTAAAAAGCTCGAAAA
ACTCTCAAAAATA

TS 649:

5' Pho-TGGCCAAATAGATAAAAAACGAGCAAAAATAGATAAAAAAGCCCGAAAAACGCGCAAAAAGTCTCAAAA
ACGCGCAAAAATG

TS 651:

5' Pho-CGTTTTTCGGGCTTTTTTATCTATTTTTGCTCGTTTTTATCTATTTGGCCATATTTTTGAGAGTTTTT
CGAGCTTTTTTAG

TS 363:

5' Pho-GATTTTTAGACATTTTTTGCGGTTTTTGAGACTTTTTTGCG

DG 001:

5' Pho-ACATTTTTGCCGTTTTTTGAGACACCTGGTAGTTGGGGTTTTGGGGTTCTACCAGGTGCTTTTTGCGCG
TTTTTTCTA

Splint 1: TS 363

Splint 2: TS 652:

5' -TATTTGGCCATATTTTTGAGAGTTTTTCGA

DG 006:

5' -GGGGTTTCTCACAGAGTCTTTTTGCGCGTTTTTTCTA

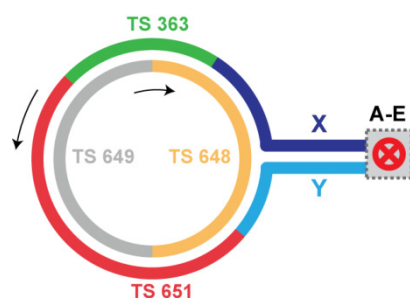
DG 007:

5' -Pho-ACATTTTTGCCCGTTTTTTGAGATCTCTGTGAGTTTGGGG

Zunächst wurde ein *ss minicircle* synthetisiert und daran der Rest der Struktur. Die *minicircles* wurden entweder über PAGE oder Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt. Das genaue experimentelle Vorgehen wurde bereits an anderer Stelle beschrieben.²⁵⁷

4.9 Gecagete Architekturen

Das Design der *minicircles* baute auf dem Design der G-Quadruplex-Modul-*minicircles* (Abschnitt 4.8) auf. Statt DG 001 bzw. DG 006/ DG 007 wurden diese Oligonukleotide verwendet:



Sequenzen für *minicircle* mit 6-Basen *sticky end* (gecaget A und wt A^{wt}):

X (mit *cage*): 5'-GCATG^(NPP)CCTCACAGAGTCTTTTTGCGCGTTTTTTCTA-3'

X (wt): 5'-GCATGCCTCACAGAGTCTTTTTGCGCGTTTTTTCTA-3'

Y: 5'-ACATTTTTGCCCGTTTTTTGAGATCTCTGTGAG-3'

Sequenzen für *minicircle* mit 8-Basen *sticky end* (gecaget B und wt B^{wt}):

X (mit *cage*): 5'-TGCAATG^(NPP)CACTCACAGAGTCTTTTTGCGCGTTTTTTCTA-3'

X (wt): 5'-TGCAATGCACTCACAGAGTCTTTTTGCGCGTTTTTTCTA-3'

Y: 5'-ACATTTTTGCCCGTTTTTTGAGATCTCTGTGAG-3'

Sequenzen für *minicircle* mit G-reicher Stimmgabel (gecaget C und wt C^{wt}):

X (mit *cage*): 5'-GG^(NPP)GGTTTCTCACAGAGTCTTTTTGCGCGTTTTTTCTA-3'

X (wt): 5'-GGGGTTTCTCACAGAGTCTTTTTGCGCGTTTTTTCTA-3'

Y: 5'-ACATTTTTGCCCGTTTTTTGAGATCTCTGTGAGTTTGGGG-3'

Sequenzen für *minicircle* mit 10-Basen *sticky end* (mit zwei *cages* D und wt D^{wt}):

X (mit *cages*): 5'-C^(NPE)CTTGCC^(NPE)ACCTCACAGAGTCTTTTTGCGCGTTTTTTTCTA-3'
X (wt): 5'-ACCTTGCCACCTCACAGAGTCTTTTTGCGCGTTTTTTCTA-3'
Y: 5'-ACATTTTTGCCCGTTTTTTGAGATCTCTGTGAG-3'

Sequenzen für *minicircle* mit 10-Basen *sticky end* (mit drei *cages* E und wt E^{wt}):

X (mit *cages*): 5'-G^(NPP)TGGC^(NPE)AAG^(NPP)GTCTCACAGAGTCTTTTTGCGCGTTTT
TTTTCTA-3'
X (wt): 5'-GTGGCAAGGTCTCACAGAGTCTTTTTGCGCGTTTTTTCTA-3'
Y: 5'-ACATTTTTGCCCGTTTTTTGAGATCTCTGTGAG-3'

Die Synthese, Aufreinigung und die Bestrahlungsexperimente der gecageten *minicircles* wurden detailliert in der Diplomarbeit von meiner Kollegin Julie Thevarpadam beschrieben.²³⁰

4.10 DNA-Superhelix

Die *rolling circle*-Amplifikationsversuche wurden mit einem *ssDNA-minicircle* aus TS 648 und TS 649 durchgeführt. Für die RCA wurden 2,5 pmol des *ss minicircle* und 3,5 pmol TS 363 als Primer eingesetzt. Die Reaktion wurde mit 2 µl Φ 29-Polymerase nach dem Protokoll des Herstellers (NEB) in 50 µl Φ 29-Puffer durchgeführt.

Zu 2 µl dieses Amplifikates wurden 150 pmol TS 648 und TS 649 gegeben, und in 30 µl Hybridisierungspuffer auf 95°C geheizt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. In einem Versuch wurde an diesem Punkt zusätzlich ligiert.

Nun wurden 0,5 µl einer 1:100-Verdünnung an Sybr[®]Gold zugegeben und mit nativem Ladepuffer versetzt und auf ein 2-prozentiges Agarosegel aufgetragen. Nach ca. 10 min wurde die Elektrophorese beendet, das Gel aus der Elektrophoresekammer entfernt und der Inhalt der Geltasche vorsichtig herauspipettiert. Diese Lösung wurde per AFM untersucht.

4.11 DNA-Röhre mit *crossover*

Erstes *crossover*-Design

MK 75:

5'-AGCACAGCTAAAAACGATCCAAAAACACGGGAGAGAGGTGGAAAAAGAGGGCAAAAAGCGGAGA

MK 76:

5`-AGGTGCGAGAAAAACAGCGGAAAAACGGAGGTGACTGGAGGAAAAAGGCGGAAAAAGGGCAGG
 MK 77: 5`-GTTTTTAGCTGTGCTCCTGCC
 MK 78: 5`-TGTTTTCTCGCACCTTCTCCGCTTT
 MK 79: 5`-GTTTTCCCGCCTTTTCTCCAGCTTCTCCG
 MK 80: 5`-CTTTTCGGCTGTTTTCTCGCACTACCTCC
 MK 81: 5`-GTTTTGGCCTCTTTTCCACCTCCTCCTGCC
 MK 82: 5`-CTTTTGCATCGTTTTTAGCTGTGTCTCCCGT

Zweites Design (half crossover-Röhre)

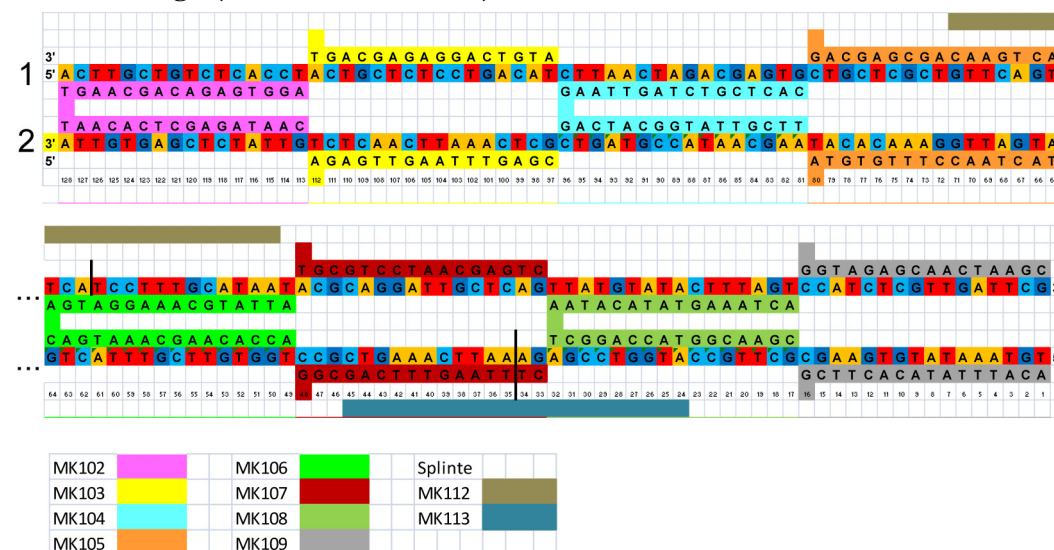


Abbildung 130: Sequenzen und Farbschema des half crossover-Röhrendesigns

Gerüststrang 1 (MK 110) für *minicircle* 1:

