

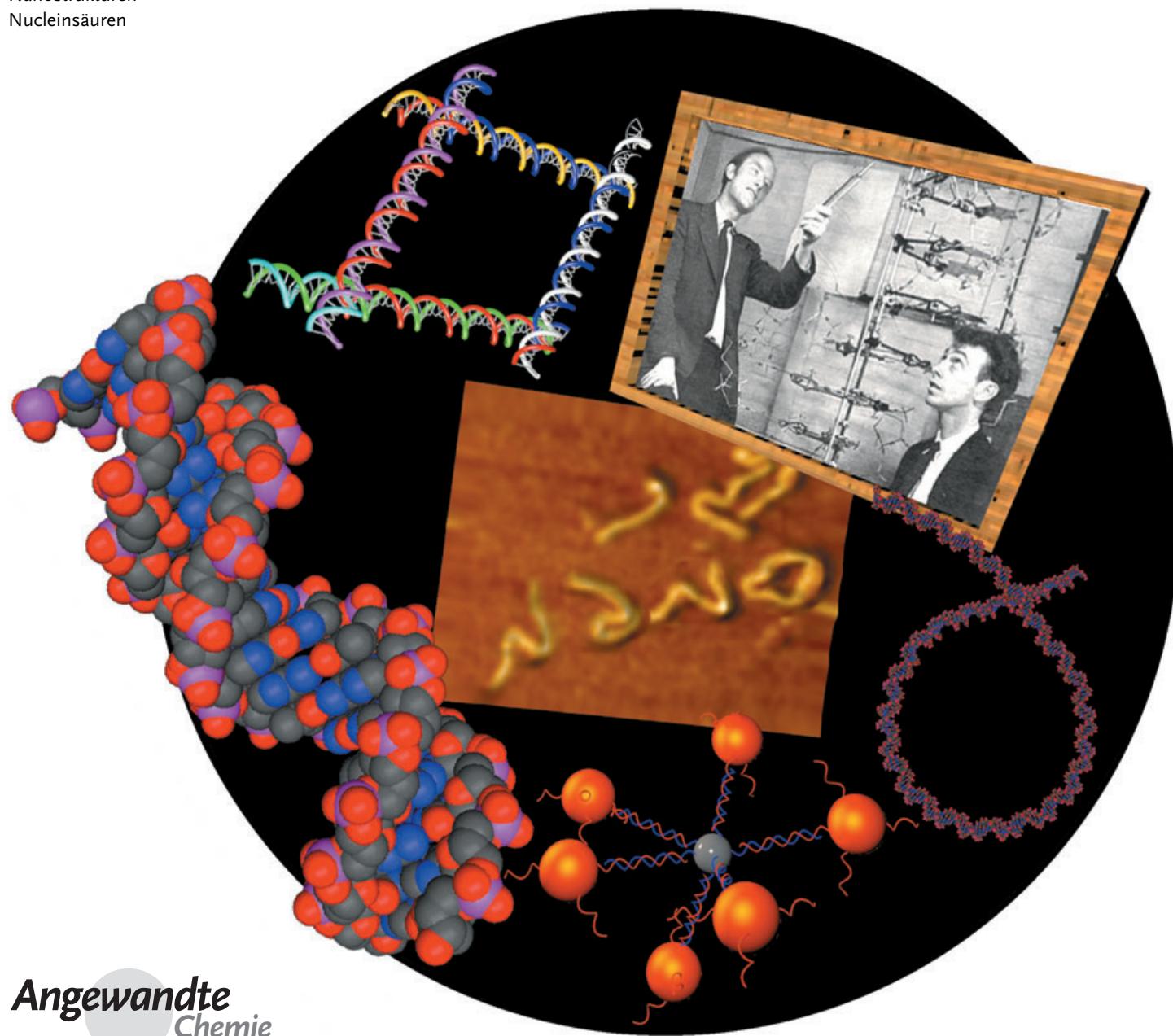
DNA-Codes für die Nanowissenschaften

Bruno Samorì* und Giampaolo Zuccheri

Stichwörter:

