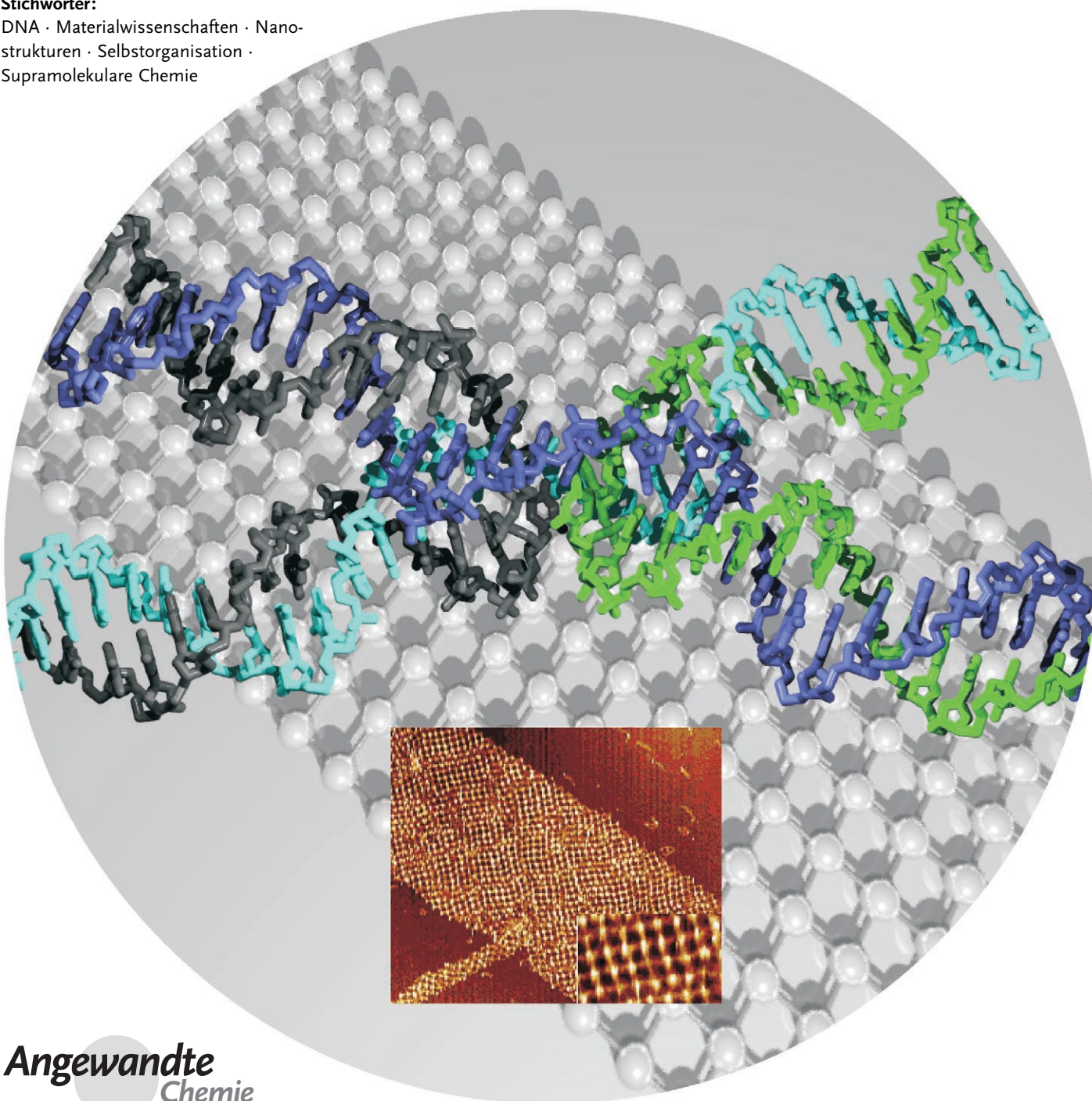


# Rationaler Entwurf von DNA-Nanoarchitekturen

Udo Feldkamp\* und Christof M. Niemeyer\*

**Stichwörter:**

DNA · Materialwissenschaften · Nanostrukturen · Selbstorganisation · Supramolekulare Chemie



**D**NA hat viele physikalische und chemische Eigenschaften, die sie zu einem leistungsfähigen Material für molekulare Konstruktionen im Nanometer-Maßstab machen. Insbesondere ihre Fähigkeit, Duplexe und andere Sekundärstrukturen durch vorhersagbare, Nucleotidsequenz-gesteuerte Hybridisierung zu bilden, ermöglicht den Entwurf programmierbarer Strukturmodule, die wiederum zu großen supramolekularen Anordnungen, Gerüsten und sogar zu mechanischen und logischen Funktionseinheiten zusammengefügt werden können. Trotz der breiten Vielfalt solcher Strukturmodule, die als Bausteine beim programmierten Zusammenbau von supramolekularen DNA-Nanoarchitekturen verwendet werden, sind den unterschiedlichen Modulen einige grundlegende Prinzipien des Entwurfs ihrer hierarchischen Konfiguration und der eingesetzten Nucleotidsequenzen gemein. Dieser Aufsatz gibt einen Überblick über dieses faszinierende und schnell wachsende Forschungsgebiet unter besonderer Berücksichtigung struktureller Aspekte.

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	1889
<b>2. Allgemeine Überlegungen zum Design von DNA-Sequenzen</b>	1890
<b>3. Eindimensionale DNA-Stränge zum Zusammenbau und zur Immobilisierung von Nichtnucleinsäure-Komponenten</b>	1892
<b>4. Design und Zusammenfügen von DNA-Motiven</b>	1893
<b>5. Dreidimensionale Strukturen aus DNA</b>	1900
<b>6. Anwendungen von DNA-Nanoarchitekturen</b>	1901
<b>7. Schlussfolgerungen</b>	1906

## 1. Einleitung

Biomoleküle wie Proteine und Nucleinsäuren haben nahezu perfekte Bindungseigenschaften, die in Milliarden Jahren der Evolution optimiert wurden. Daher werden Biomoleküle derzeit intensiv auf ihre Eignung als Bausteine und strukturbestimmende Komponenten für den Bottom-up-Aufbau von Materialien und Funktionseinheiten mit präziser Kontrolle im Nanometer-Längenbereich untersucht. Da sie durch chemische Synthese leichter verfügbar und einfacher zu handhaben sind als Proteine, werden Nucleinsäuren gegenwärtig bevorzugt für solche auf Selbstorganisation beruhende Verfahren zur Herstellung funktionaler Nanomaterialien verwendet.<sup>[1–4]</sup>

DNA ist ein besonders vielversprechender Kandidat für den Einsatz als Konstruktionsmaterial in den Nanowissenschaften. Trotz ihrer Einfachheit ermöglicht die enorme Spezifität der A-T- und G-C-Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindung die einfache Programmierung künstlicher DNA-Rezeptoren mithilfe des Vierbuchstabenalphabets. Die besondere Eignung von DNA, als molekularer Baustein genutzt zu werden, geht auch auf die Möglichkeit zurück, nahezu beliebige DNA-Sequenzen mit automatischen Verfahren zu synthetisieren<sup>[5]</sup> und beliebige DNA-Sequenzen mit der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) von mikroskopischen zu makroskopischen Mengen zu vervielfältigen.<sup>[6]</sup> Eine weitere attraktive Eigenschaft von DNA ist das Richtungsgedächtnis des Kettenmoleküls. Während eine DNA-Doppelhelix eigentlich ein flexibles Polymer ist, was eindrucksvoll durch die sehr kompakte Form der Chromosomen demonstriert wird, ist diese Flexibilität für sehr kurze Doppelstränge vernachlässigbar. Die Persistenzlänge, d. h. die Länge, bis zu der Polymere als starr und gerade

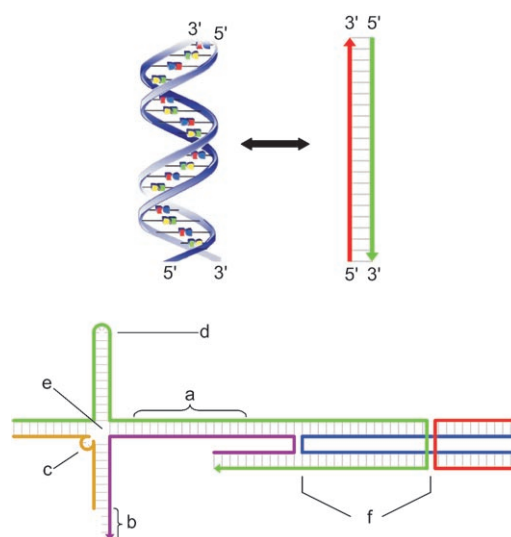
betrachtet werden können, beträgt etwa 50 nm, was 150 Basenpaaren in der Doppelhelix entspricht.<sup>[7]</sup> Unterhalb dieser Länge verhält sich doppelsträngige DNA (double stranded DNA, dsDNA) praktisch wie ein starrer Stab und kann daher als effizienter Abstandhalter zwischen zwei an den Enden befestigten funktionalen molekularen Komponenten dienen. Dahingegen ist einzelsträngige DNA (single stranded DNA, ssDNA) sehr flexibel und kann daher enge Schleifen und sogar 180°-Wendungen bilden. Somit können durch die Kombination bestimmter ssDNA- und dsDNA-Komponenten in einem künstlichen DNA-Motiv strukturell diverse Bausteine mit maßgeschneiderter Flexibilität und Starrheit hergestellt werden. Wie in diesem Aufsatz beschrieben wird, kann die Starrheit solcher künstlicher DNA-Motive die von linearer dsDNA sogar übertreffen.

Ein weiterer Vorteil von DNA als Konstruktionsmaterial ist ihre relativ hohe physikalisch-chemische Stabilität, die wesentlich höher ist als die von Proteinen. Daher können nanostrukturierte Materialien aus DNA unter den verschiedensten Umgebungsbedingungen synthetisiert, verarbeitet und aufbewahrt werden, ohne dass spezielle Vorkehrungen zur Vermeidung ihres Abbaus getroffen werden müssen. Weiterhin ist bemerkenswert, dass die Natur eine große Vielfalt hochspezifischer Enzyme bereithält, mit deren Hilfe

[\*] Dr. U. Feldkamp, Prof. Dr. C. M. Niemeyer  
Fachbereich Chemie  
Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik  
Universität Dortmund  
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)  
Fax: (+49) 231-755-7082  
E-mail: udo.feldkamp@uni-dortmund.de  
christof.niemeyer@uni-dortmund.de

eine Atom-genaue Verarbeitung von DNA-Materialien mit einer Präzision im Ångström-Bereich möglich ist. Zum Beispiel kann das Rückgrat von DNA-Molekülen, die durch chemische oder biologische Prozesse hergestellt wurden, spezifisch an vorgegebenen Bindungen durch Restriktions-Endonucleasen geschnitten werden, wodurch man in der Lage ist, monodisperse Lösungen von DNA-Molekülen mit genau definierter Länge und chemischer Zusammensetzung herzustellen. Kein anderes (polymere) Material bietet diese Vorteile, die für molekulare Konstruktionen in der Größenordnung von etwa 5 Nanometern bis in den Mikrometerbereich hinein ideal sind. Aufgrund dieser Vorteile ist DNA bereits vielfach für rationale Konstruktionen im Nanometerbereich verwendet worden,<sup>[1]</sup> und neue Fortschritte belegen ihre Eignung zur Herstellung von Anordnungen aus kolloidalen Komponenten, Proteinen und sogar nanomechanischen Funktionseinheiten.<sup>[1,3,4,8–11]</sup>

Die weitere Entwicklung dieses Gebietes erfordert allerdings ausgefeilte Methoden, um die Sequenzen der DNA-Nucleobasen von kurzen synthetischen Oligonucleotiden, die die Primärstruktur der endgültigen supramolekularen DNA-Architekturen bilden, gezielt auszuwählen. Diese Primärstruktur legt die Fähigkeit eines Oligonucleotids fest, mit anderen, (teilweise) komplementären Oligonucleotiden zu hybridisieren, wodurch gezielt Motive gebildet werden können, die z.B. intra- und intermolekulare Helices, Verzweigungs- („junctions“) und Kreuzungspunkte („crossovers“) oder auch Schleifen („loops“) enthalten (Abbildung 1). Diese Motive werden dann als Bausteine verwendet, die sich durch Hybridisierung überhängender Einzelstrangenden („sticky ends“) zu größeren zwei- und dreidimensionalen Überstrukturen zusammenfügen. Dieser Aufsatz soll einen Überblick über die Konstruktionsprinzipien geben, die bisher zur rationalen Herstellung von DNA-Nanoarchitekturen verwendet wurden. Hierbei werden allgemeine Konstruktionsprinzipien ebenso diskutiert wie grundlegende Regeln für den Entwurf von Basensequenzen zum Aufbau der Konstruktionsmotive. Schließlich sollen der aktuelle Stand der Forschung dargestellt und Schlüsse für zukünftige Perspektiven für DNA-basierte Nanomaterialien gezogen werden.



**Abbildung 1.** Die bekannte DNA-Doppelhelix (oben links) besteht aus zwei antiparallelen Strängen von Oligonucleotiden, die durch spezifische Watson-Crick-Wasserstoffbrücken verbunden sind, und wird schematisch als leiterartige Struktur dargestellt (oben rechts). Die Wahl geeigneter DNA-Sequenzen ermöglicht die Herstellung komplexer Motive, die a) Doppelhelixregionen, b) überhängende Enden (sticky ends), c) Ausbuchtungen (bulge loops), d) Haarnadelschleifen, e) Verzweigungspunkte (junctions) und f) Kreuzungspunkte (crossovers) enthalten (siehe schematische Darstellung unten). Man beachte, dass dreidimensionale Informationen wie Helices, Furchen und Winkel zwischen Helices in dieser schematischen Darstellung nicht enthalten sind. Die Pfeilspitzen zeigen die 5'→3'-Richtung der einzelnen Oligonucleotide an.

## 2. Allgemeine Überlegungen zum Design von DNA-Sequenzen

Der Entwurfs- und Konstruktionsprozess DNA-basierter Gerüstarchitekturen umfasst mehrere Schritte. Zunächst müssen sämtliche Anforderungen festgelegt werden, die das angestrebte Konstrukt für eine Anwendung erfüllen soll. Beispielsweise möchte man ein Gerüst aufbauen, um daran zielgerichtet andere Komponenten wie Nanopartikel oder Proteine zu immobilisieren. In diesem Fall muss festgelegt werden, ob das DNA-Gerüst starr oder flexibel sein soll. Ein weiterer Aspekt wäre die Frage, ob das Konstrukt als statisch



Udo Feldkamp ist wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Dortmund. Er wurde in Duisburg geboren und studierte Informatik in Kaiserslautern und Dortmund, wo er unter der Anleitung von Prof. Wolfgang Banzhaf über computergestütztes Design von DNA-Sequenzen promovierte. Seine Forschungsinteressen liegen schwerpunktmäßig in der DNA-basierten Nanotechnologie und im DNA-Computing, umfassen aber auch andere Gebiete der Bioinformatik und Computational Intelligence.



Christof M. Niemeyer ist seit 2002 Professor für Chemie an der Universität Dortmund (Lehrstuhl für Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik). Er studierte Chemie an der Philipps-Universität Marburg und promovierte in metallorganischer Chemie am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim bei Prof. Manfred T. Reetz. Es folgten ein Postdoc-Aufenthalt bei Prof. Charles R. Cantor am Center for Advanced Biotechnology in Boston (USA) und die Habilitation an der Universität Bremen über Synthese und Anwendungen von DNA-Protein-Konjugaten. Seine Forschungsinteressen gelten halbsynthetischen Konjugaten aus DNA-, Protein- und Nanopartikel-Bausteinen und deren Anwendungen in den Life-Sciences, der Katalyse und den Nanowissenschaften.



sches Gerüst oder als eine dynamische, mechanisch flexible Funktionseinheit wirken soll, die reversibel oder auch irreversibel Übergänge zwischen unterschiedlichen vorherbestimmbaren Konformationen durchlaufen soll. In Abhängigkeit von den gestellten Ansprüchen müssen dann individuelle Bausteine festgelegt werden, die entweder nur aus starren Komponenten bestehen, oder aber einzelsträngige Regionen enthalten, die oft als Toeholds bezeichnet werden. An solche Regionen können dann Effektor-Oligomere hybridisieren und, beispielsweise durch Verdrängung anderer Stränge, größere Konformationsänderungen auslösen.

Es muss ebenfalls festgelegt werden, ob symmetrische oder unsymmetrische Muster im Zuge des supramolekularen Zusammenbaus erzeugt werden sollen, ob und welche Periodizität im supramolekularen DNA-Gitter benötigt wird, in wie vielen Dimensionen das Gerüst wachsen soll und ob dieses Wachstum endlich oder unbeschränkt stattfinden soll.

In Abhängigkeit von diesen Anforderungen müssen entsprechende DNA-Motive ausgewählt werden, die ihrerseits Kreuzungspunkte, Schleifen und einzelsträngige Bindungsstellen (sticky ends) enthalten und so als Bausteine für die angestrebte Gerüstarchitektur geeignet sind. Diese Motive können auch weitere chemische Gruppen enthalten, die zur Immobilisierung weiterer Komponenten, wie z. B. Proteine oder Nanopartikel, genutzt werden. Wie wir später noch diskutieren werden, wurden hierzu bislang vorwiegend Biotin-modifizierte Schleifenelemente und Aptamersequenzen verwendet. Aptamere sind kurze Sequenzabschnitte, die aufgrund ihrer dreidimensionalen Konformationen räumlich komplementäre Zielstrukturen spezifisch erkennen.

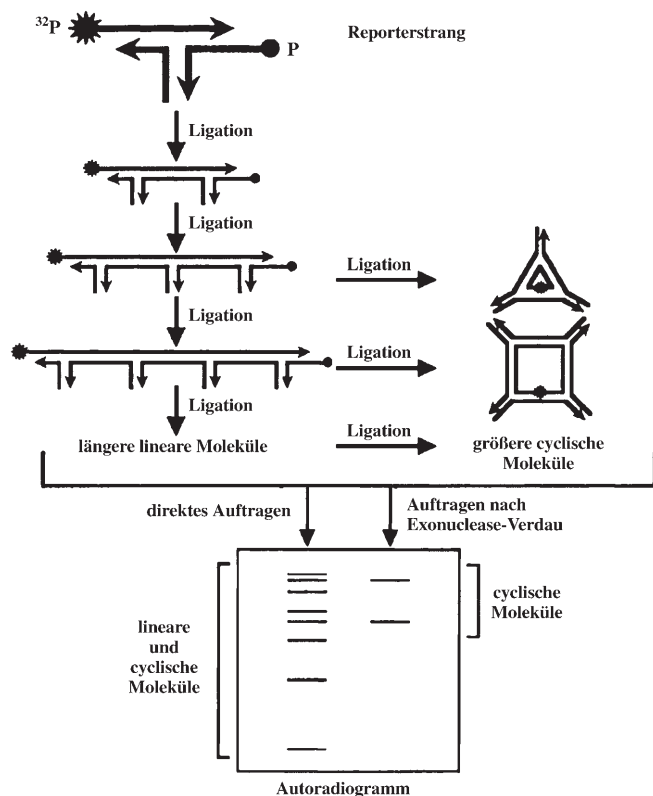
Zusätzlich zur Wahl des allgemeinen Motivtyps müssen auch dessen spezielle Eigenschaften definiert werden, die insbesondere die Länge (und damit die Zahl helicaler Windungen) der verwendeten DNA-Oligonucleotide und die Position festgelegter Subsequenzen in den Oligonucleotiden betreffen, wie z. B. das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Restriktionsschnittstellen, die zur Charakterisierung (siehe unten) oder für weitere Verarbeitungsschritte notwendig sind. Auch die Integration von Bindungsstellen, z. B. für den Einbau von Proteinen in das DNA-Gerüst, muss berücksichtigt werden. Von großer Bedeutung ist auch die Wahl der speziellen thermodynamischen Eigenschaften der verwendeten Oligonucleotide, d. h. die Auswahl geeigneter Schmelzpunkte bestimmter Sequenzabschnitte, um einen homogenen Zusammenbau zu gewährleisten oder um deutlich getrennte Hybridisierungsschritte einzelner Bausteine im Rahmen eines schrittweisen Zusammenbaus zu ermöglichen.