5`-TCCTTTGCATAATACGCAGGATTGCTCAGTTATGTATACTTTAGTCCATCTCGTTGATTGACTTGCTGTCTC
 ACCTACTGCTCTCCTGACATCTTAACTAGACGAGTGCTGCTCGCTGTTCAAGTTCA

Gerüststrang 2 (MK 111) für *minicircle* 2:

5`-AATTCAAAGTCGCTGGTGTTCGTTTACTGATGATTGGAAACACATAAGCAATACCGTAGTCGCTCAAATTCA
 ACTCTGTTATCTCGAGTGTTATGTAATATGTGAAGCGCTTGCCATGGTCCGAGA

Splinte:

MK 112: 5`- TTATGCAAAGGATGAACTGAAC
 MK 113: 5`- GACTTTGAATTTCTCGGACCAT

Staple strands:

MK 102: 5`-AGGTGAGACAGCAAGTTAACACTCGAGATAAC
 MK 103: 5`-ATGTCAGGAGAGCAGTAGAGTTGAATTTGAGC
 MK 104: 5`-CACTCGTCTAGTTAAGGACTACGGTATTGCTT

MK 105: 5' -ACTGAACAGCGAGCAGATGTGTTTCCAATCAT
MK 106: 5' -ATTATGCAAAGGATGACAGTAAACGAACACCA
MK 107: 5' -CTGAGCAATCCTGCGTGGCGACTTTGAATTTTC
MK 108: 5' -ACTAAAGTATACATAAATCGGACCATGGCAAGC
MK 109: 5' -CGAATCAACGAGATGGGCTTCACATATTTACA

Die *minicircles* 1 und 2 wurden per Splint-Ligation aus den linearen Gerüststrängen dargestellt und über denaturierende PAGE aufgereinigt. Die Gerüststränge (der Fa. Sigma-Aldrich) waren von so geringer Qualität, dass sie zuvor über Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt werden mussten.

Für die Synthese der *half crossover*-Röhre wurden jeweils 5 pmol der beiden *minicircles* und der *staple strands* in einem 100 µl Schnappdeckelgefäß in Hybridisierungspuffer zusammengegeben. Diese Schnappdeckelgefäße wurden dann mit Metallschrauben beschwert, damit sie an den Boden eines mit kochendem Wasser gefüllten Devar-Gefäßes sanken. Die Beschwerung war notwendig, da sonst die Flüssigkeit der Hybridisierungsreaktion an die Oberseiten der schwimmenden Gefäße kondensierte. Die Abkühlung des Wassers dauerte etwa 5 Tage, worauf AFM Aufnahmen erfolgten. Eine Hybridisierung über einen so langen Zeitraum in einem PCR-Block war nicht möglich, da selbst aus sorgfältig geschlossenen Gefäßen sämtliches Wasser verdampfte.

4.12 Materialien und Geräte

4.12.1 Chemikalien, Enzyme

Lösungsmittel	Sigma Aldrich, Fluka, Acros
Chemikalien	Sigma Aldrich, Fluka, Acros (wenn nicht gesondert aufgeführt)
Oligonukleotide	Metabion (bevorzugt), Sigma-Aldrich, Biolegio, Ella Biotech
DNA-Leiter-Standard	Promega, NewEnglandBiolabs
Crosslinker	Pierce (Thermo Fisher)
T4-DNA-Ligase	5 U/µL (und entsprechender 10x Puffer) Fermentas
BAL-31 Exonuklease	(und Puffer) NewEnglandBiolabs
Φ29 Polymerase	(und Puffer) NewEnglandBiolabs
T4 Polynukleotid-Kinase	(und Puffer) NewEnglandBiolabs
Sybr®Gold	(in DMSO) Invitrogen
Sybr®Green	(in DMSO) Invitrogen
Polyornithin	(P3655) Sigma-Aldrich

4.12.2 Geräte

Pipetten	(1-1000 µl) Brand
Vortexer	(Vortex-Genie 2) Scientific Industries
Thermo-Mixer	(MKR 13) HLC Bio Tech
Tischzentrifuge	neoLab
Mikrozentrifuge	(Centrifuge 5415R) Eppendorf
Vakuumbzentrifuge	(Concentrator 5301) Eppendorf
UV-/Vis-Photometer	(Evolution 300) Thermo Scientific und (BioPhotometer plus) Eppendorf
UV-Belichtung/LED	(NCCU033(I) Nichia) Elektronikwerkstatt Universität Bonn
Geldokumentationssystem	(Dark Hood DH40/50) Biostep
Spannungsgerät	(PowerPac Basic™) Bio-Rad
Gelelektrophorese-Systeme	Model B1 EasyCast™ Mini Gel (f. Agarosegele) Owl Separation Systems PROTEAN® II xi Cell (für PAGE) Bio-Rad
Horizontalschüttler	(HS 260 basic) IKA
Reinstwasseranlage	(Milli Q plus) Millipore
HPLC	(Series 1200 mit Autosampler, Säulenofen, Diodenarray-Detektor) Agilent Technologies
RP-HPLC-Säulen	(Nucleosil 100-5 C18) Chromatographie Service
Anionenaustausch-HPLC	(DNAPac® PA200) Dionex
DNA-Synthesizer	(ABI 392) Applied Biosystems
AFM	(Dimension 3000 mit Nanoscope IIIa Controller) Veeco (Multimode mit Nanoscope IV Controller) Veeco (PicoSPM I) Molecular Imaging Inc. (jetzt Agilent)
AFM-Sondenhalter	DTFML-DD (f. Puffer) Veeco DAFMCH (Luft) Veeco
AFM-Sonden	ACT (Luft) APP Nano DNP-S (Puffer) Veeco TR800PB (Puffer) Olympus
Glimmer	(muscovite grade) Plano
Massenspektrometer	micrOTOF-Q II (ESI) Bruker
Waagen	(SI-234 und SI-2002) Denver Instrument
Trockenschrank	(TK/L E 117) Ehret
Mikrowelle	Severin
Eismaschine	Ziegra

4.12.3 Verbrauchsmaterial

Zentrifugationsfilter	(0,2/ 0,45 μ m, 500 μ l) VWR
Gelfiltrationssäulen	illustra™ MicroSpin™ G-25 GE Healthcare
Membran-Mikrozentrifugationssäulen (3 kDa, 50 kDa und 100 kDa cutoff)	Amicon, Millipore
PCR Isolationskits	Fermentas
Schnappdeckel-Reaktionsgefäße: (100 μ l; 500 μ l; 1,5 und 2 ml) Eppendorf	Für Experimente bei nM Konzentrationen: LoBind (1,5 ml) Eppendorf
Zentrifugenröhrchen	(10 ml, 50 ml) VWR
Glasküvetten (2.5 ml)	(zur UV-Bestrahlung) Roth
Pipettenspitzen	Eppendorf
Transparent-Klebestreifen	(Tesa) Beiersdorf (no-name-Produkte meiden, da sonst beim Abziehen der Glimmer-Plättchen Klebstoff- rückstände zurückbleiben)

4.12.4 Puffer

Alle Puffer wurden mit Milli-Q-Wasser angesetzt.

TEAA-Puffer (pH 7.5)

0,1 M Triethylamin (pH-Einstellung: 1 M AcOH);

Hybridisierungspuffer (pH 7.6)

50 mM TRIS-HCl; 10 mM MgCl₂

Nativer Gel-Ladepuffer

50 Vol % Glycerin; 50 Vol % Hybridisierungspuffer; (zuge-setzter Farbstoff: Bromphenolblau)

Denaturierender Ladepuffer

90 Vol % Formamid; 10 mM NaOH; (zuge-setzter Farbstoff: Bromphenolblau)

Gelextraktionspuffer (pH 7.5)

500 mM NH₄OAc; 1 mM EDTA; 10 mM MgCl₂

1 × TBE-Puffer (pH 8)

89 mM Tris; 2 mM EDTA; pH-Einstellung: H₃BO₃

TEAMg-Puffer (pH 7.5)

40 mM Tris (pH-Einstellung AcOH); 2.5 mM EDTA; 12.5 mM MgCl₂

Borat-Puffer (pH 8.5)

500 mM H₃BO₃; pH-Einstellung mit 1 M NaOH

4.12.5 HPLC-Gradienten**Polyamid-Gradient:**

Zeit [min]	MeCN [%] (auf 100 % mit 0,1 % TFA)
0	0
30	60
32	100
36	100
40	0

DNA-Gradient

Zeit [min]	MeCN [%] (auf 100 % mit 0,1 M TEAA-Puffer)
0	5
2	5
35	40
37	100
40	100
45	5

Anionenaustausch-Gradient

Zeit [min]	1,25 M NaCl in 40 mM Tris-Puffer (pH 8) [%] (auf 100 % mit 40 mM Tris-Puffer)
0	10
1	10
3	35
8	45
23	55
25	100

27	100
29	0

4.12.6 Software

Der Großteil der Grafiken wurde mit Adobe Illustrator (CS3) erstellt.

Computermodelle von DNA wurden entweder aus der Protein Data Bank (www.pdb.org) entnommen oder mit Hyperchem Professional (Version 7.5) von Hypercube Inc. generiert.