Bionanotechnologie · DNA ·
DNA-Protein-Wechselwirkungen ·
Molekulare Erkennung ·
Nanostrukturen ·
Nucleinsäuren

Im Gedenken an Claude Hélène



Der Nanometerbereich ist ein ganz spezieller Ort – treffen sich hier doch alle naturwissenschaftlichen Disziplinen. Die Nanowissenschaften ziehen ihre Ideen aus der Biologie, und Aufgabe der Chemie ist es, diese Ideen in nanotechnologische Anwendungen umzusetzen. Das biologische Molekül, das Nanowissenschaften und Nanotechnik gegenwärtig am meisten fasziniert, ist die DNA. Die Natur nutzt die DNA nicht nur als „Ablage“ für die genetische Information, sondern auch als Steuerungseinheit für die Expression der darin enthaltenen Gene. So enthält die DNA-Sequenz bestimmte Codes, die atomare Erkennungsprozesse wie etwa die Basenpaarung steuern, und andere, die Prozesse im Nanometerbereich kontrollieren. Aus chemischer Sicht ist die DNA die supramolekulare Baueinheit mit dem größten bekannten Informationsgehalt. Für die Nanowissenschaften ergibt sich daraus die Möglichkeit, mit DNA-Molekülen das Komplexitätsniveau und die Effizienz bei Selbstorganisations- und Selbstausrichtungsprozessen zu steigern.

1. Einleitung

Im Jahr 2003 wurde weltweit der 50. Jahrestag der Entdeckung der Doppelhelixstruktur der DNA begangen. Im Verlauf dieser 50 Jahre hat sich das Bild, das Watson und Crick in ihrem historischen Artikel in *Nature*^[1] zeichneten, erheblich gewandelt. Watson und Crick hatten anhand von Beugungsdaten von DNA-Fasern die DNA als einen homogenen Strang entsprechend der kanonischen B-Struktur beschrieben. Diese ist die übliche Struktur in lebenden Organismen und unter normalen Lösungsbedingungen. Sie hatten bereits im Blick, dass „die spezifische Basenpaarung einen möglichen Kopiermechanismus für das genetische Material birgt“. Andererseits könnte dieser homogene gerade Strang als bloße „Ablage“ für die genetische Information dienen, ohne nennenswerte eigene Funktion. Dies würde bedeuten, dass die Expression und Steuerung der Gene einzig den Proteinen überlassen wäre. Zunehmend Unterstützung findet gegenwärtig eine vereinheitlichende Vorstellung: dass nämlich die DNA selbst durch Protein-Erkennungsmechanismen (beruhend auf der Modulation der Struktur und der Dynamik entlang des Strangs) die Genexpression steuert. Bisher wurden diese Erkennungsprozesse vor allem durch hochauflösende Techniken wie Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie an kleinen Modellsystemen (Oligonucleotiden) untersucht. Neu entwickelte Methoden aus den Nanowissenschaften ermöglichen nun auch die Untersuchung von interaktiven DNA-Prozessen im Nano- und im Mikrometerräum, d. h. mit Molekülen, die den an Zellprozessen beteiligten Substraten weit ähnlicher sind. So wurde aufgedeckt, dass die in der DNA-Basensequenz enthaltenen Codes Prozesse über einen Längenbereich steuern, der vom atomaren Maßstab auf dem Niveau eines einzelnen Basenpaares bis hin zum Nanometer- und Mikrometermaßstab von DNA-Überstrukturen reicht.

Der Begriff „Code“ wurde von Trifonov definiert als „any pattern or bias in the sequence which corresponds to one or another specific biological (biomolecular) function or inter-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	1191
2. Der Basenpaarcode zur DNA-Erkennung auf atomarer Ebene	1191
3. Strukturcodes für die DNA-Erkennung auf der Nanoskala: Form und Flexibilität	1196
4. Zusammenfassung und Ausblick	1203

action.“^[2] Die Wirkung der DNA-Codes ist chemischer, vor allem struktureller Natur: Es ist die Komplementarität der Wechselwirkung zwischen zwei aromatischen Systemen, die die Basenpaarspezifität festlegt. Auf einer größeren Längenskala regelt das Arrangement mehrerer lokaler Strangdeformationen die Art und Weise, wie z.B. die DNA um die Histonproteine in den Nucleosomen im Chromatin gepackt ist.