Um einen zuverlässigen und effizienten Zusammenbau zu erreichen, muss die Hybridisierung komplementärer DNA-Stränge so spezifisch wie möglich erfolgen. Dies bedeutet, dass die beabsichtigte Basenpaarung möglichst stabil sein muss, während alle unerwünschten Bindungen und Konformationen möglichst unwahrscheinlich sein sollten. Leider führt die einfache Maximierung der Affinität, z. B. durch Erhöhen von Länge und Gehalt an G- und C-Basenpaaren, üblicherweise nicht zu hoher Spezifität, da diese beiden Charakteristika für die Hybridisierung von Nucleinsäuren nicht miteinander korrelieren.<sup>[12]</sup> Stattdessen muss die Stabilität unerwünschter Hybridisierungen, gemessen z. B. durch

die Änderung der freien Enthalpie bei der Duplexbildung, minimiert werden, während gleichzeitig die Stabilität der erwünschten Hybridisierungen maximiert wird.<sup>[13]</sup> Üblicherweise wird dies durch die Einschränkung der Ähnlichkeit zwischen bestimmten Sequenzabschnitten und den Watson-Crick-Komplementen aller anderen Stränge, mit denen die jeweilige (Sub-)Sequenz nicht hybridisieren darf, erreicht.<sup>[14–17]</sup> Hierbei müssen die oben beschriebenen Anforderungen in diesem Schritt natürlich ebenfalls berücksichtigt werden.

Zum Design von Oligonucleotiden für Konstruktionszwecke entwickelte Seeman Anfang der 80er Jahre das erste Sequenzdesignprogramm SEQUIN.<sup>[14]</sup> Um Sequenzähnlichkeiten zu beschränken, werden damit die Sequenzen aus kurzen, sich überlappenden Subsequenzen festgelegter Länge (üblicherweise 3–5 Nucleotide) aufgebaut. Jede verwendete Subsequenz darf nur einmal in allen Sequenzen auftauchen, und ihr Watson-Crick-Komplement darf gar nicht erscheinen. SEQUIN ermöglicht es, Sequenzen interaktiv aus solchen Subsequenzen zu konstruieren, indem es vermerkt, welche Subsequenzen bereits verwendet und welche noch verfügbar sind. Obwohl der Designprozess mit diesem interaktiven Ansatz recht aufwändig ist, da zusätzliche Anforderungen wie ein bestimmter GC-Gehalt manuell berücksichtigt werden müssen, wurde und wird SEQUIN sehr erfolgreich eingesetzt, um Oligomersequenzen für komplexe Motive, wie z. B. Crossover-Kacheln (siehe Abschnitt 4.2), zu entwerfen. Eine andere Software, die das gleiche Konzept der Ähnlichkeitsvermeidung einsetzt, die aber dank der Automatisierung des Konstruktionsprozesses benutzerfreundlicher ist, wurde ebenfalls beschrieben.<sup>[15,18]</sup> Dieses Programm kann auch zusätzliche Anforderungen berücksichtigen, beispielsweise die Einhaltung homogener Schmelztemperaturen oder die Vermeidung von Guanin-Wiederholungen. Einen guten Überblick über weitere Programme zum Design von Oligomersequenzen, die auf verschiedenen Konzepten der Sequenzähnlichkeit und algorithmischen Ansätzen beruhen, gibt der Übersichtsartikel von Brennenman und Condon.<sup>[16]</sup>

Schließlich müssen die ganzen unterschiedlichen DNA-Oligomere experimentell *in vitro* zusammengefügt werden. Idealerweise besteht dieser Schritt einfach aus dem Mischen aller Komponenten in einem Reaktionsgefäß, um den durch die Watson-Crick-Basenpaarung festgelegten Zusammenbau auszulösen. In der Praxis hat sich jedoch gezeigt, dass individuelle Reaktionsbedingungen und ganze Protokolle meistens sorgfältig geplant oder gar in Versuchsreihen empirisch bestimmt werden müssen.<sup>[19]</sup> Zum Beispiel können einzelne Bausteine zunächst in getrennten Reaktionsansätzen hergestellt und aufgereinigt werden, bevor sie zum Aufbau der Zielarchitektur zusammengebracht werden. Ein entscheidender letzter Schritt des ganzen Prozesses ist die Charakterisierung der strukturellen Integrität, Konnektivität und eventuell sogar der Konformation des resultierenden supramolekularen Netzwerks. Hierzu verwendet man üblicherweise biochemische Methoden wie Elektrophorese von Reportersträngen (Abbildung 2),<sup>[20]</sup> Restriktionsanalysen oder Fragmentierungs-Assays<sup>[21]</sup> und mittlerweile auch zunehmend mikroskopische Techniken wie Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM),<sup>[22]</sup> Transmissionselektro-

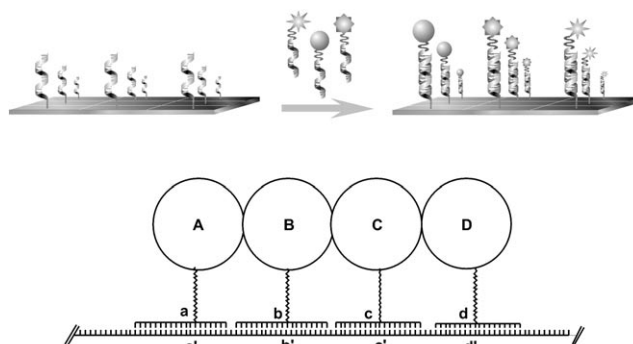


**Abbildung 2.** Charakterisierung einer DNA-Nanoarchitektur mit Reportersträngen, die so entworfen sind, dass ihre Länge mit der Zahl zusammengefügtter Bausteine, hier ein dreiarmliges Verzweigungsmotiv, korrespondiert. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [149].

nenmikroskopie (transmission electron microscopy, TEM) oder Kryo-Elektronenmikroskopie.<sup>[23]</sup>

### 3. Eindimensionale DNA-Stränge zum Zusammenbau und zur Immobilisierung von Nichtnuclein-säure-Komponenten

Eine unter Konstruktionsgesichtspunkten vergleichsweise einfache Aufgabe ist der Entwurf einzelsträngiger DNA-Oligomersequenzen (ssDNA), die als Templat für den gerichteten Zusammenbau von chemischen Komponenten, häufig Proteinen oder Nanopartikeln, die mit komplementären Sequenzen versehen sind, eingesetzt werden. Dieses Konzept ist für verschiedene Anwendungen wichtig. Zum Beispiel können kurze ssDNA-Oligomere von typischerweise 10–25 Basen Länge, die auf einem festen Träger immobilisiert sind, als Fängersonden für die DNA-vermittelte Immobilisierung (DNA-directed immobilization, DDI) von Nanopartikeln, Proteinen oder kleinen Molekülen dienen, die mit komplementären Sequenzen versehen sind (Abbildung 3, oben). Dieses Vorgehen hat entscheidende Vorteile gegenüber herkömmlichen Immobilisierungsmethoden, da die Befestigung reversibel ist und unter chemisch milden Bedingungen abläuft. Dank der Spezifität der Watson-Crick-Basenpaarung ermöglicht der DDI-Ansatz die gleichzeitige Immobilisierung vieler unterschiedlicher Komponenten in



**Abbildung 3.** Immobilisierung und gerichteter Zusammenbau von Komponenten mithilfe von DNA. Oben: DNA-gerichtete Immobilisierung (DDI) von DNA-Protein-Konjugaten mit oberflächengebundenen Fängeroligomeren eines DNA-Mikroarrays; unten: schematische Darstellung des DNA-basierten gerichteten Zusammenbaus von vier unterschiedlichen nanoskaligen Bausteinen zu einem stöchiometrisch und räumlich definierten supramolekularen Aggregat.<sup>[28]</sup> Abdruck des oberen Bildes mit Genehmigung nach Lit. [25].

einem einzigen Schritt, wenn eine Anordnung von Fängeroligomeren als Immobilisierungsmatrix verwendet wird.<sup>[24]</sup> Jüngste Anwendungen des DDI-Prinzips haben gezeigt, dass DNA-Mikroarrays effizient als Decodierungswerkzeuge in der kombinatorischen Chemie und chemischen Biologie verwendet werden können.<sup>[25]</sup> Darüber hinaus wird die in der DDI-Methode eingesetzte heterogene Hybridisierung auch beim DNA-Computing auf Oberflächen eingesetzt (siehe Abschnitt 6.1).

Die Hybridisierung kurzer komplementärer DNA-Oligonucleotide wird auch beim Zusammenbau von Metall- und Halbleiterpartikeln verwendet, die mit entsprechenden DNA-Oligomeren funktionalisiert sind. Dieser Ansatz, der 1996 von Mirkin und Mitarbeitern eingeführt wurde,<sup>[26]</sup> ermöglicht die einfache Synthese dreidimensionaler Nanopartikelmaterialien und hat sich inzwischen zu einem umfassenden Forschungsgebiet entwickelt, das vielfältige Anwendungen von der Materialforschung bis hin zur biomedizinischen Diagnostik einschließt.<sup>[3, 8–10, 27]</sup>

Während der Zusammenbau von Nanopartikeln nach dem oben beschriebenen Konzept im Prinzip zu einem unbegrenzten Wachstum führt, kann ssDNA auch für das gerichtete Zusammenführen von Komponenten verwendet werden, wenn diese jeweils mit einer individuellen Oligomersequenz modifiziert sind (Abbildung 3, unten). Dieser Ansatz, der ursprünglich für DNA-markierte Proteine entwickelt wurde,<sup>[28]</sup> wurde später auch für das gezielte Zusammenführen anorganischer Nanopartikel eingesetzt.<sup>[29–31]</sup> Gegenwärtig wird dieses Konzept sehr intensiv in organischen Synthesen mit DNA-Templaten eingesetzt, bei der zwei (oder mehr) reaktive chemische Gruppen durch ein DNA-Gerüst nahe beieinander gehalten werden, um so eine effiziente Kupplung der Gruppen herbeizuführen.<sup>[32]</sup>

Hinsichtlich der Auswahl geeigneter DNA-Sequenzen sind sowohl die DDI-Methode als auch das templatgesteuerte Zusammenfügen von Komponenten im Nanomaßstab (Abbildung 3) vom Problem der Hybridisierungseffizienz und -spezifität betroffen. Eine hohe Effizienz ist offensichtlich für

eine hohe Ausbeute an zusammengefügt Komponenten notwendig. Außerdem müssen die Hybridisierungseffizienzen aller zusammenzufügenden Komponenten möglichst homogen sein, da ansonsten z. B. leicht Fehlinterpretationen und falsch positive Signale in Biochip-Anwendungen entstehen können.<sup>[18]</sup> Leider genügt es nicht, molekulare Eigenschaften von Oligonucleotiden wie Schmelztemperatur oder freie Enthalpie der Duplexbildung zu berechnen, um die Hybridisierungseffizienz zuverlässig vorherzusagen, da diese auch durch die Bildung von Sekundärstrukturen und kinetische Gleichgewichte beeinflusst wird.<sup>[18,33]</sup> Der wichtigste Faktor, der hier zu berücksichtigen ist, ergibt sich aus der Neigung einzelsträngiger Oligomere, Sekundärstrukturen zu bilden. Dieses Problem verschärft sich, wenn mehrere Oligonucleotid-markierte Komponenten auf einem langen Trägerstrang zusammengefügt werden.<sup>[33]</sup> Daher hängt jede Anwendung, an der eine große Zahl kurzer ssDNA-Oligomere und/oder lange ssDNA-Moleküle beteiligt sind, wesentlich von einer sehr sorgfältigen Auswahl der verwendeten Sequenzen ab. Hierbei muss nicht nur intermolekulare Unähnlichkeit berücksichtigt werden, d. h. dass jeder Strang möglichst unähnlich zu den Komplementen aller anderen Stränge sein muss. Sondern es muss auch intramolekulare Unähnlichkeit implementiert werden, sodass kein Abschnitt eines Stranges dem Komplement eines anderen Bereichs desselben Stranges ähnlich ist. Hierzu muss im Zuge des Auswahlprozesses genau definiert werden, welches Ausmaß an „Ähnlichkeit“ tolerierbar ist und welche Mittel es braucht, um eine Unähnlichkeit zu erzwingen. Die gründlichste Methode, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden, basiert auf der Vorhersage der thermodynamischen Stabilität jeder entworfenen Sequenz unter Verwendung von Programmen wie *mfold*<sup>[34]</sup> oder *RNAfold*<sup>[35,36]</sup> und dem Verwerfen von Sequenzen, für die stabile Sekundärstrukturen vorhergesagt werden.

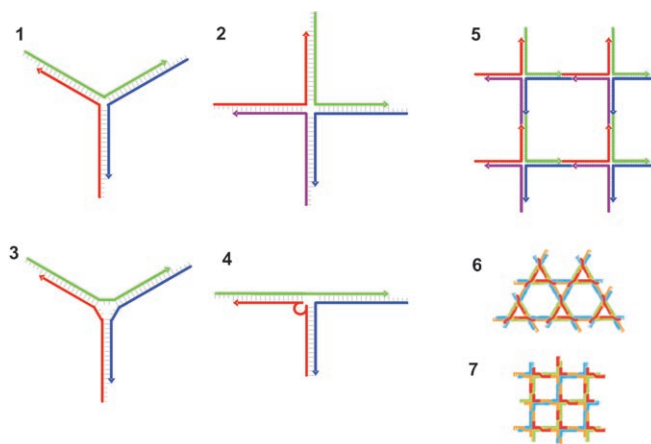
#### 4. Design und Zusammenfügen von DNA-Motiven

Um komplexere DNA-Nanoarchitekturen in zwei und drei Dimensionen zu konstruieren, reicht die einfache Hybridisierung einzelsträngiger Oligomere zu linearen Duplexstrukturen nicht aus, vielmehr werden komplexere Motive als Bausteine benötigt. Die höhere Komplexität dieser Motive führt jedoch zu weiteren Anforderungen an das Sequenzdesign und erhöht somit dessen Schwierigkeitsgrad. Mögliche Anwendungen solcher DNA-Nanoarchitekturen umfassen die Verwendung von starren DNA-Gerüsten zur Positionierung von Makromolekülen mit hoher Präzision im Nanometer-Längenbereich ebenso wie die Verwendung von DNA-Molekülen zur Ausführung mathematischer Algorithmen.

##### 4.1. Verzweigte DNA-Motive und DNA-Gitter

In den frühen 80er Jahren leisteten Seeman und Mitarbeiter bahnbrechende Arbeiten bei der Herstellung künstlicher Nucleinsäure-Architekturen aus synthetischen DNA-Motiven, die einen Verzweigungspunkt aufweisen („ver-

zweigte DNA-Junctions“). Diese Junction-Motive verfügen hauptsächlich über drei oder vier Arme, die aus doppelhelicaler dsDNA bestehen (Motive 1 und 2 in Abbildung 4).<sup>[37]</sup> Die eine Hälfte eines jeden beteiligten ssDNA-Oligomers



**Abbildung 4.** Verzweigte DNA-Motive und -Gitter: stabil verzweigte Motive (Junction-Motive) können drei- (1), vier- (2) und mehrarmige Verzweigungen enthalten.<sup>[37]</sup> Das Einfügen einer inneren Schleife aus ungepaarten Basen erhöht die mechanische Flexibilität (3).<sup>[39]</sup> Die Einführung einer Ausbuchtung (bulge loop) ermöglicht die Stapelwechselwirkung zweier Arme (4), wodurch der Winkel zwischen ihnen auf 180° fixiert wird.<sup>[40]</sup> Die Skizze eines Gitters, das aus vierarmigen Junction-Motiven 2 zusammengefügt wurde, ist als Konstrukt 5 gezeigt. Tatsächlich kreuzen sich die Helices in Motiv 2 nicht rechtwinklig, wodurch der Aufbau von Kagome-Gittern (6) möglich wird. In Gegenwart des Proteins RuvA werden die Winkel zwischen den Helices bei etwa 90° fixiert, was zur Bildung quadratischer Gitter (7) führt.<sup>[46]</sup> Abdruck von 6 und 7 mit Genehmigung nach Lit. [46].

trägt zur Bildung eines Armes bei, während die andere Hälfte Teil eines benachbarten Armes ist. Somit sind die helicalen Arme der Kreuzung an einem zentralen Verzweigungspunkt miteinander verbunden (Abbildung 4). Auch Varianten mit fünf und sechs Armen wurden synthetisiert, aber diese Motive erwiesen sich als weniger stabil.<sup>[38]</sup> Über den Grad an Basenpaarsymmetrie im Bereich des Verzweigungspunktes kann dessen Wanderung („Verzweigungsmigration“; d. h. der Wechsel zwischen unterschiedlichen Konformationen) gesteuert werden.<sup>[37]</sup> Somit kann die Beweglichkeit des Verzweigungspunktes einer Kreuzung durch Sequenzdesign vorgegeben werden. Durch Einbau von ungepaarten Basen in die Stränge, sodass der Verzweigungspunkt nun eine Schleife bildet (Motiv 3 in Abbildung 4), kann die mechanische Flexibilität des Junction-Motivs erhöht werden.<sup>[39]</sup> Der Einbau einer Ausbuchtung („bulge-loop“) in einen der drei Stränge einer dreiarmligen Verzweigung (Motiv 4 in Abbildung 4) ermöglicht die Basenstapelwechselwirkung zweier Arme und fixiert diese so in einem Winkel von etwa 180° zueinander.<sup>[40]</sup> Das Sequenzdesign solcher Schleifen erfordert die Suche nach einer weiteren Subsequenz mit einer geringen Tendenz zur Kreuzhybridisierung mit allen anderen Sequenzabschnitten des Motivs. Ein einfacher und häufig verwendeter Sequenzabschnitt besteht nur aus Thymin-Basen, weil diese nicht schon allein Sekundärstrukturen bilden, wie dies bei G- und C-Wiederholungen der Fall ist (siehe Abschnitt 4.3.1),

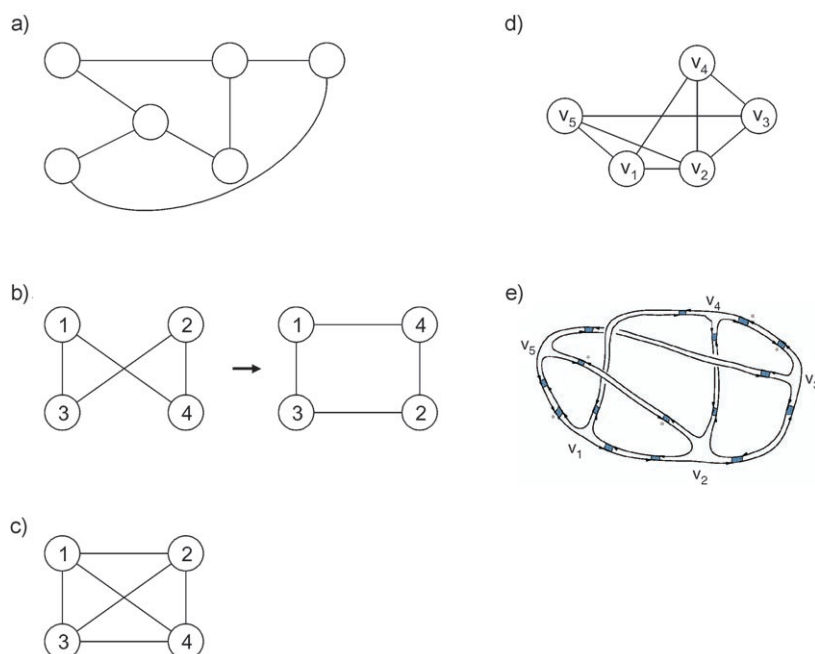
und sich lange Adenin-Wiederholungen recht einfach in anderen Teilen der Konstrukte vermeiden lassen.