Die Modelle der DNA *minicircles* wurden mit dem 3D-Dart webserver generiert. (<http://haddock.chem.uu.nl/dna/dna.php>). Nach meiner Anregung an den Betreiber des Web-servers wurde die Möglichkeit implementiert, auch eine Helix-Gangweite von 10,5 bp zu ermöglichen. Die in dieser Arbeit verwendeten Modelle haben allerdings noch eine Gangweite von nur 10 bp.

3D-Modelle von Molekülen wurden mit dem Discovery Studio Visualizer (Version 2.0 und 2.5) von Accelrys erstellt und bearbeitet. Komplexe (wie der aus Polyamiden und DNA) wurden aus mehreren Quellen zusammengefügt, energieoptimiert und angeordnet.

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
abs.	absolutiert
AcOH	Essigsäure
AFM	<i>atomic force microscopy</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
BS ³	<i>Bis</i> -(sulfosuccinimidyl)suberat
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	centi (x10 ⁻²)
Da	Dalton
DIPEA	Diisopropylethylamin (Hünig-Base)
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
Dp	(<i>N,N</i> -Dimethylmino)propylamin
<i>ds</i>	<i>double-stranded</i> (doppelsträngig)
DSS	Disuccinimidylsuberat
DX	<i>double crossover</i> (doppelte Kreuzung)
EDC	3-(Ethyliminomethylenamino)- <i>N,N</i> -dimethylpropyl-1-amin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop (-ie)
eq	Äquivalent (-e)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
f	femto (x10 ⁻¹⁵)
Fa.	Firma
g	Erdbeschleunigung
GABA	γ -Aminobuttersäure

HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> (Humanes Immundefizienz-Virus)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Hp	Hydroxypyrrol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
Hz	Hertz
Im	Imidazol
k	kilo ($\times 10^3$)
l	Liter
LED	<i>light-emitting diode</i> (Licht emittierende Diode)
LILBID	<i>laser induced liquid bead ionization/desorption</i> (Laser induzierte Flüssigkeits-Ionisation/ -Desorption)
μ	mikro ($\times 10^{-6}$)
m	(allein oder als Suffix) Meter
m	(als Präfix) milli ($\times 10^{-3}$)
M	(allein oder als Suffix) molar (mol/l)
M	(als Präfix) mega ($\times 10^6$)
mAU	<i>milli absorption units</i> (Milliabsorptionseinheit)
max.	maximal
min	Minuten
mP	Millipolarisationseinheit
MS	Massenspektrometrie
n	nano (10^{-9})
N	Newton
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
NPE	1-(2-Nitrophenyl)ethyl
NPP	2-(2-Nitrophenyl)propyl
nt	Nukleotid (-e)
OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i> (zur Analyse)
PA	Polyamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PEG	Polyethylenglycol
PX	<i>paranemic crossover</i> (Paranemische Kreuzung)
Py	Pyrrol
RCA	<i>rolling circle amplification</i>

RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphasen)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s	Sekunde
s.u.	siehe unten
SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
SPM	<i>scanning probe microscope</i> (Rastersondenmikroskop)
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonresonanz)
ss	<i>single-stranded</i> (einzelsträngig)
STM	<i>scanning tunneling microscope</i> (Rastertunnelmikroskop)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEG	Tetraethylenglycol
TEM	<i>transmission electron microscopy</i> (Transmissionselektronenmikroskopie)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TsCl	<i>para</i> -Toluolsulfonsäurechlorid
TX	<i>triple crossover</i> (dreifache Kreuzung)
U	<i>unit</i> (Einheit bei Enzymen)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

5.2 Literatur

- (1) Gazsó, A.; Greßler, S.; Schiemer, F. *Nano*; Springer Vienna: Vienna, 2007.
- (2) Barthlott, W.; Neinhuis, C. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* **1997**, *202*, 1-8.
- (3) Marmur, A. The Lotus Effect: Superhydrophobicity and Metastability. *Langmuir* **2004**, *20*, 3517-3519.
- (4) Hand, A. High-Index Lenses Push Immersion Beyond 32 nm - Semiconductor International **2009**.
- (5) Eigler, D. M.; Schweizer, E. K. Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope. *Nature* **1990**, *344*, 524-526.
- (6) Whitesides, G.; Mathias, J.; Seto, C. Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures. *Science* **1991**, *254*, 1312-1319.
- (7) John Pelesko *Self Assembly*; Chapman& Hall/CRC: Boca Raton, 2007.
- (8) Dobson, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature* **2003**, *426*, 884-890.
- (9) Klug, A. From Macromolecules to Biological Assemblies (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **1983**, *22*, 565-582.
- (10) Yusupov, M. M.; Yusupova, G. Z.; Baucom, A.; Lieberman, K.; Earnest, T. N.; Cate, J. H. D.; Noller, H. F. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **2001**, *292*, 883.
- (11) DeDuve, C. *Aus Staub geboren. Leben als kosmische Zwangsläufigkeit*; Spektrum Verlag: Heidelberg/Berlin/ Oxford, 1995.
- (12) Chargaff, E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* **1950**, *6*, 201-209.
- (13) Pauling, L.; Corey, R. B. A proposed structure for the nucleic acids. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1953**, *39*, 84-97.
- (14) Crick, F. The double helix: a personal view. *Nature* **1974**, *248*, 766-769.
- (15) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- (16) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*, 964-967.
- (17) Basham, B.; Schroth, G. P.; Ho, P. S. An A-DNA triplet code: thermodynamic rules for predicting A- and B-DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 6464-6468.
- (18) Franklin, R. E.; Gosling, R. G. Evidence for 2-Chain Helix in Crystalline Structure of Sodium Deoxyribonucleate. *Nature* **1953**, *172*, 156-157.
- (19) Dickerson, R.; Drew, H.; Conner, B.; Wing, R.; Fratini, A.; Kopka, M. The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* **1982**, *216*, 475-485.
- (20) Wang, A. H.; Quigley, G. J.; Kolpak, F. J.; Crawford, J. L.; van Boom, J. H.; van der Marel, G.; Rich, A. Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* **1979**, *282*, 680-686.
- (21) Rich, A.; Nordheim, A.; Wang, A. H. J. The Chemistry and Biology of Left-Handed Z-DNA. *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 791-846.
- (22) Pohl, F. M.; Jovin, T. M. Salt-induced co-operative conformational change of a synthetic DNA: Equilibrium and kinetic studies with poly(dG-dC). *J. Mol. Biol.* **1972**, *67*, 375-396.
- (23) Mao, C.; Sun, W.; Shen, Z.; Seeman, N. C. A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA. *Nature* **1999**, *397*, 144-146.
- (24) Rich, A.; Zhang, S. Z-DNA: the long road to biological function. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 566-572.
- (25) Leontis, N. B.; Stombaugh, J.; Westhof, E. The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3497-3531.
- (26) Radhakrishnan, I.; Patel, D. J. Solution structure of a pyrimidine purine pyrimidine DNA triplex containing TAT, C+GC and GTA triples. *Structure* **1994**, *2*, 17-32.
- (27) Felsenfeld, G.; Davies, D. R.; Rich, A. Formation of a Three-Stranded Polynucleotide Molecule. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2023-2024.

- (28) Zain, R.; Sun, J. Do natural DNA triple-helical structures occur and function in vivo? *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 862-870.
- (29) Moser, H.; Dervan, P. Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science* **1987**, *238*, 645-650.
- (30) Ryan, K.; Kool, E. Triplex-directed self-assembly of an artificial sliding clamp on duplex DNA. *Chem Biol* **1998**, *5*, 59-67.
- (31) Gellert, M.; Lipsett, M. N.; Davies, D. R. Helix formation by guanylic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1962**, *48*, 2013-2018.
- (32) Webba da Silva, M. Geometric Formalism for DNA Quadruplex Folding. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9738-9745.
- (33) Lane, A. N.; Chaires, J. B.; Gray, R. D.; Trent, J. O. Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5482-5515.
- (34) Davis, J. T. G-Quartets 40 Years Later: From 5prime-GMP to Molecular Biology and Supramolecular Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 668-698.
- (35) Campbell, N. H.; Parkinson, G. N. Crystallographic studies of quadruplex nucleic acids. *Methods* **2007**, *43*, 252-263.
- (36) Bugaut, A.; Balasubramanian, S. A Sequence-Independent Study of the Influence of Short Loop Lengths on the Stability and Topology of Intramolecular DNA G-Quadruplexes. *Biochemistry* **2008**, *47*, 689-697.
- (37) Lipps, H. J.; Rhodes, D. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends Cell. Biol.* **2009**, *19*, 414-422.
- (38) Siddiqui-Jain, A.; Grand, C. L.; Bearss, D. J.; Hurley, L. H. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 11593.
- (39) Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2908-2916.
- (40) Blackburn, E. H.; Gall, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J. Mol. Biol.* **1978**, *120*, 33-53.
- (41) Blackburn, E. H. Structure and function of telomeres. *Nature* **1991**, *350*, 569-573.
- (42) Schaffitzel, C.; Berger, I.; Postberg, J.; Hanes, J.; Lipps, H. J.; Plückthun, A. In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylylonychia lemnae* macronuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 8572-8577.
- (43) Macaya, R. F.; Schultze, P.; Smith, F. W.; Roe, J. A.; Feigon, J. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 3745-3749.
- (44) Schultze, P.; Macaya, R. F.; Feigon, J. Three-dimensional Solution Structure of the Thrombin-binding DNA Aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG). *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 1532-1547.
- (45) Mazumder, A.; Neamati, N.; Ojwang, J. O.; Sunder, S.; Rando, R. F.; Pommier, Y. Inhibition of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase by Guanosine Quartet Structures. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13762-13771.
- (46) Jing, N.; Rando, R. F.; Pommier, Y.; Hogan, M. E. Ion Selective Folding of Loop Domains in a Potent Anti-HIV Oligonucleotide. *Biochemistry* **1997**, *36*, 12498-12505.
- (47) Phan, A. T.; Mergny, J. Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4618-4625.
- (48) Gehring, K.; Leroy, J.; Guéron, M. A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs. *Nature* **1993**, *363*, 561-565.
- (49) Guéron, M.; Leroy, J. L. The i-motif in nucleic acids. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2000**, *10*, 326-331.
- (50) Kim, S. H.; SUSSMAN, J.; Suddath, F. L.; QUIGLEY, G.; MCPHERSON, A.; Wang, A. H. J.; Seeman, N. C.; Rich, A. Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science* **1974**, *185*, 435-440.
- (51) Robertus, J. D.; Ladner, J. E.; Finch, J. T.; Rhodes, D.; Brown, R. S.; Clark, B. F.; Klug, A. Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature* **1974**, *250*, 546-551.
- (52) Karlson, P.; Doenecke, D.; Koolman, J.; Fuchs, G.; Gerok, W. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2005.
- (53) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Na-*