Wir geben hier einen Überblick über informationelle Codes der DNA. Diese können als Werkzeuge zur Steuerung von DNA-Erkennungsprozessen eingesetzt werden, um z.B. die Selbstorganisation auf verschiedenen Längen- und Energieskalen zu schalten. Die DNA-Nanotechnologie hat sich bisher nur mit dem Basenpaarcode befasst, die DNA birgt aber weit mehr. Nach einem kurzen Überblick über die wichtigsten Entwicklungen werden wir vornehmlich komplexe Codes diskutieren, die in der Lage sind, vielfältige Informationshierarchien zu nutzen, um immer komplexere DNA-Nanostrukturen durch Selbstorganisation aufzubauen.

2. Der Basenpaarcode zur DNA-Erkennung auf atomarer Ebene

Die Paarung von komplementären Basen zweier DNA-Molekülen oder, in ähnlicher Weise, zwischen DNA und RNA oder RNA und RNA ist der grundlegende Vorgang bei der Replikation der DNA sowie anderen biologischen Prozessen wie der Transkription, Translation und Reparatur von DNA. In den Nanowissenschaften und der Nanotechnologie

[*] Prof. B. Samori, Dr. G. Zuccheri
Department of Biochemistry „G. Moruzzi“
University of Bologna und
The National Institute for the Physics of the Matter (INFM)
Via Irnerio 48, 40126 Bologna (Italien)
Fax (+39) 051-209-4387
E-mail: bruno.samori@unibo.it

wurden Methoden entwickelt, um diesen Code zur Erzeugung von Werkzeugen und molekularen Konstrukten zu nutzen.

2.1. Die Basenpaarung in der Zelle

Die spezifische Paarung von Nucleobasen ist der wesentliche Prozess zur Speicherung der genetischen Information der DNA. Das Watson-Crick-Muster möglicher Wasserstoffbrücken liefert die Grundlage für die Codierung der genetischen Information in Form eines robusten Codes (der in jedem dsDNA-Molekül in zwei Kopien vorhanden ist). Um zu der einigermaßen regelmäßigen, 2 nm breiten Struktur der Doppelhelix zu kommen, ist eine saubere Basenanordnung, einschließlich der exklusiven Paarung einer purinischen mit einer pyrimidinischen Base notwendig.

Die perfekte Paarung von Millionen von Basenpaaren der genomischen DNA erfordert eine komplexe und robuste Steuerung der Hybridisierung, da viele kurze komplementäre Sequenzen gleichzeitig um die Zielsequenz konkurrieren. Eine Vielzahl von Proteinen kommt zum Einsatz, um sicherzustellen, dass während der Rekombination jede suboptimale Paarung verworfen wird (durch Destabilisierung). Um andererseits aber die Evolution fortschreiten zu lassen, muss eine Balance zwischen genetischer Stabilität und genetischer Veränderung vorliegen.^[3]

Fehler in der Basenpaarung werden auch durch Schäden an der DNA selbst verursacht. DNA-schädigende Agentien gibt es sowohl exogen in der Umgebung als auch endogen durch Nebenprodukte von Stoffwechselvorgängen. Die Zellen haben einige Strategien entwickelt, um mit Brüchen des Doppelstrangs umzugehen.^[4] Außerdem gibt es auch „normale“ Vorgänge, wie etwa die Rekombinationsprozesse während der Entwicklung des Lymphsystems der Wirbeltiere, die eine gewisse Zahl von Doppelstrangbrüchen auslösen können.