Ebenfalls beschrieben wurde die Konstruktion von Meso- und Antijunctions.<sup>[41]</sup> Dies sind mehrarmige Motive, in denen nicht alle oder sogar keine der Helixachsen in Richtung der Mitte des Verzweigungspunktes zeigen. Sie sind schwieriger zusammenzufügen als reguläre Junction-Motive, da sie weniger stabil sind und stark zur Polymerisation neigen.<sup>[41]</sup> Als Komponenten für den Aufbau von größeren Nanoarchitekturen sind sie daher wenig attraktiv. Dennoch entstehen Antijunctions von selbst während des supramolekularen Zusammenbaus von regulären Junction-Motiven zu Gitterstrukturen, und sowohl Anti- als auch Mesojunctions wurden schon für den Aufbau einzelsträngiger DNA-Knotenmoleküle verwendet.<sup>[41]</sup> Hierbei handelt es sich um ringförmige DNA-Stränge, die topologisch so miteinander verwunden sind, dass sie ohne Bruch kovalenter Bindungen nicht zu trennen sind.

DNA-Junction-Motive wurden als Bausteine für die Herstellung repetitiver, gitterförmiger DNA-Nanoarchitekturen entworfen (5 in Abbildung 4) und darüber hinaus für den Zusammenbau von Drahtgittermodellen regelmäßiger Körper aus DNA verwendet (siehe Abschnitt 5.2). Einzelstrangüberhänge an den Armen der Junction-Motive ermöglichen die Ligation dieser Motive durch enzymatische oder chemische Kupplung zu zweidimensionalen Gittern,<sup>[37]</sup> die als Gerüste mit repetitiven strukturellen Eigenschaften im Nanometer-Maßstab dienen könnten. Allerdings führte der Zusammenbau dieser einfachen Junction-Motive zur Bildung sehr unregelmäßiger Strukturen, anstatt der erwarteten repetitiven DNA-Übergitter. Aus dieser Beobachtung konnte man schließen, dass die Junction-Motive für den Zusammenbau regelmäßiger gitterförmiger Architekturen wegen ihrer ausgeprägten konformativen Flexibilität ungeeignet sind.<sup>[42]</sup>

Dennoch gelang es kürzlich, mithilfe von Junction-Motiven als Bausteinen dreidimensionale dendritische Strukturen aufzubauen, die mit bestimmten Mischungen von Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden können. Hierdurch werden „Nanostrichcodes“ zugänglich, die zur Multiplex-Detektion von Nucleinsäuren einsetzbar sind.<sup>[43,44]</sup>

Eine andere Anwendung von auf Junction-Motiven basierenden DNA-Gittern betrifft die Darstellung so genannter „Graphen“. Diese sind mathematische Konstrukte, die aus einer Menge von Knoten und einer Menge von Kanten bestehen. Je eine Kante verbindet zwei Knoten (Abbildung 5a). Graphen werden als Computerdatenstrukturen verwendet, um eine Vielzahl von Systemen und Prozessen zu modellieren. Zum Beispiel wurden viele graphbasierte Algorithmen entwickelt, um Arbeitsabläufe oder Kommunikationsnetz-



**Abbildung 5.** Graphen und ihre Realisierung als DNA-Moleküle. a) Ein Graph besteht aus Knoten (Kreise), die durch Kanten (Linien) verbunden sind. b) Der linke Graph ist planar, da die Knoten so angeordnet werden können, dass sich keine zwei Kanten überkreuzen. c) Ein Beispiel eines nicht-planaren Graphen: Bei jeder Anordnung der Knoten treten zwangsläufig sich überkreuzende Kanten auf. d) Graph, der durch eine DNA-Struktur realisiert wurde.<sup>[39]</sup> e) Skizze des DNA-Zusammenbaus des in (d) dargestellten Graphen. Knoten werden durch drei- und vierarmige Kreuzungen repräsentiert (Motive 1 und 2 in Abbildung 4), Kanten durch Doppelhelices. Abdruck von Abbildung (e) mit Genehmigung nach Lit. [39].

werke zu optimieren, oder aber, im Bereich der Biowissenschaften, um kurze sequenzierte DNA-Stränge zusammenzufügen und so komplette Genome zu rekonstruieren.<sup>[45]</sup>

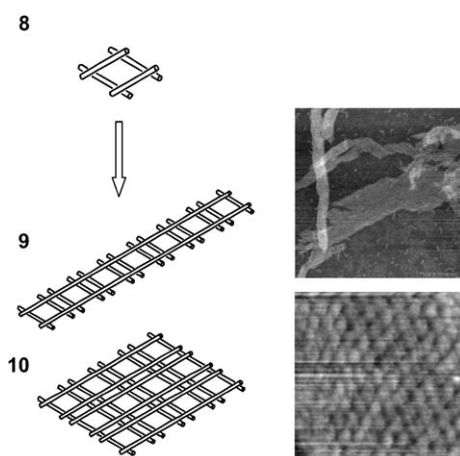
Kürzlich wurde eine nicht-planare Graphstruktur, d. h. ein Graph, bei dem alle zweidimensionalen Anordnungen mindestens ein Paar sich kreuzender Kanten aufweisen (Abbildung 5b,c), unter Verwendung von Junction-Motiven als Knoten und Duplexen als Kanten aufgebaut (Abbildung 5d,e).<sup>[39]</sup> Dieser Graph bestand aus fünf Knoten, von denen jeder mit drei bis vier der insgesamt acht Kanten verbunden war. Die Knoten wurden dementsprechend aus drei- bzw. vierarmigen Junction-Motiven gebildet. Die Kanten bestanden aus linearen Duplexen und dreiarmigen Junction-Motiven, wobei die letzteren die strukturelle Flexibilität der Motive erhöhen sollten und einen Arm enthielten, der mit einer Schleife geschlossen war. Ein solcher Graph ist nicht nur als Gerüst für Nanokonstruktionen interessant, sondern auch für das DNA-Computing. Dort lassen sich solche Gebilde verwenden, um Standardprobleme der Informatik zu lösen, z. B. das Hamilton-Pfad-Problem oder das Erfüllbarkeitsproblem.<sup>[39]</sup> Eine Beschreibung dieser Probleme findet sich in Abschnitt 6.1.

Jüngst wurde nachgewiesen, dass die Form einer Kreuzung in zweidimensionalen Gittern, insbesondere die Winkel zwischen den Armen und die Orientierung der Einzelstrangüberhänge, durch Zugabe des DNA-bindenden Proteins RuvA gesteuert werden kann.<sup>[46]</sup> Dieses Protein spielt in



vivo eine wichtige Rolle als Teil eines Proteinkomplexes, der in Bakterien so genannte Holliday-Junctions aus DNA während der homologen Rekombination prozessiert. Wie eine Analyse durch Kryo-Elektronenmikroskopie zeigte, änderte die Anwesenheit von RuvA während des Zusammenbaus von vierarmigen Junction-Motiven die Struktur der entstehenden regelmäßigen Gitter, sodass entweder Kagome-Gitter aus Sechsecken und Dreiecken (ohne RuvA, siehe **6** in Abbildung 4) oder quadratische Gitter (mit RuvA, siehe **7** in Abbildung 4) entstanden.<sup>[46]</sup>

Trotz ihrer hohen Flexibilität können drei- und vierarmige Kreuzungen zur Konstruktion starrer Architekturen eingesetzt werden.<sup>[42]</sup> Abweichend von der schematischen Darstellung von Motiv **2** und der Überstruktur **5** in Abbildung 4 kreuzen sich die Helices einer vierarmigen Junction nicht im rechten Winkel, sondern nehmen einen Winkel von etwa 60° zueinander ein. Daher bilden vier solcher Junction-Motive die supramolekulare Struktur eines Parallelogramms. Dies ist

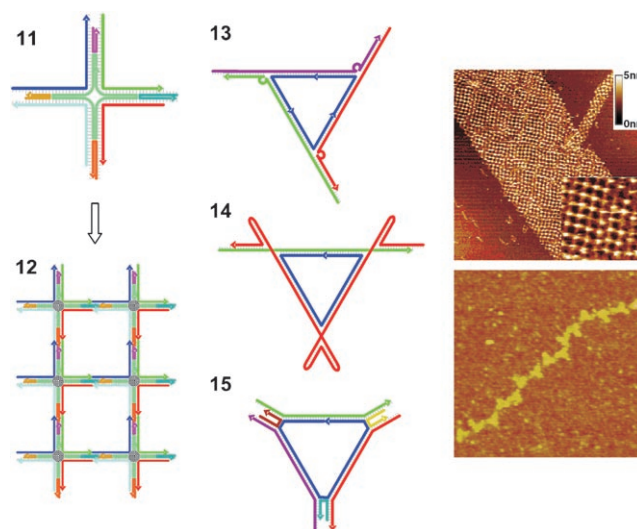


**Abbildung 6.** Das Parallelogramm-Motiv. Wegen der dreidimensionalen Struktur von DNA-Junction-Motiven führt der Zusammenbau von vier vierarmigen Junction-Motiven **2** mit zwei geschlossenen Enden zu einem Parallelogramm (**8**), das als Basiskomponente für das Zusammenfügen linearer (**9**) oder planarer Überstrukturen (**10**) verwendet werden kann. Die AFM-Abbildungen zeigen Beispiele für Strukturtyp **10** in zwei Vergrößerungen. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [47].

als Motiv **8** in Abbildung 6 gezeigt und entspricht einer realistischen Darstellung des Konstruktes **5**.<sup>[47]</sup> Solche aus Junction-Motiven aufgebauten Parallelogramme wurden in jüngster Zeit sowohl zu quasi-eindimensionalen „Eisenbahnschienen“ (**9** in Abbildung 6) als auch zu zweidimensionalen Gittern (**10** in Abbildung 6) zusammengefügt. Bemerkenswerterweise wurde dabei keine Bildung cyclischer Produkte beobachtet (etwa Gitter, die sich zu Röhren zusammenrollen). Außerdem zeigten AFM-Untersuchungen, dass die Winkel zwischen den Helices im gesamten Konstrukt relativ konstant waren (Abbildung 6).<sup>[47]</sup> Es ist zu beachten, dass die verwendeten Parallelogramm-Motive direkt aus den ssDNA-Oligonucleotiden zusammengefügt wurden, ohne den Umweg über eine vorherige Herstellung von Junction-Motiven zu gehen, die erst anschließend zu Motiv **8** zusammengefügt werden. Die Einheitlichkeit der Winkel in den supra-

molekularen Gerüsten lässt darauf schließen, dass diese Vorgehensweise zu starren und flachen Bausteinen vom Typ **8** führt, die eine deutlich geringere strukturelle Flexibilität haben als einzelne Junction-Motive, z. B. **1** und **2**.

Durch Einfügen von T<sub>4</sub>-Schleifen in alle vier Helices, die zwei benachbarte Verzweigungspunkte von vier vierarmigen Junction-Motiven in **8** verbinden, werden die Helices abgelenkt, sodass 4 × 4-Kacheln entstehen (Motiv **11** in Abbildung 7).<sup>[48]</sup> Diese Motive sind wie vierarmige Suprajunctions



**Abbildung 7.** Motive höherer Ordnung. Der Zusammenbau von vier vierarmigen Junction-Motiven **2**, die zusätzliche Ausbuchtungen enthalten, führt zu einer vierarmigen Suprajunction **11** („4 × 4-Kachel“).<sup>[48]</sup> Struktur **12** ist ein Beispiel eines Gitters aus 4 × 4-Kacheln, das mit Streptavidin-Molekülen (schwarze Kreise) modifiziert wurde, die durch an Ausbuchtungen eingebauten Biotinylgruppen einer jeden Kachel gebunden wurden.<sup>[51]</sup> Das AFM-Bild oben rechts zeigt ein solches Gitter. Mehrere dreieckige Strukturen wurden aus mit Ausbuchtungen versehenen dreiarmligen (**13**)<sup>[57]</sup> und vierarmigen Junction-Motiven (**14** bzw. **15**)<sup>[56, 58]</sup> aufgebaut. Motiv **14** wurde für lineare Konstrukte entworfen. Ersetzt man einige Haarnadelschleifen durch Einzelstrangüberhänge, ermöglicht dies den Aufbau zweidimensionaler Strukturen.<sup>[56]</sup> Das untere AFM-Bild zeigt eine lineare Überstruktur aus **14**, bei der die Dreiecke auf alternierenden Seiten der verbindenden Helix liegen. Abdruck der AFM-Bilder mit Genehmigung nach Lit. [51] (oben) und [56] (unten).

geformt, die gestreckte vierarmige Junction-Motive als Arme enthalten. Die Kacheln **11** wurden zu linearen Bändern und zweidimensionalen Gittern zusammengefügt (**12** in Abbildung 7).<sup>[48]</sup> Erst kürzlich gelang es He et al., ungewöhnlich große zweidimensionale Anordnungen aus Motiv **11** herzustellen, wobei zwei neue Konzepte zur Anwendung kamen.<sup>[49]</sup> Zum einen wurde Motiv **11** symmetrisch entworfen, was bedeutet, dass die Basensequenz aller vier Arme identisch war. Zum zweiten wurde eine „Wellungs-Strategie“ eingesetzt, bei der eine Kachelseite benachbarter Bausteine abwechselnd nach oben und nach unten gerichtet ist. Hierdurch gleichen sich kleine Krümmungen in den einzelnen Motiven gegenseitig aus, anstatt sich im supramolekularen Gerüst zu kumulieren.



Aus dem Motiv **11** hergestellte Überstrukturen wurden bereits in einer Reihe von Anwendungen eingesetzt. Zum Beispiel wurde eine bandförmige DNA-Gitterstruktur mit Silber metallisiert und zur Herstellung Ohmscher Leiterstrukturen verwendet.<sup>[48,50]</sup> Durch Verwendung von Baustein **11** wurden periodische Anordnungen des Proteins Streptavidin (STV) hergestellt, indem eine Biotingruppe in eine der T<sub>4</sub>-Schleifen eingefügt wurde (Struktur **12** und AFM in Abbildung 7).<sup>[48,51]</sup> Verschiedene Gerüste, die aus zu **11** ähnlichen Motiven (z.B. nur aus drei vierarmigen Kreuzungen bestehend) und aus anderen Bausteinen wie Dreiecken und Parallelogrammen aufgebaut waren, wurden auch als Maske für die molekulare Nanolithographie verwendet.<sup>[52,53]</sup> Hierbei wurden die DNA-Überstrukturen auf Glimmer adsorbiert und anschließend mit einer dünnen Goldschicht bedeckt, sodass ein Negativ-Abdruck der Nanostruktur im Metall entstand, der mit AFM analysiert werden konnte.

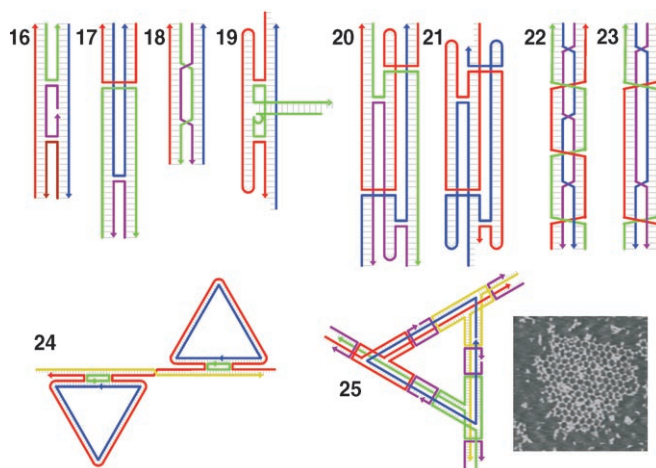
DNA-Dreiecke (z.B. Motiv **13** in Abbildung 7) sind vielversprechende Kandidaten für die Herstellung so genannter „Tensegrity-Strukturen“. Dies sind dreidimensionale Körper aus starren Stäben (hier DNA-Duplexe), die durch kurze Sehnen (hier z.B. Verzweigungspunkte von DNA-Junction-Motiven) miteinander verbunden sind.<sup>[54–56]</sup> Das Gleichgewicht zwischen den Kräften der Stäbe, die die dreidimensionale Struktur nach außen drücken, und der Sehnen, die sie nach innen ziehen, stabilisiert die Form einer solchen Struktur gegenüber äußeren Kräften. Zum Beispiel ist ein Tetraeder aus Stäben und kurzen Sehnen stabil, während eine würfelförmige Struktur unter äußeren Kräften, wie der Gravitation, zusammenfallen kann.

Die Form eines DNA-Dreiecks, oder genauer, die Winkel zwischen benachbarten Armen in den Ecken des Dreiecks, werden durch die Längen der helicalen Kanten bestimmt. Daher kann ein DNA-Dreieck als zweidimensionale Tensegrity-Struktur betrachtet werden. Offensichtlich ist eine sehr genaue Wahl der Längen von Stäben und Sehnen von entscheidender Bedeutung, da zu lange Sehnen die zusammengebaute Struktur zu flexibel machen würden, wogegen zu kurze Sehnen oder schlecht gewählte Stablängen die Bildung einer geschlossenen Struktur komplett verhindern. Solche dreieckigen DNA-Strukturen aus drei mit Ausbuchtungen (bulge loops) versehenen dreiarmligen Verzweigungen als Ecken wurden für die Ligation zu ebenen Hexamer-Strukturen entworfen.<sup>[57]</sup> Während zwei der drei Arme einer Kreuzung die Kanten des Dreiecks bildeten, enthielt der dritte Arm eine Haarnadelschleife, die eine Restriktionschnittstelle enthielt. Nach Verdau mit einer Endonuclease entstand hier ein Einzelstrangüberhang, an dem weitere Ligationen ablaufen können (Motiv **13** in Abbildung 7). Die primären Ligationsprodukte von **13** waren allerdings cyclische Tetramere anstelle der erwarteten cyclischen Hexamere. Weil diese Abweichung in der Größe der cyclischen Ligationen nur auftreten konnte, wenn die Dreiecke flexibel waren, lieferten diese Ergebnisse einen klaren Hinweis auf ungenügende Starrheit dieser Bausteine. Ähnliche Ansätze mit vierarmigen Junction-Motiven als Ecken waren erfolgreicher. Tatsächlich gelang mit diesen Bausteinen die Herstellung von großen ein- und zweidimensionalen Gerüsten.<sup>[56,58]</sup> Hierbei wurden benachbarte Dreiecke über ein<sup>[56]</sup>

oder zwei<sup>[58]</sup> Einzelstrangüberhänge verbunden (Motive **14** und **15** in Abbildung 7), sodass sich diese Motive zu leicht unterschiedlichen zweidimensionalen Mustern zusammenfügten. Die supramolekulare Struktur wurde dann mit AFM analysiert. Ein typisches Bild ist in Abbildung 7 gezeigt.