- ture **1990**, *346*, 818-822.
- (54) Wilson, D. S.; Szostak, J. W. In Vitro Selection Of Functional Nucleic Acids. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611-647.
 - (55) Famulok, M. Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **1999**, *9*, 324-329.
 - (56) Hermann, T.; Patel, D. J. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science* **2000**, *287*, 820-825.
 - (57) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. Aptamer-Based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4928-4931.
 - (58) Flinders, J.; DeFina, S. C.; Brackett, D. M.; Baugh, C.; Wilson, C.; Dieckmann, T. Recognition of Planar and Nonplanar Ligands in the Malachite Green-RNA Aptamer Complex. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 62-72.
 - (59) Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N.; Altman, S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **1983**, *35*, 849-857.
 - (60) Tang, J.; Breaker, R. R. Structural diversity of self-cleaving ribozymes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 5784-5789.
 - (61) Symons, R. H. Small Catalytic RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 641-671.
 - (62) Martick, M.; Scott, W. G. Tertiary Contacts Distant from the Active Site Prime a Ribozyme for Catalysis. *Cell* **2006**, *126*, 309-320.
 - (63) Chen, I. A.; Salehi-Ashtiani, K.; Szostak, J. W. RNA Catalysis in Model protocell vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13213-13219.
 - (64) Powner, M. W.; Gerland, B.; Sutherland, J. D. Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions. *Nature* **2009**, *459*, 239-242.
 - (65) Fusz, S.; Eisenführ, A.; Srivatsan, S. G.; Heckel, A.; Famulok, M. A Ribozyme for the Aldol Reaction. *Chem Biol* **2005**, *12*, 941-950.
 - (66) Lincoln, T. A.; Joyce, G. F. Self-sustained replication of an RNA enzyme. *Science* **2009**, *323*, 1229-1232.
 - (67) Johnston, W. K.; Unrau, P. J.; Lawrence, M. S.; Glasner, M. E.; Bartel, D. P. RNA-Catalyzed RNA Polymerization: Accurate and General RNA-Templated Primer Extension. *Science* **2001**, *292*, 1319-1325.
 - (68) Joyce, G. F. The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* **2002**, *418*, 214-221.
 - (69) Hagerman, P. J. Flexibility of DNA. *Annu. Rev. Biophys. Bio.* **1988**, *17*, 265-286.
 - (70) Bednar, J.; Furrer, P.; Katritch, V.; Stasiak, A.; Dubochet, J.; Stasiak, A. Determination of DNA Persistence Length by Cryo-electron Microscopy. Separation of the Static and Dynamic Contributions to the Apparent Persistence Length of DNA. *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 579-594.
 - (71) Ross, E. D.; Hardwidge, P. R.; Maher III, L. J. HMG proteins and DNA flexibility in transcription activation. *Molecular and Cellular Biology* **2001**, *21*, 6598-6605.
 - (72) Dlakic, M.; Harrington, R. E. Bending and Torsional Flexibility of G/C-rich Sequences as Determined by Cyclization Assays. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 29945-29952.
 - (73) Chemla, Y. R.; Aathavan, K.; Michaelis, J.; Grimes, S.; Jardine, P. J.; Anderson, D. L.; Bustamante, C. Mechanism of Force Generation of a Viral DNA Packaging Motor. *Cell* **2005**, *122*, 683-692.
 - (74) Garcia, H. G.; Grayson, P.; Han, L.; Inamdar, M.; Kondev, J.; Nelson, P. C.; Phillips, R.; Widom, J.; Wiggins, P. A. Biological consequences of tightly bent DNA: The other life of a macromolecular celebrity. *Biopolymers* **2007**, *85*, 115-130.
 - (75) Jiang, W.; Chang, J.; Jakana, J.; Weigele, P.; King, J.; Chiu, W. Structure of epsilon15 bacteriophage reveals genome organization and DNA packaging/injection apparatus. *Nature* **2006**, *439*, 612-616.
 - (76) Floudas, C.; Fung, H.; McAllister, S.; Mönnigmann, M.; Rajgaria, R. Advances in protein structure prediction and de novo protein design: A review. *Chemical Engineering Science* **2006**, *61*, 966-988.
 - (77) Dahiyat, B. I.; Mayo, S. L. De Novo Protein Design: Fully Automated Sequence Selection. *Science* **1997**, *278*, 82-87.
 - (78) Siegel, J. B.; Zanghellini, A.; Lovick, H. M.; Kiss, G.; Lambert, A. R.; St.Clair, J. L.; Gallaher, J. L.; Hilvert, D.; Gelb, M. H.; Stoddard, B. L.; Houk, K. N.; Michael, F. E.; Baker, D. Computational Design of an Enzyme Catalyst for a Stereoselective Bimolecular Diels-Alder Reaction. *Science* **2010**, *329*, 309-313.
 - (79) Seeman, N. C. Nucleic acid junctions and lattices. *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237-247.

- (80) Holliday, R. A Mechanism for Gene Conversion in Fungi. *Genetics Research* **1964**, *5*, 282-304.
- (81) Kallenbach, N. R.; Ma, R.; Seeman, N. C. An immobile nucleic acid junction constructed from oligonucleotides. *Nature* **1983**, *305*, 829-831.
- (82) Chen, J.; Seeman, N. C. Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature* **1991**, *350*, 631-633.
- (83) Zheng, J.; Birktoft, J. J.; Chen, Y.; Wang, T.; Sha, R.; Constantinou, P. E.; Ginell, S. L.; Mao, C.; Seeman, N. C. From molecular to macroscopic via the rational design of a self-assembled 3D DNA crystal. *Nature* **2009**, *461*, 74-77.
- (84) Zhang, Y.; Seeman, N. C. Construction of a DNA-Truncated Octahedron. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1661-1669.
- (85) Goodman, R. P. Rapid Chiral Assembly of Rigid DNA Building Blocks for Molecular Nanofabrication. *Science* **2005**, *310*, 1661-1665.
- (86) Goodman, R. P.; Heilemann, M.; Doose, S.; Erben, C. M.; Kapanidis, A. N.; Turberfield, A. J. Reconfigurable, braced, three-dimensional DNA nanostructures. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 93-96.
- (87) Erben, C. M.; Goodman, R. P.; Turberfield, A. J. Single-Molecule Protein Encapsulation in a Rigid DNA Cage¹³. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7414-7417.
- (88) Fu, T. J.; Seeman, N. C. DNA double-crossover molecules. *Biochemistry* **1993**, *32*, 3211-3220.
- (89) Kumara, M. T.; Nykypanchuk, D.; Sherman, W. B. Assembly Pathway Analysis of DNA Nanostructures and the Construction of Parallel Motifs. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 1971-1977.
- (90) Shen, Z.; Yan, H.; Wang, T.; Seeman, N. C. Paranemic Crossover DNA: A Generalized Holliday Structure with Applications in Nanotechnology. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1666-1674.
- (91) Lin, C.; Wang, X.; Liu, Y.; Seeman, N. C.; Yan, H. Rolling Circle Enzymatic Replication of a Complex Multi-Crossover DNA Nanostructure. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14475-14481.
- (92) Lin, C.; Rinker, S.; Wang, X.; Liu, Y.; Seeman, N. C.; Yan, H. In vivo cloning of artificial DNA nanostructures. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 17626-17632.
- (93) Winfree, E.; Liu, F.; Wenzler, L. A.; Seeman, N. C. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature* **1998**, *394*, 539-544.
- (94) Barish, R. D.; Schulman, R.; Rothmund, P. W.; Winfree, E. An information-bearing seed for nucleating algorithmic self-assembly. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 6054-6060.
- (95) Zhang, C.; Ko, S. H.; Su, M.; Leng, Y.; Ribbe, A. E.; Jiang, W.; Mao, C. Symmetry Controls the Face Geometry of DNA Polyhedra. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1413-1415.
- (96) He, Y.; Ye, T.; Su, M.; Zhang, C.; Ribbe, A. E.; Jiang, W.; Mao, C. Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra. *Nature* **2008**, *452*, 198-201.
- (97) Seeman, N. C. DNA in a material world. *Nature* **2003**, *421*, 427-431.
- (98) LaBean, T. H.; Winfree, E.; Reif, J. H. Experimental progress in computation by self-assembly of DNA tilings. *DIMACS Series in Discrete Mathematics and Theoretical Computer Science, American Mathematical Society, Providence* **2000**, *54*, 123-140.
- (99) Yan, H.; LaBean, T. H.; Feng, L.; Reif, J. H. Directed nucleation assembly of DNA tile complexes for barcode-patterned lattices. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 8103-8108.
- (100) Shih, W. M.; Quispe, J. D.; Joyce, G. F. A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron. *Nature* **2004**, *427*, 618-621.
- (101) Dietz, H.; Douglas, S. M.; Shih, W. M. Folding DNA into Twisted and Curved Nanoscale Shapes. *Science* **2009**, *325*, 725-730.
- (102) Douglas, S. M.; Dietz, H.; Liedl, T.; Högberg, B.; Graf, F.; Shih, W. M. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature* **2009**, *459*, 414-418.
- (103) Rothmund, P. W. K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* **2006**, *440*, 297-302.
- (104) Mathieu, F.; Liao, S.; Kopatsch, J.; Wang, T.; Mao, C.; Seeman, N. C. Six-Helix Bundles Designed from DNA. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 661-665.
- (105) Douglas, S. M.; Chou, J. J.; Shih, W. M. DNA-nanotube-induced alignment of membrane proteins for NMR structure determination. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 6644.
- (106) Liu, D.; Park, S. H.; Reif, J. H.; LaBean, T. H. DNA nanotubes self-assembled from triple-crossover tiles as templates for conductive nanowires. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 717-722.
- (107) Kuzuya, A.; Wang, R.; Sha, R.; Seeman, N. C. Six-Helix and Eight-Helix DNA Nanotubes Assembled from Half-Tubes. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1757-1763.