2.2. Verwendung der Basenpaarung in den Nanowissenschaften und der Nanotechnologie

Spezifische Erkennungsprozesse zwischen komplementären Nucleotidsträngen (unter Bildung eines Watson-Crick-Doppelstranges) finden zunehmend Anwendung in den Na-

nowissenschaften. Ziel ist meist die Steuerung spezifischer Erkennungsprozesse zum Aufbau von Nanostrukturen bestehend aus DNA, aus DNA und anderen Komponenten oder aus hauptsächlich anderen Komponenten, wobei die DNA lediglich zum Antrieb der Aggregatbildung verwendet wird. Die gut kontrollierbaren molekularen Eigenschaften der DNA ermöglichen den Aufbau von Aggregaten mit vorausagbarer Struktur sowie von geordneten (regelmäßigen) Systemen. Die Aggregate können einen eindrucksvollen Grad an Komplexität erreichen, und trotz ihrer großen Zahl fügen sich die beteiligten DNA-Stränge präzise zu geordneten Strukturen zusammen.

Der DNA-Basenpaarcode kann auch für Rechenoperationen genutzt werden. In Anlehnung an die DNA lassen sich hochparallele Solver zur Lösung spezifischer Probleme und Algorithmen (z. B. des Hamilton-Pfads) implementieren. Das Gebiet DNA-Computing ist sehr jung und sehr aktiv und bewegt sich zunehmend weg von der Simulation hin zur Realisierung.^[5,6]

Besonders wichtig für Anwendungen des DNA-Basenpaarcode sind die Eigenschaften Affinität und Spezifität. Biomolekulare Wechselwirkungen und Erkennungsprozesse, die auf komplementären Formen beruhen (Enzym-Substrat, Antigen-Antikörper, Aptamerkomplexe kleiner Moleküle), weisen zugleich hohe Spezifitäten und Affinitäten auf. Eine nichtpräzise sterische Passform zweier Flächen ist energetisch oft hochgradig ungünstig. Bei Nucleinsäuren hingegen sinkt die Sequenzspezifität mit steigender Bindungsaffinität für die Zielsequenz. Der Grund ist, dass der Erkennungsmodus und die Assoziation zweier Nucleinsäureketten auf einem eindimensionalen Einleitungs-Reißverschluss-Mechanismus („Nucleation Zipping“) beruht.^[7,8] Die Bildung von Assoziaten auf der Basis der sterischen Passform unterscheidet sich grundlegend von der Bildung durch den Einleitungs-Reißverschluss-Mechanismus. Ein Schlüssel wird vollständig nutzlos, wenn seine Form auch nur geringfügig verändert wird. Bei einer Wechselwirkung, die durch das dreidimensionale Konzept der komplementären Form beschrieben wird, hängen sowohl Affinität als auch Spezifität vom Grad der sterischen Passform ab und korrelieren daher miteinander. Demgegenüber kann ein Reißverschluss, der einen irregulären oder fehlenden Zahn enthält, immer noch mit hoher Affinität schließen, wenn die kleine Fehlstelle einfach ausgespart bleibt. Eine Erhöhung der Affinität durch Verlängerung des



Bruno Samori ist Professor für Organische Chemie an der Universität Bologna. Bis 1990 beschäftigte er sich schwerpunktmäßig mit der Stereochemie synthetischer organischer Verbindungen (an der Universität Bologna, mit S. F. Mason am King's College in London und mit I. Tinoco an der UC Berkeley). In der Folgezeit widmete er sich zunehmend der Chemie und Biologie von DNA-Überstrukturen, später dann der Proteinbildung und der Mechanochemie. Er war Vorsitzender der Abteilung Chemie biologischer Systeme der italienischen chemischen Gesellschaft und der italienischen Gesellschaft für Mikroskopiewissenschaften.