## 4.2. Crossover-Kacheln

DNA-Junction-Motive sind relativ flexibel, und der Zusammenbau dieser Bausteine führt oft nicht zu den gewünschten regelmäßigen Überstrukturen. Um dieses Problem zu lösen, konstruierten Seeman und Mitarbeiter starrere Komponenten, die so genannten Crossover-Kacheln. Double-Crossover(DX)-Kacheln bestehen aus zwei doppelsträngigen Helices, die Einzelstränge an zwei Kreuzungspunkten austauschen (Motive **16–18** in Abbildung 8).<sup>[59]</sup> Insgesamt gibt es fünf strukturell unterschiedliche Motive von DX-Kacheln. In drei von diesen (z.B. Motiv **18**, Abbildung 8) sind die helicalen Domänen parallel orientiert, was bedeutet, dass sich die kleinen Furchen beider Helices bei jeder Windung begegnen, ebenso wie die großen Furchen. Infolgedessen wirken stark abstoßende Coulomb-Kräfte zwischen den



**Abbildung 8.** Crossover-Kacheln. Die stabileren und daher häufig eingesetzten Double-Crossover(DX)-Kacheln sind DAE (**16**) und DAO (**17**) mit antiparallelen Helices.<sup>[59]</sup> Das DPE-Motiv (**18**) ist ein Beispiel für eine weniger stabile DX-Kachel mit parallelen Helices. Das modifizierte DX-Motiv **19** enthält ein zusätzliches dreiarmliges Junction-Motiv, das einen aus der Kachelebene herausragenden Einzelstrangüberhang bereitstellt.<sup>[60]</sup> Die Triple-Crossover(TX)-Kachel **20** kann als Kombination zweier DAO-DX-Kacheln mit gemeinsamer zentraler Helix betrachtet werden.<sup>[59]</sup> Der Einbau von Einzelstrangüberhängen an der zentralen Helix (**21**) bewirkt, dass die seitlichen Helices oberhalb und unterhalb der Kachelebene liegen.<sup>[61]</sup> In Paraneic-Crossover(PX)-Kacheln (**22**) tauschen die beiden Helices ihre Stränge an allen möglichen Positionen aus.<sup>[62]</sup> Zusammen mit ihrem Topoisomerase  $JX_2$  (**23**) bildet die PX-Kachel die Grundlage einer durch Strangverdrängung betriebenen nanomechanischen Funktionseinheit (siehe Abbildung 16).<sup>[131]</sup> Wenn eine der Helices einer DX-Kachel **16** als Kante in ein DNA-Dreieck eingefügt ist, kann diese für den Aufbau linearer Konstrukte genutzt werden (**24**).<sup>[70]</sup> In Motiv **25** sind DX-Kacheln zu einer dreieckigen Struktur verknüpft, die selbst wiederum zu pseudoheptagonalen Gittern zusammengefügt werden kann (siehe AFM-Bild).<sup>[72]</sup> Abdruck des AFM-Bildes mit Genehmigung nach Lit. [72].

beiden parallelen Strängen, und die Motive sind daher strukturell instabil.<sup>[59]</sup> Wegen der geringeren Coulomb-Abstoßung sind die beiden antiparallelen Motive **16** und **17** stabiler, bei denen die kleine Furche der einen Helix in der großen Furche der anderen Helix liegt. Sie unterscheiden sich in der Zahl helicaler Halbwindungen zwischen den Kreuzungspunkten, die entweder gerade (**16**, ein so genanntes DAE-Motiv) oder ungerade (DAO, **17**) ist. Abstände zwischen den Kreuzungspunkten, die keinem ganzzahligen Vielfachen helicaler Halbwindungen entsprechen, führen zu einer Torsionsspannung im Motiv, weshalb solche Bausteine weniger stabil sind und bisher nicht für Konstruktionszwecke eingesetzt wurden. Da eine DX-Kachel als eine Kombination zweier vierarmiger Junction-Motive anzusehen ist, die durch zwei benachbarte Arme miteinander verbunden sind, ist grundsätzlich die Wanderung der Stränge („branch-migration“) möglich. Dies kann jedoch durch die Auswahl geeigneter Basensequenzen verhindert werden (siehe Abschnitt 4.1). Da aber die beiden Kreuzungspunkte gemeinsam wandern müssten, ist dieser Vorgang hier ohnehin weniger wahrscheinlich als bei den einfachen DNA-Junction-Motiven.<sup>[59]</sup>

DX-Kacheln werden üblicherweise so entworfen, dass sie Einzelstrangüberhänge an ihren vier Armen tragen, die für den Zusammenbau verwendet werden können. Um DX-Kacheln zu ebenen zweidimensionalen Überstrukturen zusammenfügen zu können, müssen die Gesamtlängen der Arme (einschließlich der Einzelstrangüberhänge) ganzzahligen Vielfachen helicaler Halbwindungen zwischen den Kreuzungspunkten benachbarter Kacheln entsprechen. Zusätzliche strukturelle Merkmale können in die grundlegende Struktur des DX-Motivs eingebaut werden. Zum Beispiel ermöglicht der Einbau eines mit einer Schleife versehenen dreiarmligen Junction-Motivs (Motiv **4**) zwischen die Kreuzungspunkte die Befestigung weiterer Moleküle, die aus der Ebene herausragen (wie bei Motiv **19** in Abbildung 8 gezeigt).<sup>[60]</sup>

Triple-Crossover(TX)-Kacheln bestehen aus drei Helices, die in einer Ebene liegen und durch Kreuzungspunkte verbunden sind.<sup>[61]</sup> Motiv **20** (Abbildung 8) ist ein typisches Beispiel. Es wurde aus zwei DAO-DX-Kacheln (**17**) mit einer gemeinsamen zentralen Helix konstruiert. Dieses Vorgehen führt zu einem Reporter-Strang, der alle Kacheln einer aus TX-Motiven zusammengefügt Überstruktur durchzieht und der zu analytischen Zwecken eingesetzt werden kann (siehe Abbildung 2). Außerdem bieten TX-Kacheln die Möglichkeit, verschobene Gerüste mit definierten Lücken zu konstruieren und Komponenten einzubauen, die aus der zweidimensionalen Ebene ragen (siehe unten).<sup>[61]</sup>

Paranemic-Crossover(PX)-Moleküle bilden eine weitere Klasse von DNA-Motiven (Motiv **22** in Abbildung 8). Ähnlich wie parallele DX-Kacheln bestehen PX-Moleküle aus zwei parallelen Helices, allerdings bilden PX-Motive an jeder möglichen Stelle Kreuzungspunkte. Dies macht diese Kacheln stabiler als vergleichbare DX-Moleküle.<sup>[62]</sup> Mit dem Begriff „paranemisch“ bezeichnet man hier, dass man, selbst wenn der blaue und der grüne Strang von Motiv **22** durch Haarnadelschleifen an beiden Enden des Motivs verbunden wären (ebenso wie der rote und der violette Strang), beim Schmelzen dieses Motivs zwei einzelne cyclische Moleküle

erhalten würde, die sich einander topologisch nicht durchdringen.

Alle Crossover-Kacheln können als flache und starre Bausteine angesehen werden, allerdings bietet die strukturelle Vielfalt individueller Typen eine große Auswahl an Optionen, um die Abstände und die Konnektivität der Bausteine und der angestrebten Überstrukturen zu verändern. Außerdem können Crossover-Motive weiter modifiziert werden, um zusätzliche Funktionalitäten einzubauen. Zum Beispiel ermöglicht ein Derivat von Motiv **19**, bei dem der dritte, nicht an der Stapelwechselwirkung beteiligte Arm eine Haarnadelschleife bildet, die aus der Kachelebene ragt, den Zusammenbau von gestreiften zweidimensionalen Kristallen mit definierten Abständen zwischen den aus den Schleifen gebildeten Streifen.<sup>[22,63]</sup> Diese Überstrukturen wurden durch AFM abgebildet, und ein typisches Beispiel ist in Abbildung 14 dargestellt. Ähnliche gestreifte Überstrukturen wurden durch Ligation von TX-Kacheln hergestellt, wobei ein Kacheltyp lediglich Einzelstrangüberhänge an der zentralen Helix besaß (Motiv **21** in Abbildung 8).<sup>[61]</sup> Die Zahl helicaler Windungen zwischen diesen Einzelstrangüberhängen und den Kreuzungspunkten wurde als nichtganzzahlige Vielfache gewählt. Daher lagen die seitlichen Helices über bzw. unter der Netzebene, wenn eine solche Kachel mit anderen TX-Kacheln zu zweidimensionalen Anordnungen ligiert wurde.<sup>[61]</sup>

Die oben beschriebenen gestreiften Überstrukturen wurden als Strichcodes im Nanometermaßstab vorgeschlagen,<sup>[64]</sup> und sie wurden bereits als Gerüste zur Positionierung von Gold-Nanopartikeln verwendet (siehe AFM in Abbildung 14).<sup>[65,66]</sup> Kürzlich konnten sogar sich abwechselnde Reihen aus zwei unterschiedlich großen Nanopartikelarten hergestellt werden.<sup>[67]</sup> Weiterhin wurden Streptavidin und Gold-Nanopartikel mithilfe von DNA-Arrays aus TX-Kacheln, deren seitliche Helices mit Haarnadelschleifen versehen waren, ein- und zweidimensional positioniert.<sup>[68]</sup> Die meisten aus diesen einfachen Kacheln aufgebauten Anordnungen können prinzipiell unbegrenzt wachsen, das Wachstum kann aber durch Ersatz bestimmter Einzelstrangüberhänge in einigen Kacheln durch stumpfe Enden („blunt ends“) oder durch Haarnadelschleifen beendet werden. Hierbei bilden diese Kacheln dann die Grenzen für das Wachstum zweidimensionaler Kristalle und ermöglichen z. B. die Erzeugung V- oder X-förmiger Überstrukturen.<sup>[69]</sup>

Crossover-Kacheln wurden auch als Bausteine für die Herstellung größerer Motive verwendet, die dann selbst wieder als Bausteine dienten. Zum Beispiel wurde eine cyclische doppelsträngige Struktur konstruiert, die drei flexible Ausbuchtungen enthielt (Motiv **24** in Abbildung 8).<sup>[70,71]</sup> Die Struktur bildete ein Dreieck mit den Ausbuchtungen als Ecken und den Helices zwischen den Ausbuchtungen als Kanten. Eine dieser Kanten war dabei tatsächlich die Helix eines DX-Motivs, dessen zweite Helix für den Zusammenbau eines langen Trägerstrangs durch Ligation mit Einzelstrangüberhängen verwendet wurde. Dies ermöglichte die Herstellung einer Kette aus solchen Dreiecken, die im AFM-Bild deutlich sichtbar ist.<sup>[70]</sup> In einem ähnlichen Versuch wurde der Trägerstrang mit Paranemic-Crossover-Motiven versehen, sodass sich die Duplexhelices ohne Ligation miteinander

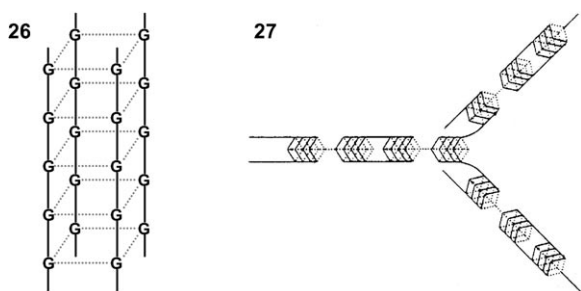
verbinden konnten, indem sie sich umeinander wanden.<sup>[71]</sup> Weiterhin wurden Dreiecke mit DX-Kacheln an allen drei Kanten, die an zusätzlichen Crossover-Punkten an den Ecken Stränge austauschten (Motiv **25** in Abbildung 8), durch Ligation äußerer Arme zu pseudohexagonalen Gittern zusammengefügt.<sup>[72]</sup> Diese Strukturen wurden ebenfalls durch AFM charakterisiert (Abbildung 8).

Die Vielfalt an Crossover- und Junction-Motiven zusammen mit einfacheren Komponenten wie Einzelstrangüberhängen, Helices und Ausbuchtungen bietet somit eine große Auswahl an Bausteinen zur Herstellung von DNA-Nanoarchitekturen. Die Kombination dieser Komponenten zu Motiven höherer Ordnung (z.B. **13** und **24**) vergrößert diese Menge noch erheblich. Allerdings bedarf ein solcher hierarchischer Ansatz vorheriger Überlegungen, wie viele Komponenten in einen Baustein integriert werden sollen. Als ein Beispiel haben Mao et al. das Parallelogramm-Motiv **8** als ein kleines Gitter aus vier vierarmigen Kreuzungen **2** konstruiert.<sup>[47]</sup> Sie führten diesen Zusammenbau jedoch nur im Planungsschritt durch und stellten das Motiv **8** dann in vitro direkt aus den entsprechenden DNA-Einzelsträngen her. Ein anderer Ansatz wäre zunächst die In-vitro-Herstellung von Junction-Motiven, die anschließend zu Motiv **8** und weiteren ein- und zweidimensionalen Überstrukturen zusammengefügt werden. Da aber einzelne Kreuzungsmotive eine wesentlich höhere strukturelle Flexibilität haben als Motiv **8**, ist dieser Ansatz weniger erfolgversprechend. Daher ist die Entscheidung, ob Bausteine höherer Ordnung zunächst als kleinere Komponenten hergestellt werden sollen, von zentraler Bedeutung.

### 4.3. Andere Motive

#### 4.3.1. Guanin-Quadruplexe

Guanin-reiche DNA-Abschnitte bilden inter- und intramolekulare G-Quadruplexe in Gegenwart von monovalenten Kationen wie Kalium-Ionen. Die G-Quadruplexe enthalten vier Stränge, die in einem „Bündel“ mit quadratischem Querschnitt nebeneinander liegen (Motiv **26** in Abbildung 9). Solche Quadruplexe wurden auch als Bausteine zum Aufbau supramolekularer DNA-Nanoarchitekturen verwendet, um

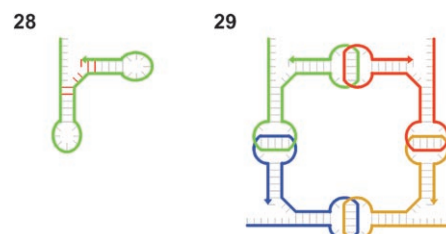


**Abbildung 9.** Guanin-Quadruplexstruktur. Das Motiv **26** besteht aus vier Guanin-reichen Strängen, die sich in Gegenwart von  $K^+$ -Ionen zu einem Bündel mit quadratischem Querschnitt anordnen. Solche Motive können zu verzweigten kabelartigen Strukturen **27** zusammengefügt werden. Abdruck der Struktur **27** mit Genehmigung nach Lit. [73].

lineare Strukturen herzustellen, die starrer sind als eine Doppelhelix.<sup>[73]</sup> Diesem Konzept folgend wurden „ausgefrante Kabel“ aus G-Quadruplexen hergestellt, die zusätzliche Einzelstrangenden an jedem Baustein enthielten.<sup>[74]</sup> Anschließend wurden Netzwerke dieser Kabel aufgebaut, wobei Verbindungsstränge verwendet wurden, die Watson-Crick- und Hoogsteen-Basenpaarungen mit den „Fransen“ bilden. Diese Überstrukturen wurde mit AFM charakterisiert.<sup>[74]</sup> Der Aufbau von verzweigenden Nanokabeln aus Guanin-Quadruplexen wurde ebenfalls demonstriert (**27** in Abbildung 9).<sup>[73]</sup>

#### 4.3.2. Tekto-RNA

RNA lässt sich ebenfalls für den rationalen Aufbau zweidimensionaler Strukturen verwenden. Zwei Haarnadelschleifen, die über ein rechtwinkliges Strukturmotiv verbunden sind, bilden ein Tekto-RNA-Motiv (Motiv **28** in Abbildung 10).<sup>[75]</sup> Quadratische Überstrukturen wie **29** bestehen



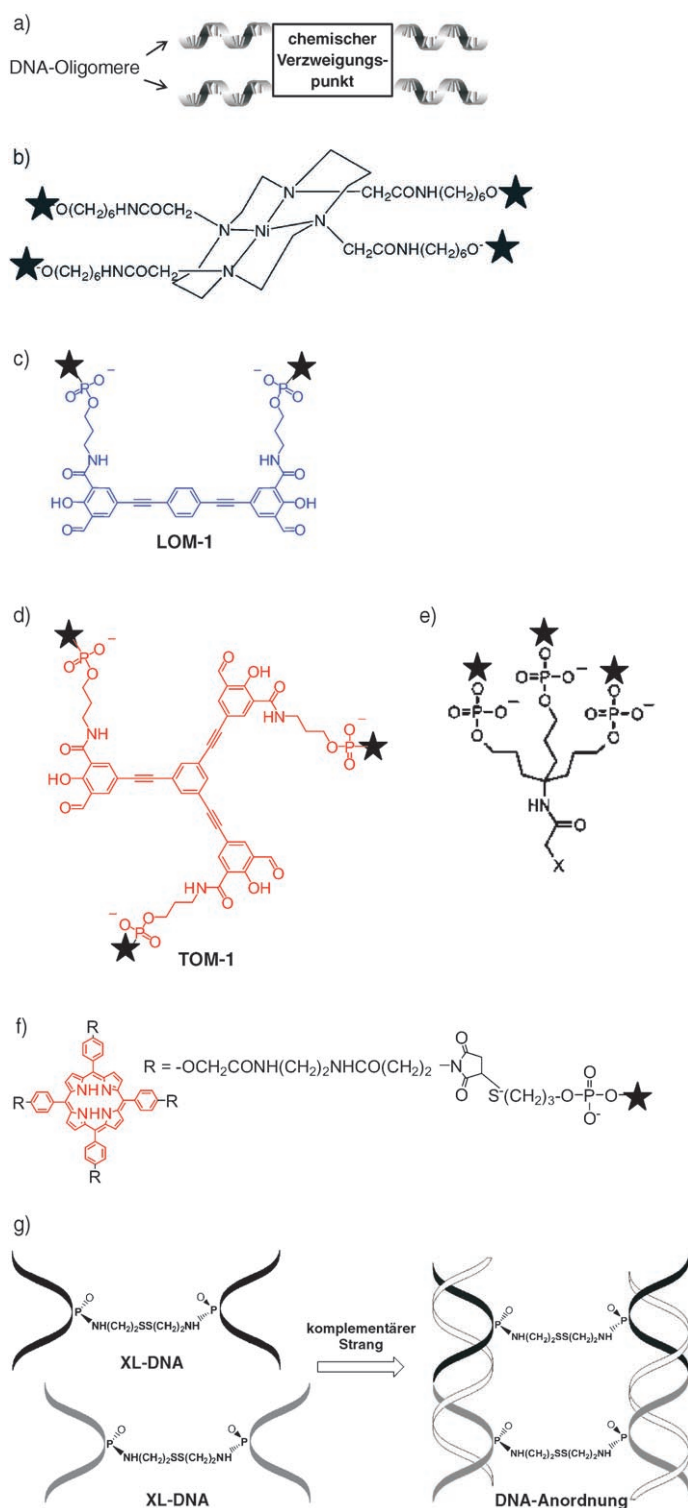
**Abbildung 10.** Tekto-RNA. Zwei Haarnadelschleifen, verbunden durch ein rechtwinkliges RNA-Motiv (rote Basen und Basenpaare), bilden einen Tekto-RNA-Baustein **28**.<sup>[75]</sup> Vier Sorten von **28** mit komplementären Basensequenzen in den Schleifen fügen sich zu quadratischen Motiven wie **29** zusammen, die wiederum als Bausteine für Gitter und leiterförmige Strukturen verwendbar sind.

aus vier Tekto-RNA-Motiven, die durch Hybridisierung ihrer Schleifenstränge miteinander verbunden sind. **29** wurde wiederum als Baustein zur Herstellung größerer zweidimensionaler Strukturen verwendet. Durch unterschiedliche Kombinationen aus Position und Orientierung der Einzelstrangüberhänge von Motiv **29** ließen sich Leiter-ähnliche Strukturen und mehrere Formen von 2D-Gittern aufbauen.<sup>[75]</sup> Ein solches eindimensionales leiterartiges Konstrukt wurde kürzlich zur elektrostatischen Abscheidung von kationischen Gold-Nanopartikeln in den in **29** enthaltenen Löchern verwendet.<sup>[76]</sup>

#### 4.3.3. Chemische Verzweigungen und Linkermoleküle

Synthetische Nichtnucleinsäuren können ebenfalls zur Verknüpfung oder Verzweigung von DNA-Nanoarchitekturen eingesetzt werden (Abbildung 11). Bei diesem Ansatz kann ein synthetisches Kernmolekül mit den daran befestigten zwei oder mehr DNA-Oligomeren zusätzliche strukturelle oder chemische Funktionalität beisteuern, während die Fähigkeit zum spezifischen Zusammenbau durch Watson-Crick-Basenpaarung erhalten bleibt (Abbildung 11 a). Beispielsweise haben Stewart und McLaughlin Nickel-Cyclam





**Abbildung 11.** Chemische Verzweigungen und Linkermoleküle. Das allgemeine Schema in (a) zeigt einen zentralen synthetischen Kern, der als Verzweigungspunkt mehrere DNA-Oligomere verknüpft, selbst aber nicht aus DNA besteht. Beispiele für synthetische Verzweigungspunkte sind [Ni(Cyclam)]-Chelate (b),<sup>[77]</sup> Salicylaldehyd-Gruppen (c, d),<sup>[78]</sup> ein verzweigtes Alkan mit einem quartären Kohlenstoff (e)<sup>[80]</sup> und Porphyrin-Derivate (f).<sup>[85]</sup> Die Sterne in (b–f) markieren die Befestigungspunkte der DNA-Oligomere. g) Disulfid-verknüpfte DNA-Stränge lassen sich durch Hybridisierung zu langen komplementären Strängen zusammenfügen.<sup>[82]</sup> Abdruck von (b–g) mit Genehmigung nach der jeweils angegebenen Literatur.