- (108) Yin, P.; Hariadi, R. F.; Sahu, S.; Choi, H. M. T.; Park, S. H.; LaBean, T. H.; Reif, J. H. Programming DNA Tube Circumferences. *Science* **2008**, *321*, 824-826.
- (109) Ke, Y.; Douglas, S. M.; Liu, M.; Sharma, J.; Cheng, A.; Leung, A.; Liu, Y.; Shih, W. M.; Yan, H. Multilayer DNA Origami Packed on a Square Lattice. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15903-15908.
- (110) Högberg, B.; Liedl, T.; Shih, W. M. Folding DNA Origami from a Double-Stranded Source of Scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 297-302.
- (111) Liedl, T.; Högberg, B.; Tytell, J.; Ingber, D. E.; Shih, W. M. Self-assembly of three-dimensional prestressed tensegrity structures from DNA. *Nat. Nanotechnol.* **2010**.
- (112) Andersen, E. S.; Dong, M.; Nielsen, M. M.; Jahn, K.; Subramani, R.; Mamdouh, W.; Golas, M. M.; Sander, B.; Stark, H.; Oliveira, C. L. P. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature* **2009**, *459*, 73-76.
- (113) Shih, W. M.; Lin, C. Knitting complex weaves with DNA origami. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2010**, *20*, 276-282.
- (114) Heckel, A.; Famulok, M. Building objects from nucleic acids for a nanometer world. *Biochimie* **2008**, *90*, 1096-1107.
- (115) Lin, C.; Liu, Y.; Yan, H. Designer DNA Nanoarchitectures. *Biochemistry* **2009**, *48*, 1663-1674.
- (116) Aldaye, F. A.; Palmer, A. L.; Sleiman, H. F. Assembling Materials with DNA as the Guide. *Science* **2008**, *321*, 1795.
- (117) Seeman, N. C. Nanomaterials Based on DNA. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 65-87.
- (118) Modi, S.; Bhatia, D.; Simmel, F. C.; Krishnan, Y. Structural DNA Nanotechnology: From Bases to Bricks, From Structure to Function. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2010**, *1*, 1994-2005.
- (119) Rothmund, P. W. K. In *Nanotechnology: Science and Computation*; 2006; S. 3-21.
- (120) Beissenhirtz, M. K.; Willner, I. DNA-based machines. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3392-3401.
- (121) Liedl, T.; Sobey, T. L.; Simmel, F. C. DNA-based nanodevices. *Nano Today* **2007**, *2*, 36-41.
- (122) Simmel, F. C.; Yurke, B. DNA-based Nanodevices. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* **2004**, *2*, 495-504.
- (123) Bath, J.; Turberfield, A. J. DNA nanomachines. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 275-284.
- (124) Zhang, D. Y.; Winfree, E. Control of DNA Strand Displacement Kinetics Using Toehold Exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17303-17314.
- (125) Sherman, W. B.; Seeman, N. C. A Precisely Controlled DNA Biped Walking Device. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1203-1207.
- (126) Omabegho, T.; Sha, R.; Seeman, N. C. A Bipedal DNA Brownian Motor with Coordinated Legs. *Science* **2009**, *324*, 67-71.
- (127) Gu, H.; Chao, J.; Xiao, S.; Seeman, N. C. A proximity-based programmable DNA nanoscale assembly line. *Nature* **2010**, *465*, 202-205.
- (128) Bath, J.; Green, S. J.; Turberfield, A. J. A Free-Running DNA Motor Powered by a Nicking Enzyme. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4358-4361.
- (129) Pei, R.; Taylor, S. K.; Stefanovic, D.; Rudchenko, S.; Mitchell, T. E.; Stojanovic, M. N. Behavior of polycatalytic assemblies in a substrate-displaying matrix. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12693-12699.
- (130) Alberti, P.; Bourdoncle, A.; Sacc?, B.; Lacroix, L.; Mergny, J. DNA nanomachines and nanostructures involving quadruplexes. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3383-3391.
- (131) Liu, D.; Balasubramanian, S. A Proton-Fuelled DNA Nanomachine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5734-5736.
- (132) Wang, S.; Liu, H.; Liu, D.; Ma, X.; Fang, X.; Jiang, L. Enthalpy-Driven Three-State Switching of a Superhydrophilic/Superhydrophobic Surface. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3915-3917.
- (133) Liu, H.; Xu, Y.; Li, F.; Yang, Y.; Wang, W.; Song, Y.; Liu, D. Light-Driven Conformational Switch of i-Motif DNA13. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2515-2517.
- (134) Tashiro, R.; Sugiyama, H. A Nanothermometer Based on the Different pi Stackings of B- and Z-DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 6018-6020.
- (135) Liu, J.; Cao, Z.; Lu, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 1948-1998.
- (136) Adleman, L. Molecular computation of solutions to combinatorial problems. *Science* **1994**, *266*, 1021-1024.
- (137) Faulhammer, D.; Cukras, A. R.; Lipton, R. J.; Landweber, L. F. Molecular computation: RNA solutions to chess problems. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 1385-1389.
- (138) Stojanovic, M. N.; Stefanovic, D. A deoxyribozyme-based molecular automaton. *Nat. Biotechnol.*