Giampaolo Zuccheri ist Forscher in der Abteilung Biochemie der Universität Bologna. Er erwarb sein Diplom 1994 an der Fakultät für industrielle Chemie der Universität Bologna und promovierte 1998 an der Universität von Kalabrien. Er war Mitarbeiter bei Marcos Maestre am Lawrence Berkeley National Laboratoy und bei Carlos Bustamante, seinerzeit an der Universität von Oregon. Seine Forschungsinteressen konzentrieren sich auf die Chemie und Biophysik von Nucleinsäuren.

komplementären Abschnitts des „Reißverschlusses“ kompensiert nicht den geringen Verlust an freier Enthalpie aufgrund der Fehlpaarung, da der längere Komplex, der ebenfalls die Fehlpaarung enthält, in vergleichbarem Maße stabilisiert wird. Aus diesem Mechanismus resultiert, dass eine steigende Bindungsaffinität mit einer graduellen Abnahme der Spezifität der Nucleinsäuren-Hybridisierung einhergeht. Bei der Entwicklung einer Nucleinsäurensonde oder eines molekularen Aggregats muss man sich folgerichtig vor Augen halten, dass das längere Oligonucleotid nicht immer auch das bessere ist und auch alternative Strategien zur gleichzeitigen Verbesserung von Spezifität und Affinität existieren (siehe Übersicht in Lit. [7]).

2.2.1. Molekulare Aggregate auf DNA-Basis

Die Verwendung des Codes der Nucleotidsequenzen einzelsträngiger DNA zur Steuerung von Selbstorganisationsprozessen geht hauptsächlich auf Arbeiten der Arbeitsgruppen um Seeman^[9-13] sowie, in jüngster Zeit, von Reif und Winfree^[14,15] zurück. Große Polymeraggregate (ein- und zweidimensionale)^[16] sowie kleinere oligomere und monomere Objekte wurden beschrieben, wobei mindestens sechs unterschiedliche Oligonucleotide zu Strukturen auf Basis von blockierten Holliday-Junctions kombiniert sind (Abbildung 1a). Es wurden rechnergestützte Verfahren zur Identifizierung von Oligonucleotidsequenzen entwickelt, die die Spezifität der Selbstanordnung verbessern, indem sie Lese-rastermutationen und Fehlpaarungen minimieren. Hierbei handelt es sich um maßgebliche Fehlerquellen in der Selbstorganisation, die wahrscheinlich auch die Obergrenze der strukturellen Komplexität festlegen. Zur Charakterisierung der Bausteine und der Nanoobjekte werden vor allem die Rasterkraftmikroskopie und einige klassische biochemische Verfahren wie die Elektrophorese eingesetzt. Die Seeman'schen Aggregate auf DNA-Basis zeichnen sich vor allem durch die Steifheit ihrer Strukturen aus. Die DNA, die an sich schon ein relativ steifes Polymer ist, eignet sich zum Aufbau von verflochtenen Strukturen, die mehr als doppelt so steif wie dsDNA sind (d.h. eine Persistenzlänge von bis zu 100 nm haben; siehe Abschnitt 3.2).^[9]

Shih und Mitarbeiter berichteten erst kürzlich über einen DNA-Oktaeder von ungefähr 22 nm Durchmesser, der durch Falten einer sehr langen ssDNA (1699 Nucleotide) mittels eines einfachen Denaturierungs-Renaturierungs-Verfahrens in Gegenwart von fünf synthetischen 40mer-Oligonucleotiden hergestellt wurde.^[17] Ebenfalls interessant ist die Methode, die zur Präparation der aus 1699 Nucleotiden aufgebauten ssDNA angewendet wurde (ursprünglich von Stemmer et al. vorgeschlagen).^[18] Mit diesem Ansatz auf der Basis einer Polymerasekettenreaktion können aus synthetischen Oligodesoxynucleotiden Template mit über einem Kilobasenpaar Länge aufgebaut werden. Das Templat wird im Kontext eines bakteriellen Plasmids amplifiziert und später zur Klonierung herausgeschnitten.