Chelatkomplexe als Verknüpfungskern für vier DNA-Oligomere verwendet (Abbildung 11 b).<sup>[77]</sup> Unterschiedliche Arten von Oligomer-Cyclam-Komplexen mit komplementären Oligomeren hybridisierten dann zu größeren Strukturen. Da zur Charakterisierung lediglich Gel-Elektrophorese eingesetzt wurde, ist nicht bekannt, ob die Überstrukturen linear oder gitterförmig waren. Gothelf et al. befestigten DNA-Oligomere an Salicylaldehydgruppen, sodass zwei- (LOMs) und dreiarmlige Moleküle (TOMs) entstanden. (LOMs = lineare Oligonucleotid-funktionalisierte Module, Abbildung 11 c; TOMs = tripodale OMs, Abbildung 11 d).<sup>[78]</sup> Bei diesem Ansatz dirigieren die DNA-Stränge den Zusammenbau linearer und verzweigter Strukturen, in denen die Verzweigungsmodule nahe beieinander liegen. Hierdurch wird die kovalente Verknüpfung der Kernmoleküle möglich, und die DNA-Oligomere können anschließend von den kondensierten Produkten entfernt werden.<sup>[79]</sup> Von Kiedrowski und Mitarbeiter fügten supramolekulare Komplexe aus Tris oligonucleotiden zusammen, deren drei DNA-Arme durch einen Y-förmigen chemischen Linker verbunden waren (Abbildung 11 e).<sup>[80]</sup> Diese Bausteine wurden durch Hybridisierung zu Überstrukturen mit der Konnektivität eines Tetraeders zusammengefügt.<sup>[55]</sup> Außerdem konnte durch die Verwendung der Tris oligonucleotide die Konnektivität individueller Motive auf der Basis der DNA-vermittelten Selbstorganisation kopiert werden.<sup>[81]</sup> Dieser Ansatz könnte somit einen Weg zur Selbstreplikation von DNA-Nanoarchitekturen bieten.<sup>[55]</sup>

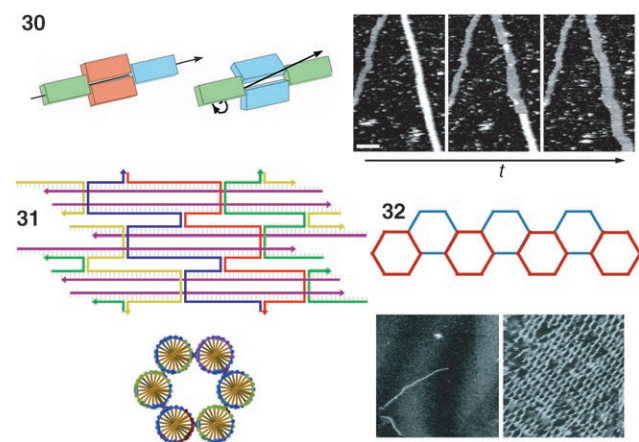
Endo und Majima verwendeten Linkermoleküle, die die Rückgrate zweier kurzer DNA-Stränge verbinden (Abbildung 11 g).<sup>[82]</sup> Durch Hybridisierung mehrerer Arten dieser Disulfid-verbrückten DNA-Moleküle (XL-DNA) an lange durchgehende Trägerstränge wird die relative Position der beiden resultierenden Doppelhelices durch mehrere Querverbindungen festgelegt. Diese XL-DNA-Module wurden auch als Vermittlermoleküle in einem Oligonucleotid-abhängigen Übersetzungssystem eingesetzt.<sup>[83]</sup> Unterschiedliche XL-DNA-Module wurden dabei mit einem „Eingabestrang“ hybridisiert, der die Information enthält. Komplementäre Oligomere wurden dann an die noch freien Stränge der XL-Vermittler hybridisiert. Die anschließende Ligation verband diese Oligomere zu einem „Ausgabestrang“. Eine solche Übersetzung einer DNA-Information kann für das DNA-Computing nützlich sein, z. B. um Informationen zu verschlüsseln oder um variable Eingaben mit einem Standardeingabecode zu erzeugen.<sup>[84]</sup> In einer gemeinsamen Arbeit gelang es Endo, Majima und Seeman, Porphyrine, die kovalent mit vier DNA-Strängen verknüpft sind (Abbildung 11 f), über Einzelstrangüberhänge mit einem zweidimensionalen DX-Kachelgerüst zu verbinden.<sup>[85]</sup> Durch die räumliche Beschränkung aufgrund der Porphyrin-Konnektoren rollte sich die Anordnung zu einer dreidimensionalen Röhre zusammen.

## 5. Dreidimensionale Strukturen aus DNA

Bei den meisten der oben beschriebenen Beispiele wurden die Kacheln gezielt verwendet, um flache, zweidimensionale Strukturen aufzubauen. Allerdings bestand eines der Hauptziele des von Seeman in den frühen 80er Jahren veröffentlichten Konzeptes darin, mit verzweigten DNA-Motiven dreidimensionale DNA-Kristalle aufzubauen, um diese beispielsweise als periodische Wirtgerüste für die röntgenkristallographische Analyse von Gastmolekülen wie Proteinen zu nutzen, die selbst nur schwer oder gar nicht kristallisieren.<sup>[86]</sup> Da sich die Konstruktion regelmäßiger 3D-Architekturen als wesentlich schwieriger erwies als die Herstellung von 2D-Anordnungen,<sup>[87]</sup> blieb dieses Ziel aber bis 2004 unerreicht (siehe Abschnitt 5.3).<sup>[88]</sup> Neben diesem kürzlich erzielten Durchbruch gibt es aber einige Beispiele für die Herstellung von 3D-Strukturen aus DNA, z.B. von Nanoröhren und Drahtgittermodellen geometrischer Körper.

### 5.1. DNA-Nanoröhren

Vom konzeptionellen Standpunkt aus lassen sich DNA-Nanoröhren herstellen, indem man zunächst ein 2D-Gitter oder Band aus Kacheln erzeugt, das sich anschließend zu einer Röhrenstruktur zusammenrollt. Dazu werden Bausteine verwendet, die inhärent dazu neigen, gebogene Strukturen zu bilden. Dies trifft auf modifizierte  $4 \times 4$ -Kacheln,<sup>[50]</sup> DAE-DX-Kacheln (**30** in Abbildung 12)<sup>[89,90]</sup> oder TX-Kacheln<sup>[91]</sup>



**Abbildung 12.** DNA-Nanoröhren. Schematische Darstellung der quaderförmigen DX-Kacheln **30**; das linke Konstrukt bildet ein ebenes Gitter,<sup>[90]</sup> im rechten Schema induzieren die Abstände und Orientierung der inhärenten Kreuzungspunkte ein gebogenes Kachelmotiv, das die Konstruktion von Nanoröhren ermöglicht. Das AFM-Bild zeigt, wie eine Nanoröhre (weiße lineare Struktur) nach und nach unter dem AFM zu einem flachen Gitter (graue Struktur) geöffnet wird. Die sechs Helices von Motiv **31**, die durch Kreuzungspunkte miteinander verbunden sind, bilden ein Sechshelixbündel (6HB).<sup>[92]</sup> Die zentralen Achsen der sechs Helices dieses Motivs bilden einen sechseckigen Querschnitt (siehe Schema darunter). Durch überlappende Anordnung von 6HB-Motiven entsteht ein zweischichtiges Gitter (**32**). Die beiden AFM-Bilder darunter zeigen eine aus 6HB-Motiven bestehende Nanoröhre (links) und ein sechseckiges Gitter (rechts). Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [90] (**30** und oberes AFM) und [92] (6HB-Schema und unteres AFM-Bild).

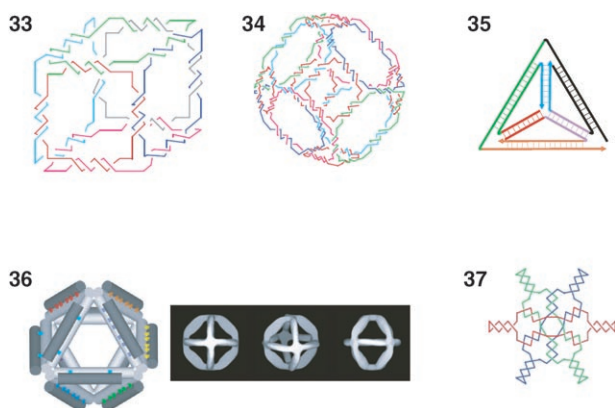
zu. Die DNA-Nanoröhren aus den Motiven **11** und **20** konnten durch stromlose Silberabscheidung metallisiert werden, sodass Ohmsche Leiter zugänglich wurden.<sup>[50,91]</sup> Durch Einbau von aus der Ebene herausragenden Haarnadelschleifen in Motive vom Typ **16** entstanden diagonal oder rechtwinklig gestreifte Nanoröhren, ähnlich wie bei den bereits beschriebenen gestreiften planaren Anordnungen (siehe Abschnitt 4.2). Die Streifenmuster ließen sich durch sorgfältige Wahl der Einzelstrangüberhänge der eingesetzten Motive variieren.<sup>[90]</sup> Die Bildung von DNA-Nanoröhren konnte durch den Einsatz von chemischen Linkermolekülen, die räumliche Einschränkungen induzieren, noch unterstützt werden (siehe Abschnitt 4.3).<sup>[85]</sup>

Eine andere Sorte von DNA-Nanoröhren wurde durch Zusammenfügen von Sechshelixbündel(6HB)-Motiven hergestellt.<sup>[92]</sup> Die 6HB-Motive bestehen aus Crossover-Kacheln, die sechs parallele Helices enthalten (Motiv **31** in Abbildung 12). Diese biegen sich um eine zentrale Achse, die parallel zu den helicalen Achsen liegt. Hierdurch bildet der Querschnitt einer Röhrenkachel ein Sechseck mit den Helixachsen als Ecken (Abbildung 12). Eine lineare Anordnung aus 6HB-Motiven bildete eine Nanoröhre. Durch Blockieren einiger Einzelstrangüberhänge wurde hingegen eine zweidimensionale, zweilagige Anordnung aus Sechsecken gebildet. Die Anordnung ähnelt Scheiben, die von einer solchen Nanoröhre abgeschnitten und in einer Ebene ausgelegt wurden (siehe **32** und das AFM-Bild in Abbildung 12).<sup>[92]</sup> Ein strukturell verwandtes Motiv aus nur drei Helices (3HB) bildete keine Röhre mit einem Hohlraum, sondern nur Filamente, die jedoch als Template für das Wachstum von Metall-Nanodrähten genutzt werden konnten.<sup>[93]</sup>

### 5.2. Drahtgittermodelle regelmäßiger Körper

Eine Reihe von DNA-Objekten, deren Strukturen Drahtgittermodellen regelmäßiger Körper mit Duplexen als Kanten entsprechen, wurde aus DNA hergestellt. Seeman und Mitarbeiter konstruierten solche Moleküle mit der Konnektivität eines Würfels (**33** in Abbildung 13),<sup>[94]</sup> ebenso wie ein geschnittenes Oktaeder (**34**, Abbildung 13).<sup>[95]</sup> Zur Synthese wurden drei- und vierarmige Junction-Motive verwendet, die in den Objekten die Ecken bilden. Kürzlich wurde ein Tetraeder aus vier 55-mer-ssDNA-Oligomeren durch Turberfield und Mitarbeiter konstruiert (**35**, Abbildung 13).<sup>[96]</sup> Dieses Objekt ist deutlich starrer als ein Würfel, da seine Geometrie das Tensegrity-Prinzip erfüllt (siehe Abschnitt 4.1). Die konformative Stabilität des Tetraeders konnte durch AFM-Messungen bestätigt werden. Hierbei waren die drei oberen Kanten erkennbar, und mithilfe der AFM-Spitze konnten externe Kräfte auf das Tetraeder ausgeübt werden.<sup>[97]</sup> Über ein anderes Beispiel eines mutmaßlichen DNA-Tetraeders aus chemisch verbundenen Trisiliconucleotiden berichteten von Kiedrowski et al. (siehe Abschnitt 4.3.3).<sup>[55]</sup>

Geometrische Objekte wurden sogar aus genetisch codierter DNA hergestellt. Shih et al. entwarfen eine 1669 Nucleotide lange ssDNA, die sich nach Zugabe von fünf 40-mer-Oligonucleotiden in eine zusammenhängende Struktur



**Abbildung 13.** Drahtgittermodelle. Während Konstrukte **33** und **34** nur die Konnektivität, nicht aber die dreidimensionale Form eines Würfels<sup>[94]</sup> bzw. eines angeschnittenen Oktaeders<sup>[95]</sup> haben, ist **35** durch seine stabile Tensegrity-Struktur tatsächlich ein dreidimensionales Tetraeder.<sup>[96]</sup> Die dreidimensionale Gestalt des Oktaeders **36** wurde durch Kryo-Elektronenmikroskopie nachgewiesen.<sup>[23]</sup> Wenn einer der drei Borromäischen Ringe des Konstrukts **37** geschnitten wird, sind auch die anderen beiden Ringe nicht länger miteinander verbunden.<sup>[98]</sup> Abdruck mit Genehmigung nach der jeweils angegebenen Literatur.

aus fünf DX- und sieben PX-Kacheln faltete und so ein dreidimensionales Objekt von der Gestalt eines Oktaeders bildete (**36**, Abbildung 13).<sup>[23]</sup> Kryo-Elektronenmikroskopie zufolge (Abbildung 13) wiesen diese Oktaeder wegen der Tensegrität, die aus den dreieckigen Seiten resultierte, eine starre und wohldefinierte dreidimensionale Form auf. Das Tensegritätsprinzip erweist sich damit als vielversprechender Ansatz für den Entwurf von 3D-DNA-Nanoarchitekturen. Der Entwurf der hierfür notwendigen Basensequenzen ist nicht viel schwieriger als für zweidimensionale Konstrukte. Ein wesentliches Problem liegt aber darin, Strukturen zu entwerfen, die stabil genug sind, um der Gravitation zu widerstehen.

Auch topologisch verknüpfte Ringmoleküle wurden aus DNA aufgebaut, beispielsweise wurde ein Satz Borromäischer Ringe synthetisiert. Dies sind miteinander verbundene Ringe, die alle durch Zerschneiden nur eines Rings voneinander getrennt werden (**37**, Abbildung 13).<sup>[98]</sup> Für dieses Konstrukt wurden zwei dreiarmlige Kreuzungen so entworfen, dass nur eine von ihnen die übliche B-DNA-Konformation einnimmt, während die andere in der ungewöhnlichen Z-DNA-Konformation vorliegt.

### 5.3. Ein dreidimensionales DNA-Gitter

Kürzlich berichteten Seeman und Mitarbeiter über ein regelmäßiges, ausgedehntes 3D-DNA-Gitter, dessen Kristallstruktur aufgeklärt werden konnte.<sup>[88]</sup> Die Struktur besteht aus drei sich wiederholenden Schichten aus parallelen Helices. Sich kreuzende Helices benachbarter Schichten tauschen Stränge aus und fixieren so die Schichten relativ zueinander. Alle Helices innerhalb einer Schicht verlaufen parallel zueinander mit einem Abstand von 20 Å und sind um 60° relativ zu denen der benachbarten Schichten gedreht. Dadurch werden lösungsmittelgefüllte Kanäle gebildet, die sowohl

parallel als auch im rechten Winkel zu den helicalen Achsen verlaufen. Überraschenderweise besteht diese recht komplexe Struktur aus vielen Kopien nur eines einzigen 13-mer-Oligonucleotids. Vier Kopien dieses Oligomers bilden einen dreidimensionalen Baustein, der aus zwei kurzen helicalen Regionen besteht, die durch einen Kreuzungspunkt verbunden sind. Ebenso bemerkenswert ist die Tatsache, dass das gesamte Konstrukt nur durch wenige Watson-Crick-Basenpaare zusammengehalten wird. Stattdessen assoziieren die Stränge hauptsächlich in paralleler Richtung durch Homobasenpaarungen, in erster Linie zwischen Guanin- oder Adeninbasen. Die supramolekulare Struktur wird zusätzlich durch Basenstapelwechselwirkungen zwischen Basenpaaren verschiedener Stränge stabilisiert. Bereiche mit variabler Länge zwischen den helicalen Regionen und den schichtübergreifenden Kreuzungspunkten legen die Abmessungen im Gitter und somit die Größen der Lösungsmittelkanäle fest. Die Autoren vermuten, dass solche DNA-Gitter als Wirtgerüste für die Aufnahme von Gästen in den Lösungsmittelkanälen dienen könnten, um hierdurch die Röntgenstrukturanalyse von Gästen zu ermöglichen.<sup>[88]</sup>

## 6. Anwendungen von DNA-Nanoarchitekturen

Der Begriff „Anwendung“ bezieht sich im Zusammenhang mit den hier besprochenen DNA-Nanoarchitekturen nicht auf kommerzielle Produkte, und es ist anzunehmen, dass solche Produkte tatsächlich nur langfristig zu erwarten sind. Zurzeit soll mit „Anwendung“ lediglich die Nutzung struktureller und/oder funktionaler Eigenschaften von DNA-Nanoarchitekturen gemeint sein. Dies ist beispielsweise bei der gerichteten Positionierung von Molekülen und Nanopartikeln auf einem DNA-Gerüst, der Herstellung elektrisch leitender Komponenten durch Metallisierung von DNA-Überstrukturen, der Verwendung von DNA-Gerüsten als nanomechanische Komponenten oder der Nutzung des Informationsgehalts von DNA-Konstrukten für mathematische Operationen der Fall. Die ersten beiden Anwendungsbeispiele wurden bereits bei der Beschreibung der Strukturmotive in den Abschnitten 3–5 diskutiert, im Folgenden werden wir uns auf nanomechanische Funktionseinheiten und das DNA-Computing konzentrieren.

### 6.1. DNA-Computing

1994 erbrachte Adleman den Nachweis, dass durch biochemische Manipulation von DNA Lösungen einer kleinen Instanz eines Standardproblems der Informatik berechnet werden können.<sup>[99]</sup> Diesem ersten Beispiel folgte eine große Zahl von Publikationen, die unterschiedliche Ansätze beschreiben, um die parallele Reaktion einer sehr großen Zahl von Molekülen für die Durchführung vieler paralleler Rechenschritte auf sehr kleinem Raum zu nutzen. Da es bereits ausgezeichnete Übersichtsartikel zum Thema DNA-Computing gibt,<sup>[100,101]</sup> werden wir uns hier auf Ansätze beschränken, die auf der Bildung regelmäßiger Überstrukturen durch Zusammenfügen komplexer DNA-Motive basieren. Um in das



allgemeine Konzept des DNA-Computing einzuführen und um aufzuzeigen, welche Probleme beim DNA-Computing behandelt werden können und wie logische Rechnungen mit biochemischen Techniken ausführbar sind, werden wir zunächst ein Beispiel erläutern, das auf sehr einfachen und grundlegenden biochemischen Manipulationen beruht.