- 2003, 21, 1069-1074.
- (139) Keren, K.; Berman, R. S.; Braun, E. Patterned DNA Metallization by Sequence-Specific Localization of a Reducing Agent. *Nano Lett.* **2004**, 4, 323-326.
- (140) Wirges, C. T.; Timper, J.; Fischler, M.; Sologubenko, A.; Mayer, J.; Simon, U.; Carell, T. Controlled Nucleation of DNA Metallization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 219-223.
- (141) Kopka, M. L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R. E. The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, 82, 1376-1380.
- (142) Dervan, P. B. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorgan. Med. Chem.* **2001**, 9, 2215-2235.
- (143) Mrksich, M.; Dervan, P. B. Recognition in the Minor Groove of DNA at 5'-(A,T)GCGC(A,T)-3' by a Four Ring Tripeptide Dimer. Reversal of the Specificity of the Natural Product Distamycin. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3325-3332.
- (144) Geierstanger, B. H.; Mrksich, M.; Dervan, P. B.; Wemmer, D. E. Design of a GC-specific DNA minor groove-binding peptide. *Science* **1994**, 266, 646-650.
- (145) White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. Recognition of the four Watson-Crick base pairs in the DNA minor groove by synthetic ligands. *Nature* **1998**, 391, 468-471.
- (146) Dervan, P. B. Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 284-299.
- (147) Chenoweth, D. M.; Viger, A.; Dervan, P. B. Fluorescent Sequence-Specific dsDNA Binding Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2216-2217.
- (148) Rucker, V. C.; Foister, S.; Melander, C.; Dervan, P. B. Sequence Specific Fluorescence Detection of Double Strand DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1195-1202.
- (149) Dickinson, L. A.; Gulizia, R. J.; Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Mosier, D. E.; Gottesfeld, J. M.; Dervan, P. B. Inhibition of RNA polymerase II transcription in human cells by synthetic DNA-binding ligands. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 12890-12895.
- (150) Mapp, A. K.; Ansari, A. Z.; Ptashne, M.; Dervan, P. B. Activation of gene expression by small molecule transcription factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 3930.
- (151) Cohen, J. D.; Sadowski, J. P.; Dervan, P. B. Programming multiple protein patterns on a single DNA nanostructure. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 402-403.
- (152) Cohen, J.; Sadowski, J.; Dervan, P. Addressing Single Molecules on DNA Nanostructures. *Angew. Chem.* **2007**, 119, 8102-8105.
- (153) Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. Recognition of Seven Base Pair Sequences in the Minor Groove of DNA by Ten-Ring Pyrrole-Imidazole Polyamide Hairpins. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7636-7644.
- (154) Demidov, V. Two sides of the coin: affinity and specificity of nucleic acid interactions. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, 29, 62-71.
- (155) Chenoweth, D. M.; Harki, D. A.; Dervan, P. B. Solution-Phase Synthesis of Pyrrole-Imidazole Polyamides. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 2215-2235.
- (156) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- (157) Schmidt, T. L. *Sequenzspezifische Verknüpfung zweier DNA-Helices durch DNA-bindende Polyamide (Diplomarbeit)*; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2005.
- (158) Lottspeich, F. *Bioanalytik*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 1998.
- (159) Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56, 930.
- (160) Gross, L.; Mohn, F.; Moll, N.; Liljeroth, P.; Meyer, G. The Chemical Structure of a Molecule Resolved by Atomic Force Microscopy. *Science* **2009**, 325, 1110-1114.
- (161) Engel, A.; Schoenenberger, C.; Müller, D. J. High resolution imaging of native biological sample surfaces using scanning probe microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 279-284.
- (162) Müller, D. J. AFM: A Nanotool in Membrane Biology. *Biochemistry* **2008**, 47, 7986-7998.
- (163) Mastrangelo, I. A.; Ahmed, M.; Sato, T.; Liu, W.; Wang, C.; Hough, P.; Smith, S. O. High-resolution atomic force microscopy of soluble Abeta42 oligomers. *J. Mol. Biol.* **2006**, 358, 106-119.
- (164) van Noort, J. The coiled-coil of the human Rad50 DNA repair protein contains specific segments of increased flexibility. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 7581-7586.
- (165) Henderson, E.; Haydon, P.; Sakaguchi, D. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science* **1992**, 257, 1944-1946.

- (166) Lee, G. U.; Kidwell, D. A.; Colton, R. J. Sensing Discrete Streptavidin-Biotin Interactions with Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **1994**, *10*, 354-357.
- (167) Lee, G.; Chrisey, L.; Colton, R. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science* **1994**, *266*, 771-773.
- (168) Oesterhelt, F.; Oesterhelt, D.; Pfeiffer, M.; Engel, A.; Gaub, H. E.; Müller, D. J. Unfolding Pathways of Individual Bacteriorhodopsins. *Science* **2000**, *288*, 143-146.
- (169) Helenius, J.; Heisenberg, C.; Gaub, H. E.; Müller, D. J. Single-cell force spectroscopy. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 1785-1791.
- (170) Piner, R. D.; Zhu, J.; Xu, F.; Hong, S.; Mirkin, C. A. "Dip-Pen" Nanolithography. *Science* **1999**, *283*, 661-663.
- (171) Koo, H. S.; Wu, H. M.; Crothers, D. M. DNA bending at adenine· thymine tracts. *Nature* **1986**, *320*, 501-506.
- (172) Trifonov, E. N.; Sussman, J. L. The pitch of chromatin DNA is reflected in its nucleotide sequence. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, *77*, 3816.
- (173) Hagerman, P. J. Sequence-directed curvature of DNA. *Nature* **1986**, *321*, 449-450.
- (174) Munteanu, M. G.; Vlahovicek, K.; Parthasarathy, S.; Simon, I.; Pongor, S. Rod models of DNA: sequence-dependent anisotropic elastic modelling of local bending phenomena. *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 341-347.
- (175) Vlahovicek, K.; Pongor, S. model.it : building three dimensional DNA models from sequence data. *Bioinformatics* **2000**, *16*, 1044-1045.
- (176) Hud, N. V.; Plavec, J. A unified model for the origin of DNA sequence-directed curvature. *Biopolymers* **2003**, *69*, 144-158.
- (177) Maki, A. S.; Kim, T.; Kool, E. T. Direct Comparison of A- and T-Strand Minor Groove Interactions in DNA Curvature at A Tracts. *Biochemistry* **2004**, *43*, 1102-1110.
- (178) Maki, A. DNA curvature at A tracts containing a non-polar thymine mimic. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 1059-1066.
- (179) Tchernenko, V.; Halvorson, H. R.; Lutter, L. C. Topological Measurement of an A-tract Bend Angle: Effect of Magnesium. *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 55-63.
- (180) Crothers, D. M.; Haran, T. E.; Nadeau, J. G. Intrinsically bent DNA. *J. Biol. Chem* **1990**, *265*, 7093-7096.
- (181) Nelson, H. C. M.; Finch, J. T.; Luisi, B. F.; Klug, A. The structure of an oligo(dA)·oligo(dT) tract and its biological implications. *Nature* **1987**, *330*, 221-226.
- (182) MacDonald, D.; Herbert, K.; Zhang, X.; Polgruto, T.; Lu, P. Solution structure of an A-tract DNA bend. *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 1081-1098.
- (183) Dixit, S. B.; Pitici, F.; Beveridge, D. L. Structure and axis curvature in two dA6dT6 DNA oligonucleotides: Comparison of molecular dynamics simulations with results from crystallography and NMR spectroscopy. *Biopolymers* **2004**, *75*, 468-479.
- (184) Du, Q.; Kotlyar, A.; Vologodskii, A. Kinking the double helix by bending deformation. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1120.
- (185) Ulanovsky, L.; Bodner, M.; Trifonov, E. N.; Choder, M. Curved DNA: design, synthesis, and circularization. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 862-866.
- (186) *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*; Beaucage, S. L.; Bergstrom, D. E.; Herdewijn, P.; Matsuda, A., Hrsg.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2001.
- (187) Rasched, G.; Ackermann, D.; Schmidt, T. L.; Broekmann, P.; Heckel, A.; Famulok, M. DNA Minicircles with Gaps for Versatile Functionalization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 967-970.
- (188) Dirks, R. M.; Lin, M.; Winfree, E.; Pierce, N. A. Paradigms for computational nucleic acid design. *Nucl. Acids Res.* **2004**, *32*, 1392-1403.
- (189) Seeman, N. C. De novo design of sequences for nucleic acid structural engineering. *J. Biomol. Struct. Dyn* **1990**, *8*, 573-581.
- (190) Dirks, R. M.; Bois, J. S.; Schaeffer, J. M.; Winfree, E.; Pierce, N. A. Thermodynamic Analysis of Interacting Nucleic Acid Strands. *SLAM Rev.* **2007**, *49*, 65.
- (191) Goodman, R. P. NANEV: a program employing evolutionary methods for the design of nucleic acid nanostructures. *BioTechniques* **2005**, *38*, 548-550.
- (192) Andersen, E. S.; Dong, M.; Nielsen, M. M.; Jahn, K.; Lind-Thomsen, A.; Mamdouh, W.; Gothelf, K. V.; Besenbacher, F.; Kjems, J. DNA Origami Design of Dolphin-Shaped Structures with Flexible