Diese DNA-Strukturtypen haben nicht nur statische Codierungs- und Strukturfunktion, sie können auch funktionelle Eigenschaften aufweisen, z.B. Beweglichkeit. Die DNA kann auf Änderungen in der Umgebung mit Strukturände-

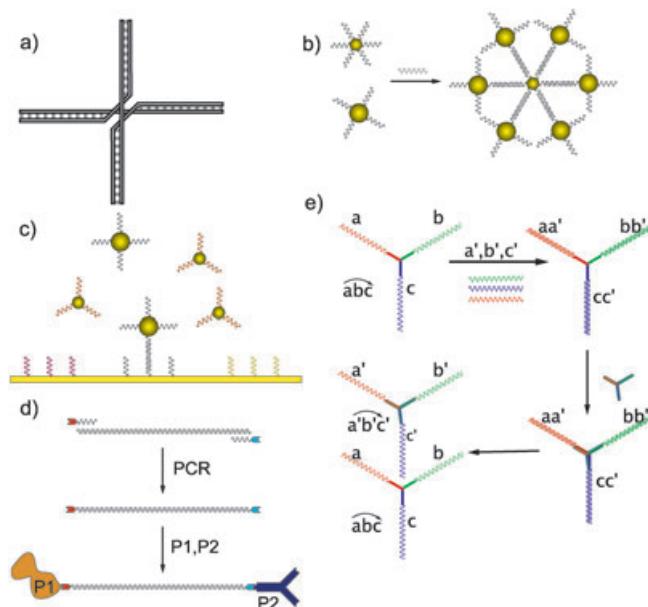


Abbildung 1. Beispiele von Nanoaggregaten auf DNA-Basis. a) Holliday-Junction, bestehend aus vier dsDNA-Armen, die um einen Kreuzungspunkt verbunden sind. Bei den natürlich vorkommenden Junctions (einer Zwischenstufe bei der Rekombination) kann der Kreuzungspunkt wegen der Sequenzsymmetrie der Arme migrieren. Blockierte Junctions mit fixierter Position, wie sie in der Arbeitsgruppe Seeman häufig als Bausteine eingesetzt werden, werden durch Symmetriebrech in der Sequenz um den Kreuzungspunkt erzeugt.^[16] b) Vernetzung von Oligonucleotid-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln durch ein Oligonucleotidmotiv, das häufig zum einem und zum anderen partikelgebundenen Oligonucleotid komplementär ist.^[23] c) Verankerung von Gold-Nanopartikeln an spezifischen Oberflächenstellen für Oligonucleotide. Die Verknüpfung kann ähnlich wie im vorigen Fall über ein häufig komplementäres Oligonucleotid erfolgen.^[28] d) Einführung einer Funktionalität in ein dsDNA-Segment von gewünschter Sequenz und Länge durch Polymerasekettenreaktion (PCR); mit dieser Methode sind maßgeschneiderte DNA-Protein-Hybride erhältlich.^[31] e) Selbstreplizierung von Konnektivität unter Oligonucleotiden;^[32] die Basenpaarung mit einer dreifach verknüpften Oligomermatrix wird genutzt, um drei Oligonucleotidstränge so im Raum zu lokalisieren, dass die Termini den richtigen Abstand für eine Verknüpfung mit einem weiteren dreifach verknüpften Oligomermodul einnehmen. Die Basenpaarung mit dem dreifach verknüpften Templat bestimmt die Konfiguration, in der das zweite dreifach verknüpfte Modul aggregiert.

rungen reagieren. Unter bestimmten Bedingungen führt z.B. eine GC-alternierende Sequenz einen B-Z-Übergang unter Umkehrung der Händigkeit der Doppelhelix aus. Seeman und Mitarbeiter setzten diese kontrolliert induzierte Rotation ein, um den Abstand von Objekten im Raum zu ändern.^[12] Die Bewegung von farbstoffmarkierten Objekten kann leicht anhand ihrer photophysikalischen Eigenschaften untersucht werden.