Die einfachste Art, DNA zusammenzufügen, also die Hybridisierung eines einzelsträngigen Oligonucleotids mit seinem Watson-Crick-Komplement, kann bereits als effiziente Methode genutzt werden, um molekulare Erkennung zur Informationsgewinnung einzusetzen. Dieser Ansatz wurde im oberflächenbasierten DNA-Computing angewendet, bei dem Fängeroligomere auf einer festen Oberfläche immobilisiert wurden, um hiermit ein Erfüllbarkeitsproblem Boolescher Funktionen zu lösen. Dies ist ein schwieriges Standardproblem der Informatik.<sup>[102]</sup> Eine Boolesche Funktion nimmt Vektoren  $(x_1, \dots, x_n)$  aus  $n$  Bits  $x_i$ , die jedes die Werte 0 oder 1 annehmen können, als Argumente und liefert eine 0 oder 1 als Ergebnis. Eine solche Funktion kann durch einen Term beschrieben werden, der aus den Variablen  $x_i$  und den Booleschen Operatoren NOT, AND und OR besteht. NOT wandelt eine 0 in eine 1 um und umgekehrt. AND ergibt 1, wenn alle Argumente gleich 1 sind, und OR ergibt 1 wenn mindestens eines der Argumente gleich 1 ist (siehe Tabelle 1). Beim Er-

**Tabelle 1:** Boolesche Operatoren.<sup>[a]</sup>

x	y	NOT x	x AND y	x OR y	x XOR y
0	0	1	0	0	0
0	1	1	0	1	1
1	0	0	0	1	1
1	1	0	1	1	0

[a] x und y sind die Argumente, die die Werte 0 oder 1 annehmen können, die rechten vier Spalten zeigen die Ergebnisse der vier Operatoren NOT, AND, OR und XOR für jede Argumentkombination.

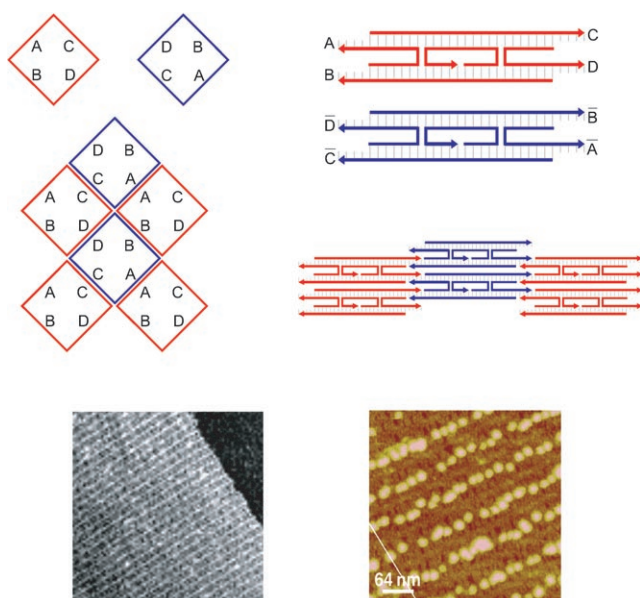
füllbarkeitsproblem besteht dieser Term aus so genannten Klauseln, die durch AND-Operatoren verknüpft sind. Jede Klausel besteht aus Variablen und Negationen von Variablen, die durch den Operator OR verknüpft sind. Zum Beispiel wäre „ $(x_1 \text{ OR } x_2) \text{ AND } (x_1 \text{ OR NOT } x_3 \text{ OR } x_4)$ “ eine gültige Funktionsbeschreibung. Das Problem besteht darin zu entscheiden, ob es wenigstens einen Argumentvektor  $(x_1, \dots, x_n)$  gibt, mit dem die gegebene Funktion diesen Vektor auf das Ergebnis 1 abbildet. Damit die Funktion für einen Argumentvektor eine 1 ergibt, das bedeutet „erfüllt“ wird, muss jede Klausel 1 ergeben.

Im oberflächenbasierten DNA-Computing<sup>[102]</sup> wurde eine Menge von DNA-Oligonucleotiden immobilisiert, die jeden der  $2^n$  möglichen Vektoren repräsentiert. Die Stränge, die Vektoren codieren, die die gegebene Funktion nicht erfüllen, wurden durch Iteration der folgenden Arbeitsschritte entfernt: In jedem Zyklus wurde eine Klausel betrachtet. Dazu wurden komplementäre Oligomere, die die Argumente repräsentierten, welche die aktuell behandelte Klausel erfüllen, mit allen Vektorsträngen durch Inkubation in Kontakt gebracht. Diese Komplementärstränge wurden vorher manuell ausgewählt. Dieser Schritt kann bei großen Anzahlen von Variablen sehr aufwändig werden und bildet daher den

hauptsächlichen Schwachpunkt der Methode. Immobilisierte Oligomere, die einzelsträngig verblieben waren, wurden anschließend mithilfe einer für ssDNA selektiven Nuclease verdaut. Hierdurch wurden die Vektorkandidaten, die die Klausel nicht erfüllen, von der Oberfläche entfernt. Dann wurden die Duplexe geschmolzen und die komplementären Oligomere durch Waschen entfernt. Die parallele Hybridisierung von unterschiedlichen Oligomeren schützt somit unterschiedliche vektorcodierende Stränge gleichzeitig vor dem Verdau, und deshalb entspricht der Verdau einer logischen OR-Operation. Die wiederholte Durchführung der Schritte Hybridisierung, Verdau, Schmelzen und Waschen, jedes Mal für eine andere Klausel der gegebenen Funktion, führt zu einer zunehmend einengenden Auswahl von Argumentvektoren und entspricht somit einer logischen AND-Operation. Schließlich verblieben als Resultat der logischen Berechnung lediglich die Stränge auf der Oberfläche, die alle Klauseln und somit die gesamte Funktion erfüllen.

Der hauptsächliche Nachteil dieses Ansatzes besteht in einem allgemeinen Problem, das allen DNA-Computing-Modellen zur Lösung schwieriger Rechenprobleme gemein ist: Zwar wächst die benötigte Rechenzeit nur polynomiell mit der Zahl an Variablen, anstatt exponentiell, wie es bei konventionellen Computern der Fall ist; man „bezahlt“ diesen Vorteil aber mit einer exponentiell wachsenden Zahl an unterschiedlichen DNA-Strängen, die für die Berechnung notwendig sind. Darüber hinaus wächst die benötigte Rechenzeit nur dann polynomiell, wenn man die oben beschriebenen Schritte zählt. Die Dauer eines Schrittes, nämlich die Auswahl der komplementären Oligomere für die Hybridisierung, wächst hingegen exponentiell, da die Zahl unterschiedlicher Oligomerarten, die ausgewählt werden müssen, exponentiell mit der Zahl an Variablen wächst.<sup>[103]</sup> Dieser Auswahlsschritt ist eigentlich schon ein Teil der Berechnung und sollte nicht dem menschlichen Anwender überlassen bleiben, sondern idealerweise direkt bei der molekularen Berechnung ausgeführt werden.

Um komplette Berechnungen lediglich durch Zusammenfügen von DNA-Motiven und damit ohne menschliche Interaktion ausführen zu können, nutzten Winfree et al. die Ähnlichkeit von DNA-Crossover-Kacheln zu so genannten „Wang-Kacheln“. Hierbei handelt es sich um ein mathematisches Modell zweidimensionaler geometrischer Formen mit gefärbten Kanten.<sup>[104,105]</sup> Zwei solche Kacheln können nur zusammengefügt werden, wenn die gemeinsamen Kanten dieselbe Farbe haben (Abbildung 14). Das Zusammenfügen von Wang-Kacheln kann genutzt werden, um einen zellulären Automaten zu simulieren. Dies ist ein theoretisches Modell eines Computers, das im Prinzip beliebige Berechnungen eines konventionellen Computers ausführen kann. Durch Simulation der Wang-Kacheln mit DX-Motiven, bei denen die Kantenfarben durch unterschiedliche Einzelstrangüberhänge codiert sind (Abbildung 14), wiesen Winfree et al. nach, dass die zweidimensionale Selbstanordnung von DAE-DX-Kacheln (16) für beliebige Berechnungen genutzt werden kann. Als Beispiel entwarfen sie hierzu eine Menge von DX-Kacheln, die eine kleine Instanz des Hamilton-Pfad-Problems lösen konnten. Dies ist ein schwieriges Standardproblem der Informatik, bei dem die Aufgabe darin besteht,



**Abbildung 14.** Algorithmische Assemblierung von DNA-Kachel-Motiven. Kacheln mit farbcodierten Kanten (Wang-Kacheln, oben links; Farben sind durch Buchstaben dargestellt) können gemäß ihrer Kantenfarben zusammengefügt (unten links) und so für Berechnungen eingesetzt werden.<sup>[104]</sup> Wenn solche Kacheln durch DX-Motive wie **16** repräsentiert werden und die Kantencodierung auf die Komplementarität von Einzelstrangüberhängen abgebildet wird (oben rechts), lassen sich solche Berechnungen auch durch die Selbstorganisation der DX-Kacheln zu zweidimensionalen Gerüsten ausführen (unten rechts). Das linke AFM-Bild zeigt ein Beispiel eines solchen Gerüsts. Die aus der Ebene herausragenden Haarnadelschleifen zweier Kacheln, die analog zu Motiv **19** aufgebaut sind, erzeugen deutlich sichtbare Streifen auf den planaren 2D-DNA-Gerüsten.<sup>[63]</sup> Im rechten AFM-Bild wurden Gold-Nanopartikel an den Haarnadelschleifen befestigt.<sup>[66]</sup> Abdruck der AFM-Bilder mit Genehmigung nach Lit. [63] (links) und [66] (rechts).

einen Pfad entlang der Kanten durch einen Graphen zu suchen, sodass jeder Knoten genau einmal besucht wird.<sup>[104]</sup>

Kürzlich schlugen Jonoska et al. vor, dass auch Transducer, ein anderes theoretisches Computermodell, durch Zusammenfügen von TX-Kacheln wie **20** simuliert werden könnten.<sup>[106]</sup> Dieses molekulare Rechenmodell wird als „algorithmische Selbstorganisation“ bezeichnet. Der Ansatz ist elegant, weil die komplette Rechnung, abgesehen vom Auslesen des Ergebnisses, lediglich durch Hybridisierungs- und Ligationsschritte bewerkstelligt wird. Daher sind hier keine anderen aufwändigen Schritte wie PCR, Gel-Elektrophorese oder Oligomer-Extraktion mit magnetischen Mikrokugeln notwendig, wie sie in Adlemans richtungsweisender Arbeit benötigt wurden. Die algorithmische Selbstorganisation ist somit ein sehr vielversprechendes Verfahren in Richtung energie- und zeiteffizienten molekularen Rechnens. Auch aus Sicht des Sequenzentwurfs ist dieser Ansatz sehr interessant, da er auch für nicht-rechnerische Anwendungen eingesetzt werden kann. Ähnlich wie die Wahl einer Menge einfacher Regeln und Instruktionen den Verlauf einer kompletten Berechnung festlegen, wird hierbei durch entsprechende Einzelstrang-Komplementarität der Crossover-Kacheln die angestrebte Struktur des Konstruktes festgelegt. Deshalb

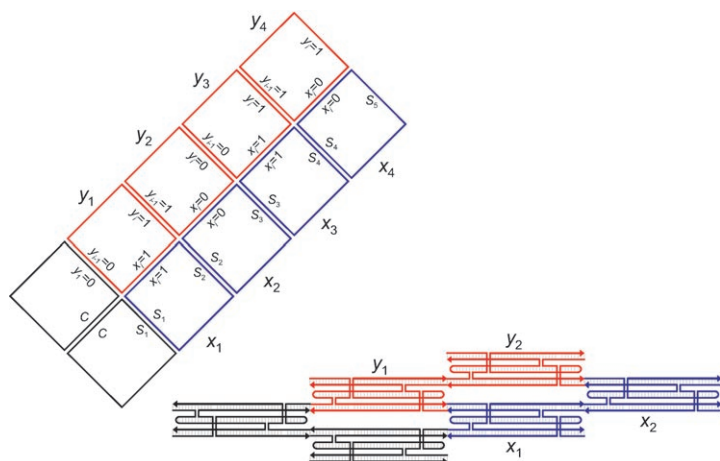
können diese Regeln auch als höhere Designsprache für die Selbstorganisation der Kacheln verwendet werden, die in die Basensequenzen der Einzelstrangüberhänge übersetzt werden muss. Die Autoren erwarten, dass, wie bei einem kleinen Computerprogramm, das eine recht komplexe Berechnung ausführen kann, eine kleine Menge unterschiedlicher Kacheln genügen könnte, um die Struktur komplexer Konstrukte festzulegen.

Das Konzept der algorithmischen Selbstorganisation wurde von Rothmund et al. angewendet, um DX-Kacheln wie **16** und **17** zu Sierpinski-Dreiecken zusammenzufügen.<sup>[107]</sup> Dies sind symmetrische, dreieckige Strukturen, die die Iteration von XOR-Rechnungen auf benachbarten binären Ziffern in einem Vektor darstellen. Die erste Reihe einer Assemblierung steht für den Eingabevektor, in dem eine Ziffer auf 1 und alle anderen auf 0 gesetzt sind. In jeder folgenden Reihe wird eine Kachel an Einzelstrangüberhängen zweier benachbarter Kacheln der vorhergehenden Reihe befestigt, die die Werte der dargestellten Ziffern repräsentieren. Die XOR-Operation zweier Binärziffern ergibt genau dann 1, wenn eine Ziffer gleich 1 und die andere Ziffer gleich 0 ist (Tabelle 1). Jede angefügte Kachel repräsentiert diese Operation durch ihre Kombination von Einzelstrangüberhängen. Sie bietet der nächsten Reihe genau dann Einzelstrangüberhänge an, die für 1 codieren, wenn die beiden Einzelstrangüberhänge, die die Kachel mit der vorhergehenden Reihe verbinden, für eine 0 und eine 1 codieren. Die Kacheln, die in 1 resultierende XOR-Operation darstellen, können wie in Motiv **19** mit einer herausragenden Haarnadelschleife markiert werden. Die zweidimensionale Kachel-Anordnung zeigt dann ein symmetrisches, dreieckiges Muster aus Kacheln mit Schleifen (Ergebnis der entsprechenden XOR-Operation = 1) und Kacheln ohne Schleifen (Ergebnis = 0). Trotz der relativ hohen Fehlhybridisierungsraten von bis zu 10% waren die Autoren in der Lage, durch AFM-Analyse nachzuweisen, dass diese Strategie die Herstellung ausgedehnter Kristalle von Sierpinski-Dreiecken ermöglichte.<sup>[107]</sup> Diese Beispiele belegen, dass das Konzept der algorithmischen Selbstorganisation im Prinzip funktioniert und in der Praxis zur Lösung kleiner Problem instanzen eingesetzt werden kann. Allerdings wurde es bislang noch nicht zum Zusammenbau hochgradig aperiodischer Überstrukturen aus einer großen Zahl von Kachelarten verwendet. Dies wäre nötig, um Probleme interessanter Größe zu berechnen oder um z. B. komplexe Schaltkreise zu konstruieren.

Wenn TX-Kacheln so konstruiert sind, dass sie aus zwei DAO-DX-Kacheln mit gemeinsamer zentraler Helix bestehen (siehe z. B. Motiv **20** in Abbildung 8), ist ein Reporterstrang verfügbar. Infolgedessen produziert die Ligation zusammengefügt TX-Kacheln einen einzelnen DNA-Strang, der durch alle Kacheln der Anordnung verläuft (siehe z. B. den grünen Strang in **20**). Da Reporterstränge bei der DNA-Nanokonstruktion zum Nachweis verwendet werden, dass die Kacheln sich tatsächlich zur erwarteten Struktur zusammengefügt haben (Abbildung 2), kann diese Methode auch als Ausgabe einer durch den Assemblierungsprozess ausgeführten Berechnung genutzt werden.

Mao et al. berechneten eine binäre arithmetische Funktion, das kumulative XOR einer 4-Bit-Binärzahl, mithilfe des

In den Gatter-codierenden DNA-Kacheln wurden die Abstände zwischen Einzelstrangüberhängen und Kreuzungspunkten so gewählt, dass nach der Selbstorganisation die seitlichen Helices (hier als Pfänder („pawns“) bezeichnet), im etwa rechten Winkel ober- und unterhalb der Kachelebene herausragen, ähnlich wie es oben bei der Herstellung gestreifter Muster beschrieben wurde (siehe Motiv **21** in Abbildung 8). Die „Pfänder“ können dann verwendet werden, um eine zweite Schicht auf der ersten zu befestigen. In dieser zweiten Schicht wird die eigentliche Berechnung der Funktion für einen bestimmten Eingabevektor ausgeführt, während die erste Schicht die Funktion für beliebige Eingabevektoren definiert. Eine erste Reihe von TX-Kacheln, die an den Pfändern der ersten Reihe der unteren Kachelschicht befestigt sind, codiert den binären Eingabevektor. Jeder Einzelstrangüberhang, der zur zweiten Reihe hin gerichtet ist, codiert ein Bit. In der zweiten und in allen folgenden Reihen werden Operationskacheln, die elementare binäre Operationen darstellen, an die jeweils vorhergehende Reihe ligiert. Es gibt eine Kachelsorte für jede mögliche Kombination von Eingabebits und Operation. Erstere sind durch die Einzelstrangüberhänge, die die Kacheln an der vorhergehenden Reihe befestigen, codiert. Die Operation (NAND oder Identität) hängt von den herausragenden Einzelstrangüber-



Kacheln, von denen eine einen Einzelstrangüberhang liefert, der für  $y_1 = 0$  codiert. Die andere dieser Start-Kacheln liefert einen Einzelstrangüberhang, der komplementär zu einem Einzelstrangüberhang der  $x_1$ -Kachel ist. Somit kann eine komplette Reihe von Eingabe-codierenden Kacheln zusammengefügt werden (die blauen Kacheln in Abbildung 15). Diese sind durch Einzelstrangüberhänge verbunden, die Positionsinformationen enthalten (symbolisiert durch  $S_i$ ). Jede dieser Kacheln bietet der zweiten Reihe einen Einzelstrangüberhang an, der den Wert der Ziffer  $x_i$  codiert. Wie am Beispiel der Wang-Kachel in Abbildung 15 zu sehen ist, bestimmen zwei Kanten (Einzelstrangüberhänge), die die Werte von  $x_i$  und  $y_{i-1}$  codieren, welche Sorte von XOR-Kacheln (rot) sich mit diesen Kanten verbinden kann. Die korrekte Kachelart hat eine Kante, die den richtigen Wert von  $y_i$  codiert und zur Befestigung der nächsten XOR-Kacheln zur Verfügung steht. Das Endergebnis,  $y_n$ , wird durch den letzten, freien Einzelstrangüberhang der XOR-Kachelreihe codiert. Im Anschluss an die Assemblierungsreaktion können die komplette Rechnung und die Lösungen reproduziert werden,

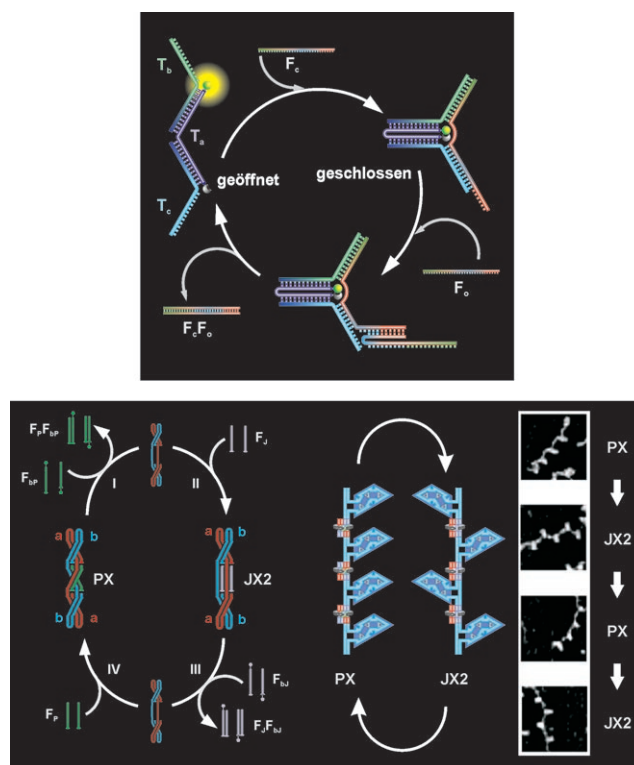


hängen ab, die komplementär zu den entsprechenden Pfändern der unteren Schicht sind. Das Ergebnis der Elementaroperation wird durch die Einzelstrangüberhänge der Kachel codiert, die zur nächsten Reihe hin ausgerichtet sind. Diese Operationskacheln hybridisieren zum einen mit den Eingabebitkombinationen, die von der vorhergehenden Reihe geliefert werden, und zum anderen mit dem Pfand aus der ersten Schicht, dessen Sorte den Operationstyp definiert. Dann bieten sie die Ausgabe-Einzelstrangüberhänge (der Zwischenergebnisse) zur weiteren Hybridisierung der nächsten Reihe an. Die letzte Reihe enthält nur eine Kachel (die Spitze des Dreiecks), deren Ausgabe-Einzelstrangüberhänge das Endergebnis darstellen. Die Autoren schlugen auch eine Methode vor, um die Schaltkreisschicht erst nach dem Zusammenfügen zu programmieren und sie somit wiederverwendbar zu gestalten. Hierzu verwendeten sie PX-JX-Kacheln als schaltbare Einheiten (siehe Abschnitt 6.2). Da dieser Ansatz eine bereits dreidimensionale Selbstorganisation einsetzt, scheint seine praktische Umsetzung jedoch sehr schwierig zu sein.