- Tails. *ACS nano* **2008**, *2*, 1213-1218.
- (193) Owczarzy, R.; Tataurov, A. V.; Wu, Y.; Manthey, J. A.; McQuisten, K. A.; Almagbrazi, H. G.; Pedersen, K. F.; Lin, Y.; Garretson, J.; McEntagart, N. O.; Sailor, C. A.; Dawson, R. B.; Peek, A. S. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W163-169.
- (194) Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406-3415.
- (195) SantaLucia, J.; Hicks, D. The Thermodynamics Of DNA Structural Motifs. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, *33*, 415-440.
- (196) Tyagi, S.; Kramer, F. R. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nat Biotech* **1996**, *14*, 303-308.
- (197) Edayathumangalam, R. S.; Weyermann, P.; Gottesfeld, J. M.; Dervan, P. B.; Luger, K. Molecular recognition of the nucleosomal "supergroove". *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 6864-6869.
- (198) Baird, E. E.; Dervan, P. B. Solid Phase Synthesis of Polyamides Containing Imidazole and Pyrrole Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6141-6146.
- (199) Rasched, G. *Aufbau von DNA Nanoarchitekturen mittels funktionalisierter DNA Bausteine (Dissertation)*; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2007.
- (200) Schlenzog, M. D.; Gronewold, T. M. A.; Tewes, M.; Famulok, M.; Quandt, E. A Love-wave biosensor using nucleic acids as ligands. *Sensor Actuator B-Chem.* **2004**, *101*, 308-315.
- (201) Schmidt, T. L.; Nandi, C. K.; Rasched, G.; Parui, P. P.; Brutschy, B.; Famulok, M.; Heckel, A. Polyamide Struts for DNA Architectures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4382-4384.
- (202) Schwille, P.; Haustein, E. Fluorescence Correlation Spectroscopy. An Introduction to its Concepts and Applications. *biophysics.org* **2001**.
- (203) Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. *Cell Biochem. Biophys* **2001**, *34*, 383-408.
- (204) Nandi, C.; Parui, P.; Schmidt, T.; Heckel, A.; Brutschy, B. Binding of hairpin polyamides to DNA studied by fluorescence correlation spectroscopy for DNA nanoarchitectures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390*, 1595-1603.
- (205) Swalley, S. E.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. Discrimination of 5'-GGGG-3', 5'-GCGC-3', and 5'-GGCC-3' Sequences in the Minor Groove of DNA by Eight-Ring Hairpin Polyamides. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6953-6961.
- (206) Saccà, B.; Meyer, R.; Niemeyer, C. M. Analysis of the Self-Assembly of 4x4 DNA Tiles by Temperature-Dependent FRET Spectroscopy. *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 3239-3248.
- (207) Saccà, B.; Meyer, R.; Feldkamp, U.; Schroeder, H.; Niemeyer, C. High-Throughput, Real-Time Monitoring of the Self-Assembly of DNA Nanostructures by FRET Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2135-2137.
- (208) Schulman, R.; Winfree, E. Synthesis of crystals with a programmable kinetic barrier to nucleation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 15236-15241.
- (209) Ackermann, D.; Rasched, G.; Verma, S.; Schmidt, T. L.; Heckel, A.; Famulok, M. Assembly of dsDNA nanocircles into dimeric and oligomeric aggregates. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4154-4156.
- (210) Sun, X.; Hyeon Ko, S.; Zhang, C.; Ribbe, A. E.; Mao, C. Surface-Mediated DNA Self-Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13248-13249.
- (211) Sushko, M. L.; Shluger, A. L.; Rivetti, C. Simple model for DNA adsorption onto a mica surface in 1: 1 and 2: 1 electrolyte solutions. *Langmuir* **2006**, *22*, 7678-7688.
- (212) Podestà, A.; Indrieri, M.; Brogioli, D.; Manning, G. S.; Milani, P.; Guerra, R.; Finzi, L.; Dunlap, D. Positively Charged Surfaces Increase the Flexibility of DNA. *Biophysical Journal* **2005**, *89*, 2558-2563.
- (213) Kleinekofort, W.; Pfenninger, A.; Plomer, T.; Christian Griesinger; Brutschy, B. Observation of noncovalent complexes using laser-induced liquid beam ionization/desorption. *Int. J. Mass Spectrom.* **1996**, *156*, 195-202.
- (214) Kleinekofort, W.; Schweitzer, M.; Engels, J. W.; Brutschy, B. Analysis of double-stranded oligonucleotides by laser-induced liquid beam mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **1997**, *163*, L1-L4.
- (215) Kleinekofort, W.; Avdiev, J.; Brutschy, B. A new method of laser desorption mass spectrometry for the study of biological macromolecules. *Int. J. Mass Spectrom.* **1996**, *152*, 135-142.
- (216) Sakamoto, S.; Yamaguchi, K. Hyperstranded DNA Architectures Observed by Cold-Spray Ionization Mass Spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 905-908.

- (217) Hoffmann, J.; Schmidt, T. L.; Heckel, A.; Brutschy, B. Probing the limits of liquid droplet laser desorption mass spectrometry in the analysis of oligonucleotides and nucleic acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 2176-2180.
- (218) Kretzschmar, M.; Meisterernst, M.; Scheidereit, C.; Li, G.; Roeder, R. G. Transcriptional regulation of the HIV-1 promoter by NF-kappa B in vitro. *Genes & Development* **1992**, *6*, 761-774.
- (219) Cassiday, L. A.; Lebruska, L. L.; Benson, L. M.; Naylor, S.; Owen, W. G.; Maher, L. J. Binding stoichiometry of an RNA aptamer and its transcription factor target. *Anal. Biochem.* **2002**, *306*, 290-297.
- (220) Day, Y. S. N.; Bacon, S. L.; Hughes-Thomas, Z.; Blackburn, J. M.; Sutherland, J. D. Mutational analysis of the kinetics and thermodynamics of transcription factor NF-kappaB homodimerisation. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 1192-1199.
- (221) Koehler, R. T.; Peyret, N. Thermodynamic properties of DNA sequences: characteristic values for the human genome. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 3333-3339.
- (222) Chavali, S.; Mahajan, A.; Tabassum, R.; Maiti, S.; Bharadwaj, D. Oligonucleotide properties determination and primer designing: a critical examination of predictions. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 3918-3925.
- (223) Luan, B.; Aksimentiev, A. DNA Attraction in Monovalent and Divalent Electrolytes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15754-15755.
- (224) Besteman, K.; Van Eijk, K.; Lemay, S. G. Charge inversion accompanies DNA condensation by multivalent ions. *Nat Phys* **2007**, *3*, 641-644.
- (225) Hud, N. V.; Downing, K. H. Cryoelectron microscopy of lambda phage DNA condensates in vitreous ice: the fine structure of DNA toroids. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 14925.
- (226) Morgner, N.; Barth, H. D.; Schmidt, T. L.; Heckel, A.; Scheffer, U.; Göbel, M.; Fucini, P.; Brutschy, B. Detecting Specific Ligand Binding to Nucleic Acids: A Test for Ultrasoft Laser Mass Spectrometry. *Z. Phys. Chem.* **2007**, *221*, 689-704.
- (227) Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*; 2. Aufl.; Academic Press, 2008.
- (228) Viladkar, S. M. Guanine rich oligonucleotide-amino acid/peptide conjugates: preparation and characterization. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 495-502.
- (229) Wong, R.; Dolman, S. J. Isothiocyanates from Tosyl Chloride Mediated Decomposition of in Situ Generated Dithiocarbamic Acid Salts. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3969-3971.
- (230) Thevarpadam, J. *Neue DNA-Polyamid-Konjugate und Photoaktivierung für DNA-Nanoarchitekturen*; Diplomarbeit, Goethe Universität Frankfurt, 2010.
- (231) Biyani, M.; Nishigaki, K. Structural characterization of ultra-stable higher-ordered aggregates generated by novel guanine-rich DNA sequences. *Gene* **2005**, *364*, 130-138.
- (232) Protozanova, E.; Macgregor, R. B. Frayed Wires: A Thermally Stable Form of DNA with Two Distinct Structural Domains. *Biochemistry* **1996**, *35*, 16638-16645.
- (233) Marsh, T. C.; Vesenka, J.; Henderson, E. A new DNA nanostructure, the G-wire, imaged by scanning probe microscopy. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 696-700.
- (234) Li, Z.; Mirkin, C. A. G-Quartet-Induced Nanoparticle Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11568-11569.
- (235) Fahlman, R. P.; Hsing, M.; Sporer-Tuhten, C. S.; Sen, D. Duplex Pinching: A Structural Switch Suitable for Contractile DNA Nanoconstructions. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1073-1078.
- (236) Fahlman, R. P.; Sen, D. Cation-regulated self-association of "synapsable" DNA duplexes. *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 237-244.
- (237) Venczel, E. A.; Sen, D. Synapsable DNA. *J. Mol. Biol.* **1996**, *257*, 219-224.
- (238) Fahlman, R. P.; Sen, D. "Synapsable" DNA Double Helices: Self-Selective Modules for Assembling DNA Superstructures. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11079-11085.
- (239) Chen, J.; Liu, D.; Lee, A. H. F.; Qi, J.; Chan, A. S. C.; Li, T. G-quadruplex as a new class of structural entities for directing the formation of circular oligodeoxyribonucleotides. *Chem. Commun.* **2002**, 2686-2687.
- (240) Liang, X.; Nishioka, H.; Takenaka, N.; Asanuma, H. A DNA Nanomachine Powered by Light Irradiation. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 702-705.
- (241) Zhou, M.; Liang, X.; Mochizuki, T.; Asanuma, H. A Light-Driven DNA Nanomachine for the Efficient Photoswitching of RNA Digestion. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2167-2170.
- (242) Mayer, G.; Heckel, A. Biologically Active Molecules with a Light Switch. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**,