## 6.2. Nanomechanische Funktionseinheiten aus DNA

Aus DNA lassen sich nicht nur statische, sondern auch dynamische Gerüste herstellen.<sup>[111,112]</sup> Hierin können bestimmte Basenpaarungen z. B. durch Zugabe von höher affinen Bindungspartnern oder durch Änderung der Umgebungsbedingungen umgeschaltet werden, wodurch eine neue Konformation des Nucleinsäuremoleküls entsteht. Die Konformationsänderung lässt sich in einigen Fällen als Antriebsprinzip für dynamische Funktionseinheiten nutzen, die mechanische Arbeit verrichten können. Zu solchen Umgebungsänderungen gehören die Änderung von Salzkonzentrationen zur Regelung von Supercoiling,<sup>[113,114]</sup> des Übergangs zwischen B- und Z-Konformation einer DNA-Doppelhelix,<sup>[115]</sup> die reversible Bildung von G-Quadruplexen durch  $K^+$ -Ionen<sup>[116]</sup> sowie die Bildung von C-Quadruplex-Motiven<sup>[117]</sup> oder Tripelhelixstrukturen<sup>[118–120]</sup> durch pH-Änderungen. Da diese strukturellen Änderungen der Nucleinsäuren reversibel sind, kann die Richtung eines Übergangs durch oszillierende Umgebungsbedingungen wieder umgekehrt werden.

Eine weitere, als Strangverdrängung bezeichnete Methode basiert auf der selektiven Duplexbildung durch Hybridisierung (Abbildung 16). Hierbei wird durch die Zugabe eines DNA-Oligonucleotids, das spezifisch mit seinem Komplement innerhalb des DNA-Konstruktes hybridisiert, eine andere Basenpaarung gelöst. In der Regel enthält der zu lösende Strang einen Einzelstrangüberhang, der in diesem Kontext oft auch als Toehold bezeichnet wird. Das Verdrängungs-Oligonucleotid ist das perfekte Watson-Crick-Komplement des zu ersetzenden Stranges und bindet zunächst an dessen Einzelstrangüberhang. Die zusätzlichen Basenpaare der Einzelstrangüberhänge begünstigen den perfekten Duplex gegenüber dem kürzeren, bereits vorhandenen Duplex, sodass das Zieloligomer quantitativ aus dem Konstrukt verdrängt wird. Dieses Prinzip wurde in mehreren mechanischen DNA-Konstrukten von den Arbeitsgruppen



**Abbildung 16.** Nanomechanische DNA-Funktionseinheiten. Der Mechanismus der Strangverdrängung wird anhand der DNA-Pinzette von Yurke et al. illustriert (oben).<sup>[121]</sup> Die Pinzette besteht aus zwei Armen,  $T_b$  und  $T_c$ , die durch einen Scharnierstrang  $T_a$  verbunden sind. Hybridisierung eines Stranges  $F_c$ , der Abschnitte enthält, die komplementär zu den einzelsträngigen Abschnitten der beiden Arme sind, schließt den Komplex. Ein weiterer Strang  $F_o$ , der das perfekte Komplement von  $F_c$  ist, hybridisiert mit dem Toehold von  $F_c$ . Durch Wanderung der Verzweigungsstelle entsteht der perfekte Duplex aus  $F_c$  und  $F_o$ , wodurch die Struktur wieder geöffnet wird. Das untere Schema zeigt, wie die Strangverdrängung in einer PX/JX<sub>2</sub>-Nanomaschine eingesetzt wird, um zwischen den Konformationen **22** und **23** zu wechseln. Die AFM-Abbildungen zeigen ein experimentell realisiertes Beispiel, bei dem die Orientierung von Halb-Sechsecken entlang einer linearen Anordnung durch PX-JX<sub>2</sub>-Übergänge umgeschaltet wird. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [111].

um Yurke, Turberfield und Simmel eingesetzt. Zu den hiermit aufgebauten Funktionseinheiten gehören Pinzetten,<sup>[121]</sup> Scheren<sup>[122]</sup> und Aktuatoren,<sup>[123]</sup> bei denen durch Strangverdrängung gezielt bestimmte DNA-Arme geöffnet und geschlossen werden. Eine Anzahl von Erweiterungen und Kombinationen dieser drei Ansätze wurde ebenfalls beschrieben.<sup>[118,124–127]</sup>

Die Ausdehnung und Kontraktion von DNA-Molekülen lässt sich im einfachsten Fall durch Öffnen und Schließen von Haarnadelschleifen erreichen,<sup>[128]</sup> oder raffinierter durch den Übergang zwischen G-Quadruplex- und Duplex-Konformationen.<sup>[127,129]</sup> Mithilfe letzterer Methode gingen Simmel und Mitarbeiter einen wesentlichen Schritt in Richtung realer Anwendungen schaltbarer DNA-Nanostrukturen.<sup>[127]</sup> Hierzu entwarfen sie eine DNA-Struktur, in der ein G-Quadruplex-haltiges Thrombin-bindendes Aptamer durch Strangverdrängung geöffnet und geschlossen werden kann. Dies er-

möglichte die gezielte Bindung und Freisetzung eines Thrombin-Moleküls als Reaktion auf die Anwesenheit einer spezifischen DNA-Sequenz. Xiao et al. variierten diesen Ansatz und konnten damit einen Thrombin-Sensor aufbauen.<sup>[130]</sup> Hierzu wurde das Aptamer auf Goldelektroden immobilisiert und mit dem Farbstoff Methylblau (MB) beladen. In Abwesenheit von Thrombin befindet sich das Aptamer in einem konformativen Gleichgewicht zwischen G-Quadruplex und ungefaltetem Zustand, sodass über die MB-Moleküle ein effizienter Elektronentransfer mit der Elektrode stattfindet. Die Anwesenheit von Thrombin verschiebt dieses Gleichgewicht in Richtung der kompakteren G-Quadruplex-Konformation, wodurch der Elektronentunnelabstand geändert und der Elektronentransfer stark verringert wird.

Seeman und Mitarbeiter konstruierten komplexere nanomechanische Funktionseinheiten aus Crossover-Kacheln, die reversibel von der PX-Konformation zu ihrem Topoisomer JX<sub>2</sub> geschaltet werden können. Wie in Abbildung 16 dargestellt ist, verursacht der Ersatz von Strängen, die am zentralen Kreuzungspunkt beteiligt sind, eine Rotation von Paaren von Einzelstrangüberhängen im PX-Motiv.<sup>[131]</sup> Dieses Aufbaukonzept wurde kürzlich erweitert, um ein nanomechanisches DNA-Konstrukt herzustellen, das spezifische DNA-Polymere aus kurzen Oligonucleotiden synthetisiert. Dazu wurde eine lineare Anordnung von Paaren diamantförmiger Motive über PX/JX<sub>2</sub>-Einheiten verknüpft.<sup>[84]</sup> Der Konformationszustand einer jeden Einheit (PX oder JX<sub>2</sub>) legt fest, welches der beiden Diamantmotive eines Paares auf welcher Seite der DNA-Anordnung liegt. Zusätzliche DX-Motive wurden über Einzelstrangüberhänge an den Diamantmotiven gebunden, und durch weitere Hybridisierung und Ligation wurden zwei lineare Anordnungen der DX-Motive erzeugt, die auf beiden Seiten parallel zur Diamantpaar-PX/JX<sub>2</sub>-Anordnung liegen. Da die Konformation der einzelnen PX/JX<sub>2</sub>-Einheiten durch An- oder Abwesenheit von Schaltungsoligomeren („set strands“) eingestellt und damit die Abfolge der Diamantmotive auf jeder Seite der Anordnung festgelegt werden kann, wird durch die Schaltungsoligomere auch die Reihenfolge der Einzelstrangüberhänge für die Hybridisierung von DX-Kacheln festgelegt. Daher kann die Reihenfolge, in der die DX-Kacheln zusammengefügt werden, genau festgelegt werden. Als Antwort auf die Signale der Schaltungsoligomere ordnen die nanomechanischen Konstrukte also eine Anzahl von DX-Kacheln in einer bestimmten Reihenfolge an, die dann durch Ligation fixiert werden kann. Da keine Beziehung zwischen den Schaltungsoligomeren und den Produktsträngen bestehen muss, kann diese schaltbare DNA-Funktionseinheit bei der Synthese von DNA-Polymeren, der Verschlüsselung von Informationen oder als ein variables Eingabegerät für das DNA-Computing eingesetzt werden.<sup>[84]</sup>

Eine andere DNA-Funktionseinheit, die in Abhängigkeit von externen Stimuli definierte Antworten erzeugen kann, ist der von Shapiro und Mitarbeitern entwickelte „molekulare endliche Automat“.<sup>[132,133]</sup> Das Rechnermodell des endlichen Automaten verarbeitet sukzessiv eine Reihe von Eingabesymbolen. Sein molekulares Analogon aus DNA verarbeitet einen aufwändig entworfenen DNA-Duplex. Dies wird er-

reicht, indem iterativ der DNA-Duplex mit dem Restriktionsenzym FokI geschnitten wird und dann so genannte „Software-Duplexe“ an den neu entstandenen Einzelstrangüberhang ligiert werden. Hierdurch wird die Position der nächsten Schnittstelle festgelegt. Ähnlich wie das Modell eine Eingabesequenz mit bestimmten Eigenschaften erkennt, indem sie einen akzeptierenden Zustand annimmt, könnte das DNA-Äquivalent verwendet werden, um eine Kombination von RNA-Transkripten zu erkennen, um daraufhin ein terminierendes Molekül freizusetzen, das die Genexpression beeinflusst.<sup>[134]</sup>

Zu weiteren Beispielen nanomechanischer DNA-Funktionseinheiten gehören mobile DNA-Konstrukte, die auf DNA-Strecken wandern oder rollen,<sup>[135–138]</sup> molekulare Zahnräder,<sup>[139]</sup> die reversible Aggregation und Dispersion von Gold-Nanopartikeln<sup>[140]</sup> und ein Spielcomputer, der niemals eine Partie Tic-Tac-Toe verliert.<sup>[141]</sup>

Aus Sicht des Sequenzdesigns sind die grundlegenden Komponenten der Nanomaschinen und die Sequenzen ihrer Oligonucleotid-Bausteine häufig ähnlich denen, die für statische Konstrukte verwendet werden. Allerdings kann sich in den Maschinen die genaue Rolle einzelner Komponenten ändern: Doppelhelices können die Funktion von Hebeln anstatt von starren Gerüststangen einnehmen, und Ausbuchtungen (bulge loops) oder andere einzelsträngige Elemente dienen als Scharniere und nicht nur als Sehnen. Das Gesamtdesign von Nanomaschinen ist jedoch deutlich komplexer als das statischer Gerüste, da man nicht nur einen einzigen erwünschten Konformationszustand, sondern mindestens zwei oder sogar mehrere Zustände berücksichtigen muss.

## 7. Schlussfolgerungen

Wie die stark wachsende Zahl von Publikationen in diesem Gebiet belegt, sind Design und Herstellung von DNA-Nanoarchitekturen weit mehr als nur intellektuell faszinierende Spielerei. Insbesondere haben jüngste Fortschritte bei der Nutzung vergleichsweise einfacher symmetrischer Strukturen (z. B. **9** und **10** in Abbildung 6 oder **12** in Abbildung 7) vielversprechende Wege für reale Anwendungen aufgezeigt, etwa für die gerichtete Positionierung von Proteinen und Nanopartikeln oder die Herstellung nanoskaliger leitfähiger Komponenten. Allerdings ist klar abzusehen, dass viele andere Anwendungen, z. B. Gerüststrukturen für den Aufbau komplexerer Anordnungen aus unterschiedlichen Proteinen und Nanopartikeln oder die Berechnung von Probleminstanzen mathematisch relevanter Größe, entscheidend davon abhängen, ob große, hoch unsymmetrische, selbstorganisierte Architekturen entworfen werden können. Obwohl sich DNA bereits jetzt als ein höchst vielversprechendes Konstruktionsmaterial für solche Anwendungen erwiesen hat, müssen in Zukunft entscheidende Skalierungsprobleme gelöst werden.

### 7.1. Skalierbarkeit und Sequenzdesign

Wie bereits oben diskutiert wurde, muss der Entwurf von DNA-Sequenzen für Anwendungen in den Nanowissenschaften insbesondere unerwünschte Hybridisierungen zwischen den ausgewählten Sequenzen vermeiden. Dies kann durch Minimierung der Sequenzsymmetrie erreicht werden. Ein ernstes Problem, dem zukünftige Entwicklungen in der DNA-Nanotechnologie begegnen werden, betrifft die Skalierbarkeit, d. h. die Fähigkeit, DNA-Nanoarchitekturen so zu entwerfen, dass größere und/oder komplexere Muster aufgebaut werden können. Dies erfordert die Integration vieler unterschiedlich adressierbarer Sequenzbereiche, und damit eine große Zahl einzigartiger Einzelstrangüberhänge. Diese zunehmende Zahl an Einzelstrangüberhängen erfordert wiederum eine zunehmende Länge der DNA-Sequenzen. Hierdurch wird die Zahl einzigartiger Subsequenzen reduziert, was bedeutet, dass die Zahl der Subsequenzen, die mehr als einmal in der Menge aller Sequenzen auftaucht, zunimmt. Dies wiederum erhöht die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Kreuzhybridisierungen und verringert dadurch die Ausbeute erwünschter Assemblierungsprodukte.

Dieses allgemeine Problem kann zum Teil durch hierarchische Konstruktion umgangen werden. Hierbei werden die Bausteine (z. B. Junction-Motive oder Kacheln) zunächst in separaten Reaktionen hergestellt und dann anschließend in weiteren Schritten zu Strukturen höherer Ordnung zusammengefügt. Weiterhin können Einzelstrangüberhänge nach der Baustein-Synthese in einem Zwischenschritt erzeugt werden, indem beispielsweise Haarnadelschleifen durch Endonucleasen geschnitten werden.<sup>[142]</sup> Wenn die Bausteine genügend stabil und inert gegenüber Strangverdrängungsprozessen sind, muss im zweiten Schritt lediglich die spezifische Bindung der Einzelstrangüberhänge der Einzelbausteine beachtet werden. Ein anderer erfolgreicher Ansatz, Stränge sparsam zu verwenden, besteht in der gezielten Nutzung von Symmetrie während des Motiv-Designs. Dies bedeutet, dass die gleichen Oligonucleotide für unterschiedliche Teile eines Motivs mehrfach verwendet werden, z. B. für unterschiedliche Arme einer 4 × 4-Kachel.<sup>[49]</sup> Allerdings zögern diese Strategien das Skalierbarkeitsproblem lediglich hinaus, lösen es aber nicht. In den meisten der publizierten Arbeiten haben die verwendeten Einzelstrangüberhänge eine Länge zwischen 4 und 8 Nucleotiden. Wenn eine bestimmte Anwendung eine größere Zahl unterschiedlicher Kacheln erfordert, z. B. um ausgedehnte und hoch unsymmetrische Anordnungen zusammenfügen, müssen die Einzelstrangüberhänge aus mehr Nucleotiden bestehen, um die spezifische Unterscheidung während der Hybridisierung zu gewährleisten. Ebenso können längere Toeholds für die Strangverdrängung erforderlich sein, um die Kinetik des Strangaustauschs zu verbessern.<sup>[143]</sup> Die Notwendigkeit längerer Einzelstrangüberhänge erzwingt mehr helicale Windungen und größere Abstände zwischen Kreuzungspunkten und Bindungsstellen, für z. B. Proteine, sodass die minimale Größe solcher DNA-Gerüste damit zwangsläufig zunimmt.

Als einen möglichen Ausweg schlugen Winfree et al. vor, Fehlervermeidung (also die Verhinderung unerwünschter Kreuzhybridisierungen) mit Fehlerkorrektur (also der Re-

paratur von Fehlhybridisierung) im Assemblierungsprozess zu kombinieren.<sup>[144]</sup> Dazu könnte jede Konstruktionskachel eines zweidimensionalen Gerüsts in vier Kacheln unterteilt werden, die erst durch einzigartige interne Hybridisierung von Einzelstrangüberhängen die komplette Konstruktionskachel bilden. Eine Kooperativität zwischen den einzelnen internen Bindungen würde korrekte Verbindungen stabilisieren, während der Assemblierungsprozess von fehlerhaft zusammengefügt Konstruktionskacheln nur mit weiteren Fehlern fortgesetzt werden würde, sodass die unerwünschten Konformationen weiter destabilisiert würden. Die Einführung einer Fehlerkorrektur könnte sich als wertvoller Beitrag für die rationale Herstellung von DNA-Nanoarchitekturen erweisen, allerdings würde sie das Skalierungsproblem des Sequenzdesigns noch verstärken, da eine noch größere Zahl einzigartiger Einzelstrangüberhänge benötigt würde. Deshalb erfordern zukünftige Anwendungen von DNA-Nanoarchitekturen mit deutlich höherer Komplexität als die bisher bekannten Beispiele die Entwicklung ausgeklügelter Computerprogramme zur Auswahl von DNA-Sequenzen.<sup>[14–16]</sup>

### 7.2. Ausblick

Ausgehend von den Entwürfen, Konstruktionen und experimentellen Ergebnissen, über die in diesem Aufsatz berichtet wurde, kann eine Reihe spannender Entwicklungen in der näheren Zukunft erwartet werden. Adressierbare regelmäßige DNA-Anordnungen zur Immobilisierung molekularer und kolloidaler Komponenten für Anwendungen im Bereich der Sensorik und des Screenings könnten schon bald Realität werden und sich als Standardlabortechnik etablieren. Dieser Ansatz scheint auch im Hinblick auf kommerzielle Anwendungen vielversprechend. Um aber Massenproduktion zu ermöglichen, muss man nicht nur in der Lage sein, die strukturelle Integrität der Assemblierungsprodukte zu charakterisieren, sondern man muss auch die Ausbeute korrekt zusammengefügt Strukturen systematisch quantifizieren können. Hierzu müssen passende analytische Testverfahren entwickelt werden, die vermutlich auf der Kombination biochemischer und bildgebender Techniken basieren werden.

Hinsichtlich Anwendungen in der Nanoelektronik wurde die Herstellung leitfähiger Drähte durch Verwendung von DNA als Templat bereits demonstriert.<sup>[145]</sup> Die nächsten Schritte zur Konstruktion komplexerer elektronischer Komponenten und Schaltkreise werden die Entwicklung origineller und innovativer Konzepte erfordern, um die strukturelle Vielfalt und Konnektivität solcher DNA-Architekturen maßzuschneidern.<sup>[146,147]</sup> Ein weiterer entscheidender Punkt betrifft die Anpassung von Produktionsprozessen, da die DNA-Assemblierung physiologische wässrige Bedingungen benötigt und die anschließende Verarbeitung üblicherweise eine starke physikalisch-chemische Beanspruchung der Materialien oder sogar Trockenphasen- und Vakuumprozesse erfordert.

Die wahrscheinlich größte Herausforderung liegt in der Entwicklung nanomechanischer und selbstreplizierender Funktionseinheiten aus DNA, die den Weg für autonome Maschinen bereiten könnte. Um die mechanische Arbeit, die



von DNA-Komponenten geleistet werden kann, in eine produktive Anwendung umzusetzen, muss die mechanische Komponente in einem größeren DNA-Gerüst eingebaut sein. Solche Architekturen könnten dann logische Berechnungen als Antwort auf bestimmte Stimuli ausführen. Erste Beispiele in dieser Richtung wurden bereits beschrieben,<sup>[127,134]</sup> und sie können als allererste Schritte in Richtung der autonomen Nanoroboter der Science-Fiction-Welt angesehen werden, die Wunden heilen und chirurgische Operationen an lebenden Organismen ausführen. Auch wenn die Entwicklung effizienter Methoden zum Sequenzdesign für die zukünftige Realisierung dieser Perspektiven unabdingbar sein wird, möchten wir betonen, dass die Zahl an Beiträgen zu diesem jungen Forschungsgebiet stetig wächst.<sup>[150]</sup> Daher darf man davon ausgehen, dass neuartige und unkonventionelle Ansätze auftauchen werden, um die zurzeit existierenden Probleme zu lösen. Um diesen Ausblick abzuschließen, möchten wir daher den Wegbereiter der DNA-Nanokonstruktion, Nadrian Seeman, zitieren: „As with any craft material, the structural applications of DNA are limited only by the imagination“.<sup>[148]</sup>

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), der Europäischen Union (NUCAN-Projekt, STREP 013775) und dem Forschungsband „Molekulare Aspekte der Biowissenschaften“ der Universität Dortmund für finanzielle Unterstützung unserer Arbeiten. Wir danken Kersten Rabe für die Hilfe bei der Erstellung der Vortitel-Grafik.

Eingegangen am 6. Juli 2005,  
veränderte Fassung am 30. November 2005  
Online veröffentlicht am 10. Februar 2006

- [1] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, 421, 427.
- [2] C. A. Mirkin, *Inorg. Chem.* **2000**, 39, 2258.
- [3] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 4254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4128.
- [4] C. M. Niemeyer, C. A. Mirkin in *NanoBiotechnology: Concepts, Methods and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [5] M. H. Caruthers, *Science* **1985**, 230, 281.
- [6] K. B. Mullis, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1271; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1209.
- [7] J. F. Marko, S. Cocco, *Phys. World* **2003**, 16, 37.
- [8] E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 6166; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6042.
- [9] M. C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 293.
- [10] N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1547.
- [11] K. V. Gothelf, T. H. LaBean, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 4023.
- [12] V. V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, 29, 62.
- [13] J. Ackermann, F.-U. Gast, *Z. Naturforsch. A* **2003**, 58, 157.
- [14] N. C. Seeman, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1990**, 8, 573.
- [15] U. Feldkamp, H. Rauhe, W. Banzhaf, *Genetic Programming and Evolvable Machines* **2003**, 4, 153.
- [16] A. Brennenman, A. E. Condon, *Theoret. Comput. Sci.* **2002**, 287, 39.
- [17] R. M. Dirks, M. Lin, E. Winfree, N. A. Pierce, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 1392.
- [18] U. Feldkamp, R. Wacker, W. Banzhaf, C. M. Niemeyer, *ChemPhysChem* **2004**, 5, 367.
- [19] N. C. Seeman, H. Wang, B. Liu, J. Qi, X. Li, X. Yang, F. Liu, W. Sun, Z. Shen, R. Sha, C. Mao, Y. Wang, S. Zhang, T.-J. Fu, S. Du, J. E. Mueller, Y. Zhang, J. Chen in *Proceedings of the Second Annual Meeting on DNA Based Computers* (Princeton University, June 10–12, 1996), American Mathematical Society, **1999**, S. 215.
- [20] N. C. Seeman, H. Wang, X. Yang, F. Liu, C. Mao, W. Sun, L. Wenzler, Z. Shen, R. Sha, H. Yan, M. H. Wong, P. Sa-Ardyen, B. Liu, H. Qiu, X. Li, J. Qi, S. M. Du, Y. Zhang, J. E. Mueller, T.-J. Fu, Y. Wang, J. Chen, *Nanotechnology* **1998**, 9, 257.
- [21] N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, 27, 225.
- [22] E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, N. C. Seeman, *Nature* **1998**, 394, 539.
- [23] W. M. Shih, J. D. Quispe, G. F. Joyce, *Nature* **2004**, 427, 618.
- [24] C. M. Niemeyer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 609.
- [25] M. Lovrinovic, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3241; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3179.
- [26] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, 382, 607.
- [27] J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 1849.
- [28] C. M. Niemeyer, T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 5530.
- [29] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, Jr., P. G. Schultz, *Nature* **1996**, 382, 609.
- [30] C. M. Niemeyer, W. Bürger, J. Peplies, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2391; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2265.
- [31] C. J. Loweth, W. B. Caldwell, X. Peng, A. P. Alivisatos, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1925; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1808.
- [32] X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4956; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4848.
- [33] C. M. Niemeyer, L. Boldt, B. Ceyhan, D. Blohm, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1999**, 17, 527.
- [34] M. Zuker, D. H. Mathews, D. H. Turner in *RNA Biochemistry and Biotechnology* (Hrsg.: B. F. C. Clark), Kluwer, Dordrecht, **1999**, S. 11.
- [35] I. L. Hofacker, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 3429.
- [36] I. L. Hofacker, W. Fontana, P. F. Stadler, L. S. Bonhoeffer, M. Tacker, P. Schuster, *Chem. Mon.* **1994**, 125, 167.
- [37] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, 99, 237.
- [38] Y. Wang, J. E. Mueller, B. Kemper, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1991**, 30, 5667.
- [39] P. Sa-Ardyen, N. Jonoska, N. C. Seeman in *DNA Computing: 8th International Workshop on DNA-Based Computers, DNA8* (Sapporo, Japan, June 10–13, 2002), Revised Papers, Vol. 2568 (Hrsg.: A. Ohuchi), Springer, **2003**, S. 1.
- [40] B. Liu, N. B. Leontis, N. C. Seeman, *Nanobiology* **1994**, 3, 177.
- [41] S. M. Du, S. Zhang, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1992**, 31, 10955.
- [42] N. C. Seeman, Y. Zhang, J. Chen, *J. Vac. Sci. Technol. A* **1994**, 12, 1895.
- [43] Y. Li, Y. D. Tseng, S. Y. Kwon, L. d’Espaux, J. S. Bunch, *Nat. Mater.* **2004**, 3, 38.
- [44] Y. Li, Y. T. H. Cu, D. Luo, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 885.
- [45] J. C. Setubal, J. Meidanis, *Introduction to Computational Molecular Biology*, PWS, Boston, **1997**.
- [46] J. Malo, J. C. Mitchell, C. Vénien-Bryan, J. R. Harris, H. Wille, D. J. Sherratt, A. J. Turberfield, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3117; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3057.
- [47] C. Mao, W. Sun, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5437.
- [48] H. Yan, S. H. Park, G. Finkelstein, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Science* **2003**, 301, 1882.
- [49] Y. He, Y. Tian, Y. Chen, Z. Deng, A. E. Ribbe, C. Mao, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6852; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6694.
- [50] S. H. Park, H. Yan, J. H. Reif, T. H. LaBean, G. Finkelstein, *Nanotechnology* **2004**, 15, S525.
- [51] S. H. Park, P. Yin, Y. Liu, J. H. Reif, T. H. LaBean, H. Yan, *Nano Lett.* **2005**, 5, 729.

- [52] Z. Deng, C. Mao, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4160; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4068.
- [53] Y. He, Y. Chen, H. Liu, A. E. Ribbe, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12202.
- [54] R. B. Fuller, *Synergetics*, Macmillan, New York, **1975**.
- [55] G. von Kiedrowski, L.-H. Eckardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Reimold, M. Rein, *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 609.
- [56] D. Liu, M. Wang, Z. Deng, R. Walulu, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2324.
- [57] J. Qi, X. Li, X. Yang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6121.
- [58] N. Chelyapov, Y. Brun, M. Gopalkrishnan, D. Reishus, B. Shaw, L. Adleman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13924.
- [59] T.-J. Fu, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3211.
- [60] X. Li, Y. Xiaoping, Q. Jing, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6131.
- [61] T. H. LaBean, H. Yan, J. Kopatsch, F. Liu, E. Winfree, J. H. Reif, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1848.
- [62] Z. Shen, H. Yan, T. Wang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1666.
- [63] F. Liu, R. Sha, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 917.
- [64] H. Yan, T. H. LaBean, L. Feng, J. H. Reif, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8103.
- [65] S. Xiao, F. Liu, A. E. Rosen, J. F. Hainfeld, N. C. Seeman, K. Musier-Forsyth, R. A. Kiehl, *J. Nanopart. Res.* **2002**, *4*, 313.
- [66] J. D. Le, Y. Pinto, N. C. Seeman, K. Musier-Forsyth, T. A. Taton, R. A. Kiehl, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2343.
- [67] Y. Y. Pinto, J. D. Le, N. C. Seeman, K. Musier-Forsyth, T. A. Taton, R. A. Kiehl, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2399–2402.
- [68] H. Li, S. H. Park, J. H. Reif, T. H. LaBean, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 418.
- [69] R. Schulman, S. Lee, N. Papadakis, E. Winfree in *DNA Computing: 9th International Workshop on DNA Based Computers*, DNA9 (Madison, USA, June 1–3, 2003), Revised Papers, Vol. 2943 (Hrsg.: J. Chen, J. Reif), Springer, **2004**, S. 108.
- [70] X. Yang, L. A. Wenzler, J. Qi, X. Li, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9779.
- [71] X. Zhang, H. Yan, Z. Shen, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12940.
- [72] B. Ding, R. Sha, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10230.
- [73] C. Zhou, Z. Tan, C. Wang, Z. Wei, Z. Wang, C. Bai, J. Qin, E. Cao, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2001**, *19*, 807.
- [74] M. A. Batalia, E. Protozanova, R. B. Macgregor, D. A. Erie, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 269.
- [75] A. Chworos, I. Severcan, A. Y. Koyfman, P. Weinkam, E. Oroudjev, H. G. Hansma, L. Jaeger, *Science* **2004**, *306*, 2068.
- [76] A. Y. Koyfman, G. Braun, S. Magonov, A. Chworos, N. O. Reich, L. Jaeger, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11886.
- [77] K. M. Stewart, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2050.
- [78] K. V. Gothelf, A. Thomsen, M. Nielsen, E. Cló, R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1044.
- [79] K. V. Gothelf, R. S. Brown, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1062.
- [80] M. Scheffler, A. Dorenbeck, S. Jordan, M. Wüstefeld, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3513; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3311.
- [81] L. H. Eckardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Rein, M. Schweitzer, N. Windhab, G. von Kiedrowski, *Nature* **2002**, *420*, 286.
- [82] M. Endo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13654.
- [83] M. Endo, S. Uegaki, T. Majima, *Chem. Commun.* **2005**, 3153.
- [84] S. Liao, N. C. Seeman, *Science* **2004**, *306*, 2072.
- [85] M. Endo, N. C. Seeman, T. Majima, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6228; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6074.
- [86] N. C. Seeman, *DNA Cell Biol.* **1991**, *10*, 475.
- [87] N. C. Seeman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 519.
- [88] P. J. Paukstelis, J. Nowakowski, J. J. Birktoft, N. C. Seeman, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1119.
- [89] A. Ekani-Nkodo, A. Kumar, D. K. Fygenon, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 268301.
- [90] P. W. K. Rothmund, A. Ekani-Nkodo, N. Papadakis, A. Kumar, D. K. Fygenon, E. Winfree, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16344.
- [91] D. Liu, S. H. Park, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 717.
- [92] F. Mathieu, S. Liao, J. Kopatsch, T. Wang, C. Mao, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 661.
- [93] S. H. Park, R. Barish, H. Li, J. H. Reif, G. Finkelstein, H. Yan, T. H. LaBean, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 693.
- [94] J. Chen, N. C. Seeman, *Nature* **1991**, *350*, 631.
- [95] Y. Zhang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1661.
- [96] R. P. Goodman, R. M. Berry, A. J. Turberfield, *Chem. Commun.* **2004**, 1372.
- [97] R. P. Goodman, I. A. T. Schaap, C. F. Tardin, C. M. Erben, R. M. Berry, C. F. Schmidt, A. J. Turberfield, *Science* **2006**, *310*, 1661–1665.
- [98] C. Mao, W. Sun, N. C. Seeman, *Nature* **1997**, *386*, 137.
- [99] L. M. Adleman, *Science* **1994**, *266*, 1021.
- [100] M. H. Garzon, R. J. Deaton, *IEEE Trans. Evol. Comput.* **1999**, *3*, 236.
- [101] A. J. Ruben, L. F. Landweber, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 69.
- [102] Q. Liu, L. Wang, A. G. Frutos, A. E. Condon, R. M. Corn, L. M. Smith, *Nature* **2000**, *403*, 175.
- [103] H. Wu, *BioSystems* **2001**, *59*, 1.
- [104] E. Winfree, X. Yang, N. C. Seeman in *Proceedings of the Second Annual Meeting on DNA Based Computers* (Princeton University, June 10–12, 1996), American Mathematical Society, **1996**, S. 191.
- [105] E. Winfree, T. Eng, G. Rozenberg in *DNA Computing, 6th International Workshop on DNA-Based Computers, DNA 2000* (Leiden, Niederlande, June 2000), Revised Papers, Vol. 2054 (Hrsg.: G. Rozenberg), Springer, **2001**, S. 63.
- [106] N. Jonoska, S. Liao, N. C. Seeman in *Aspects of Molecular Computing, Essays Dedicated to Tom Head on the Occasion of His 70th Birthday, Vol. 2950* (Hrsg.: G. Rozenberg), Springer, **2004**, S. 219.
- [107] P. W. K. Rothmund, N. Papadakis, E. Winfree, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e424.
- [108] C. Mao, T. H. LaBean, J. H. Reif, N. C. Seeman, *Nature* **2000**, *407*, 493.
- [109] N. Jonoska, S. A. Karl, M. Saito in *Proceedings of the 3rd DIMACS Workshop on DNA Based Computers* (University of Pennsylvania, June 23–25, 1997) (Hrsg.: D. Wood), American Mathematical Society, **1999**, S. 123.
- [110] A. Carbone, N. C. Seeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12577.
- [111] C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3933; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3779.
- [112] F. C. Simmel, W. U. Dittmer, *Small* **2005**, *1*, 284.
- [113] X. Yang, A. V. Vologodskii, B. Liu, B. Kemper, N. C. Seeman, *Biopolymers* **1998**, *45*, 69.
- [114] C. M. Niemeyer, M. Adler, S. Lenhert, S. Gao, H. Fuchs, L. F. Chi, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 260.
- [115] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, *397*, 144.
- [116] R. P. Fahlman, M. Hsing, C. S. Sporer-Tuhten, D. Sen, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1073.
- [117] D. Liu, S. Balasubramanian, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5912; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5734.
- [118] Y. Chen, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8626.
- [119] Y. Chen, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13240.
- [120] M. Bruciale, G. Zuccheri, B. Samori, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 575.

- [121] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, Jr., F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature* **2000**, 406, 605.
- [122] J. C. Mitchell, B. Yurke in *DNA Computing, 7th International Workshop on DNA-Based Computers, DNA 2001* (Tampa, USA, 10–13 June 2001) (Hrsg.: N. C. Seeman), Springer, **2002**, S. 258.
- [123] F. C. Simmel, B. Yurke, *Phys. Rev. E* **2001**, 63, 041913.
- [124] F. C. Simmel, B. Yurke, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, 80, 883.
- [125] A. J. Turberfield, J. C. Mitchell, B. Yurke, A. P. Mills, Jr., M. I. Blakey, F. C. Simmel, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 90, 118102.
- [126] Y. Chen, M. Wang, C. Mao, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3638; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3554.
- [127] W. U. Dittmer, E. Reuter, F. C. Simmel, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3634; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3550.
- [128] L. Feng, S. H. Park, J. H. Reif, H. Yan, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 4478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4342.
- [129] P. Alberti, J.-L. Mergny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 1569.
- [130] Y. Xiao, A. A. Lubin, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 5592; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5456.
- [131] H. Yan, X. Zhang, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **2002**, 415, 62.
- [132] Y. Benenson, T. Paz-Elizur, R. Adar, E. Keinan, Z. Livneh, E. Shapiro, *Nature* **2001**, 414, 430.
- [133] Y. Benenson, R. Adar, T. Paz-Elizur, Z. Livneh, E. Shapiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 2191.
- [134] Y. Benenson, B. Gil, U. Ben-Dor, R. Adar, E. Shapiro, *Nature* **2004**, 429, 423.
- [135] J. H. Reif in *DNA Computing: 8th International Workshop on DNA-Based Computers, DNA8* (Sapporo, Japan, June 10–13, 2002), Revised Papers, Vol. 2568 (Hrsg.: A. Ohuchi), Springer, **2003**, S. 22.
- [136] W. B. Sherman, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2004**, 4, 1203.
- [137] J.-S. Shin, N. A. Pierce, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10834.
- [138] P. Yin, H. Yan, X. G. Daniell, A. J. Turberfield, J. H. Reif, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 5014; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4906.
- [139] Y. Tian, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11 410.
- [140] P. Hazarika, B. Ceyhan, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 6631; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6469.
- [141] M. N. Stojanovic, D. Stefanovic, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1069.
- [142] F. Liu, H. Wang, N. C. Seeman, *Nanobiology* **1999**, 4, 257.
- [143] B. Yurke, A. P. Mills, Jr., *Genetic Programming and Evolvable Machines* **2003**, 4, 111.
- [144] E. Winfree, R. Bekbolatov in *DNA Computing: 9th International Workshop on DNA Based Computers, DNA9* (Madison, USA, June 1–3, 2003), Revised Papers, Vol. 2943 (Hrsg.: J. Reif), Springer, **2004**, S. 126.
- [145] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, 391, 775.
- [146] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, *Science* **2002**, 297, 72.
- [147] K. Keren, R. S. Berman, E. Buchstab, U. Sivan, E. Braun, *Science* **2003**, 302, 1380.
- [148] N. C. Seeman, *Chem. Intell.* **1995**, 1, 38.
- [149] N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3220.
- [150] Nach Einreichung des Manuskripts wurden weitere Arbeiten über DNA-Nanoarchitekturen veröffentlicht: Park et al. fügten Quadrate aus 16 unterschiedlichen 4×4-Kacheln zusammen und wiesen mittels AFM nach, dass sich die Befestigung von Proteinen an bestimmte Kacheln präzise programmieren lässt (S. H. Park, C. Pistol, S. J. Ahn, J. H. Reif, A. R. Lebeck, C. Dwyer, T. H. LaBean, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 749; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 735). Zweidimensionale Matrizen aus verschiedenen 4×4-Kacheln wurden von Sharma et al. zur Positionierung von Gold-Nanopartikeln mit variierenden Abständen verwendet, wobei Nanopartikel mit exakt einem DNA-Oligonucleotid-Konjugat zum Einsatz kamen (J. Sharma, R. Chhabra, Y. Liu, Y. Ke, H. Yan, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 744; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 730). Winfree und Mitarbeiter berichteten über zwei algorithmische Selbstorganisationen von DNA-Wang-Kacheln, die einen Binärzähler nachbilden bzw. Bitketten kopieren, was zwei wichtigen elementaren Computeroperationen entspricht (R. D. Barish, P. W. K. Rothmund, E. Winfree, *Nano Lett.* **2005**, 5, 2586).