- 45, 4900-4921.
- (243) Kröck, L.; Heckel, A. Photoinduced Transcription by Using Temporarily Mismatched Caged Oligonucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 471-473.
- (244) Buff, M.; Mack, T.; Heckel, A. Light-Activatable Nucleic Acids 'Caged' at the Nucleobases. *Chimia* **2009**, *63*, 261-264.
- (245) Mayer, G.; Kröck, L.; Mikat, V.; Engeser, M.; Heckel, A. Light-induced formation of G-quadruplex DNA secondary structures. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1966 – 1970.
- (246) Lund, K.; Manzo, A. J.; Dabby, N.; Michelotti, N.; Johnson-Buck, A.; Nangreave, J.; Taylor, S.; Pei, R.; Stojanovic, M. N.; Walter, N. G.; Winfree, E.; Yan, H. Molecular robots guided by prescriptive landscapes. *Nature* **2010**, *465*, 206-210.
- (247) Stoddart, J. F. The chemistry of the mechanical bond. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1802-1820.
- (248) Green, J. E.; Wook Choi, J.; Boukai, A.; Bunimovich, Y.; Johnston-Halperin, E.; DeIonno, E.; Luo, Y.; Sheriff, B. A.; Xu, K.; Shik Shin, Y.; Tseng, H.; Stoddart, J. F.; Heath, J. R. A 160-kilobit molecular electronic memory patterned at 10¹¹ bits per square centimetre. *Nature* **2007**, *445*, 414-417.
- (249) Ackermann, D.; Schmidt, T. L.; Hannam, J. S.; Purohit, C. S.; Heckel, A.; Famulok, M. A double-stranded DNA rotaxane. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 436-442.
- (250) Schomburg, I. Nomenklatur der Rotaxane und Pseudorotaxane. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4719-4738.
- (251) Beyer, S.; Nickels, P.; Simmel, F. C. Periodic DNA Nanotemplates Synthesized by Rolling Circle Amplification. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 719-722.
- (252) Liu, H.; Chen, Y.; He, Y.; Ribbe, A. E.; Mao, C. Approaching The Limit: Can One DNA Oligonucleotide Assemble into Large Nanostructures? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1942-1945.
- (253) Amzallag, A.; Vaillant, C.; Jacob, M.; Unser, M.; Bednar, J.; Kahn, J. D.; Dubochet, J.; Stasiak, A.; Maddocks, J. H. 3D reconstruction and comparison of shapes of DNA minicircles observed by cryo-electron microscopy. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e125.
- (254) Aldaye, F. A.; Lo, P. K.; Karam, P.; McLaughlin, C. K.; Cosa, G.; Sleiman, H. F. Modular construction of DNA nanotubes of tunable geometry and single- or double-stranded character. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 349-352.
- (255) Carneiro, K. M. M.; Aldaye, F. A.; Sleiman, H. F. Long-Range Assembly of DNA into Nanofibers and Highly Ordered Networks Using a Block Copolymer Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 679-685.
- (256) Aldaye, F. A.; Sleiman, H. F. Modular Access to Structurally Switchable 3D Discrete DNA Assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13376-13377.
- (257) Gonçalves, D. P. N.; Schmidt, T. L.; Koepfel, M. B.; Heckel, A. DNA Minicircles Connected via G-Quadruplex Interaction Modules. *Small* **2010**, *6*, 1347-1352.

5.3 Danksagung

Wer schnell gehen will, geht allein.
Aber wer weit gehen will, geht zusammen.

(Afrikanisches Sprichwort)

Mein Dank gilt allen, die mir in den letzten Jahren zur Seite gestanden sind und ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Namentlich hervorheben und besonders danken möchte ich:

Zu allererst meiner Familie, besonders meinen Eltern. Wären sie nicht aus der kommunistischen Ceausescu-Diktatur entflohen und hätten sie auch später nicht alles daran gesetzt, um meiner Schwester und mir eine gute Ausbildung zu ermöglichen, wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Meiner Verlobten Dr. Diana P. Nunes Gonçalves, die mir stets eine wichtige Stütze war und ist und die ich über alles liebe.

Prof. Dr. Alex Heckel für das spannende Thema, das einzigartig freundschaftliche Miteinander, die vielen Freiheiten, mich nicht nur wissenschaftlich zu entfalten und die exzellente Betreuung. Ich rechne nicht damit, noch einmal so einen Chef zu haben.

Herrn Prof. Dr. Schwalbe für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Martin Koepfel dafür, dass er der beste Freund und Laborpartner ist, den man sich denken kann, für die vielen fruchtbaren Diskussionen und Ideen und ein rechtes Wort zur rechten Zeit.

Meinen Laborkollegen für ihre Geduld nicht nur bei meinen *group meetings*, für das gute Arbeitsklima und die vielen Diskussionen.

Meinen Praktikanten Jerome Mertens, Maximilian Hützler, Bastian Menges, Simon Ahrens und „meiner“ Diplomandin Julie Thevarpadam für ihre engagierte Mitarbeit.

Dr. Alex Heckel, Julie Thevarpadam, Dr. Martin Koepfel, Tatjana Stöß, Dr. Damian Ackermann, Jan Hoffmann und Felix Friedrich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Meinem ehemaligen Mentor Prof. Dr. Michael Famulok für die wohlwollende Begleitung meines wissenschaftlichen Werdegangs und für die Bereitstellung der technischen und personellen Infrastruktur seines Arbeitskreises, welche meine Arbeit in Bonn stark erleichtert hat.

Den gesamten Gruppen von Prof. Dr. Famulok und Prof. Dr. Günter Meyer. Besonders aber Dr. Goran Rasched für wichtige Vorarbeiten und Dr. Damian Ackermann für zahllose fruchtbare Diskussionen und wertvolle Hilfestellungen.

Prof. Dr. Bernd Brutschy (Uni Frankfurt) für seine Unterstützung und seinem Arbeitskreis für die abwechslungsreichen Kooperationen, besonders Dr. Nina Morgner, Jan Hoffmann und Dr. Hans-Dieter Barth für die LILBID-Kooperationen und Dr. Partha Parui und Dr. Chayan Nandi für die FCS-Messungen.

Prof. Dr. Nadrian Seeman (New York University) für die Diskussionen mit und ohne Bier und für die Möglichkeit, einen Forschungsaufenthalt in seiner Abteilung zu absolvieren. Des Weiteren seiner Gruppe, besonders Dr. Roujie Sha.

Prof. Dr. Klaus Wandelt (Uni Bonn), Prof. Dr. Bernd Kolbesen (Uni Frankfurt) und Prof. Dr. Andreas Terfort für den Zugang zum AFM und der Infrastruktur ihrer jeweiligen Gruppen und Martin Lommel für die überaus wertvolle Vertiefung meiner AFM-Kenntnisse.

Prof. Dr. Harald Schwalbe und Jitendra Kumar für eine überaus interessante Kollaboration.

Prof. Dr. Dieter Hänssgen (Emeritus Uni Bonn) für die Förderung meines Werdeganges.

Dem namentlich nicht mehr bekannten Professor der Fachhochschule Köln, der bei einem Studienberatungs-Gespräch Anfang 2000 gemeint hat: “ Junger Mann, das ist hier nichts für Sie“ und mir geraten hat, nicht an die FH Köln zu gehen sondern „was Anständiges an einer Uni“ zu studieren. Ich hab’s getan und nicht bereut.

PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert für ihre beiden guten Ratschläge

Aldi für die nahrhaften Fertiggerichte für Spätschichten.

5.4 Lebenslauf Thorsten-Lars Schmidt

Persönliche Angaben:

Anschrift: Adenauerallee 37
53113 Bonn
t.l.schmidt@gmx.de

Staatsangehörigkeit: deutsch

geboren am: 9. Juni 1979
in: Mediaș (Mediasch), Rumänien



Ausbildung:

seit 4/2006 Doktorarbeit in Chemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn und seit 11/2007 an der Goethe-Universität Frankfurt am Main
Titel der Dissertation: Interaktionen für DNA-Nanoarchitekturen auf Basis von Polyamiden, G-Quadruplexen und lichtinduzierbaren Nukleinsäuren (Arbeitskreis Prof. Dr. Alexander Heckel)

5/2007-6/2007 Forschungsaufenthalt an der New York University (New York, USA) im Arbeitskreis von Prof. Dr. Nadrian Seeman

4/2000 – 11/2005 Studium der Chemie an der Universität Bonn
Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Michael Famulok unter der Betreuung von Dr. Alexander Heckel an der Universität Bonn
Abschluss: Diplom (Note: sehr gut)

4/2004 - 7/2004 Auslandssemester an der Univesrsidad de Asturias (Oviedo, Spanien) im Arbeitskreis von Prof. Dr. José Barluenga

10/1999 - 2/2000 Studium der neueren und neusten Geschichte, Politologie und Anglistik an der Universität Bonn

8/1989 - 6/1998 Beethovengymnasium Bonn
Abschluss: Abitur (Note 1,9)

Veröffentlichungen:

10 Erstveröffentlichungen (siehe S. I)
2 Veröffentlichungen in Vorbereitung

Konferenzen:

6/2010 DNA16, Hong Kong, China (Plenumsvortrag)
9/2009 Nano Biology Summer School, Universität Karlsruhe (Poster)
5/2009 DNA-based nanotechnology: Construction, mechanics and electronics, Dresden (Poster)
11/2007 Internationales Symposium: Templates in Chemistry and Beyond, Bonn (Poster)
6/2007 Chemical Biology Discussion Group (end of year meeting), New York Science Academy, New York, USA.
10/2006 Internationales Symposium: Complex Molecular Architectures on Surfaces, Bonn (Poster)

Sonstiges:

6/2010 Reisekostenstipendium der Willkomm-Stiftung für die Konferenz DNA16 (Hong Kong)
7/2001 – 11/2005 Stipendium der Friedrich-Ebert-Stiftung
11/2005 – 2/2006 Fahrradreise durch Chile und Argentinien
10/2002 – 2/2003 Fahrradreise durch Ecuador, Peru, Bolivien und Chile
1999 - 2009 Ehrenamtlicher Betreuer und Skilehrer bei Jugendfahrten
7/1998 – 7/1999 Zivildienst im Margarethe-Grundmann-Haus, Bonn (Wohn- und Begegnungszentrum für ältere Bürger e.V.)

Sprachen: Englisch (verhandlungssicher); Spanisch (fließend);
Französisch (Grundkenntnisse); Latinum

5.5 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Frankfurt a.M., den

.....

(Thorsten-Lars Schmidt)