Wenn die Nanoobjekte durch programmierte Assoziation mehrerer Oligonucleotide aufgebaut werden, kann ein zweiter Ansatz zur Implementierung von Bewegung auf der kompetitiven Rekonstruktion der Objekte durch Hinzufügen anderer, stärker komplementärer DNA-Stränge basieren. Diese Strategie wurde von Yurke sowie Feng und Mitarbeitern zur Erzeugung von gesteuerten zyklischen Bewegungen

bei monomeren und polymeren (gitterförmigen) DNA-Objekten angewendet. Kennzeichnend für die „Motoren“ ist, dass sie DNA „verbrennen“: Ein voller Kontraktions-Retraktions-Zyklus benötigt zwei komplementäre Oligonucleotide, sodass ein Doppelstrang nutzloser DNA produziert wird. Yurke et al.^[19] entwickelten eine Nanopinzette, die, gesteuert durch spezifische Erkennung des Basenpaarcode, Objekte im Raum bewegen kann. Der Code wird genutzt, um das Öffnen und Schließen einer Serie von Pinzetten zu steuern und um das DNA-gebundene Objekt ortsgerichtet zu bewegen. Ein solcher Prozess, der auf dem einfachen Zusammenfügen weniger Komponenten in Lösung basiert, ist bemerkenswert.

Feng und Mitarbeiter^[15] wendeten diese Strategie auf die Seeman'schen Objekte an. Sie erhielten große flache Objekte, die durch die Zugabe von Oligonucleotiden komprimiert und expandiert werden. Diese eignen sich möglicherweise als „Mover“, als größenspezifische schaltbare Filter oder auch zum mechanischen Ablösen von komplexierten Objekten. Mehrere andere Arbeitsgruppen stellten Beispiele vor, bei denen Konformationsänderungen der DNA zum Bewegen von Objekten genutzt wurden.^[6,13,20]

2.2.2. DNA-vermittelter Aufbau von molekularen Aggregaten

Basierend auf der bahnbrechenden Idee von Robinson und Seeman,^[21] die DNA als Templat zum Aufbau von Schaltkreisen einzusetzen, und dem von Di Mauro und Hollenberg^[22] entwickelten Schema zur DNA-gesteuerten Implementierung elektrischer Drähte, wurden viele Beispiele von DNA-Objekten entwickelt. Oft handelt es sich um Hybride aus DNA und anderen Molekülsorten, die von kleinen organischen Molekülen bis hin zu Proteinen und synthetischen Polymeren reichen können.

Zur Herstellung dieser Materialien wird die DNA hauptsächlich als strukturgebendes Element genutzt, das die Selbstorganisation von Molekülen induziert, die sonst nicht oder ungeordnet miteinander wechselwirken. Die Baueinheiten werden durch chemische Synthese so präpariert, dass sie präzise auf die Selbstorganisation zu einem Molekül-Oligonucleotid-Hybrid zugeschnitten sind, sodass die Komponenten häufig nur noch in der richtigen Stöchiometrie zusammengegeben werden müssen, um die Addukte zu erhalten.

Mehrere Techniken zum oligonucleotidgesteuerten Aufbau von Nanoteilchen wurden in der Arbeitsgruppe um Mirkin entwickelt.^[23] Die einfachste Variante beruht auf der Verwendung von Thiol-modifizierten Oligonucleotiden (mittlerweile kommerziell erhältlich), die sich an Goldoberflächen anheften lassen.^[24] Aus den Arbeitsgruppen von Fritzsche,^[25] Niemeyer^[26] und Mirkin^[27] stammen Beispiele für die Anbindung von Gold-Nanoteilchen an flache Gold-Oberflächen. Der Ansatz bei diesen Experimenten war es, an den Nanoteilchen und der Oberfläche gebundene Oligonucleotide unter Erzeugung eines kurzen dsDNA-Strangs zu verknüpfen. In einigen Fällen waren die beiden Oligonucleotide nicht komplementär zueinander, sondern wurden über ein drittes, hälftig komplementäres Oligonucleotid verknüpft (Abbildung 1c).^[27,28] Mit der gleichen Strategie sind in Lösung

geordnete Aggregate von unterschiedlichen Nanopartikeln erhältlich. Die Oligonucleotid-funktionalisierten Nanopartikel werden über einen als „Klebstoff“ fungierenden Oligonucleotid-Linker zusammengefügt, der jeweils hälftig zu den auf den Nanopartikeln verankerten Oligonucleotiden komplementär ist (Abbildung 1b).^[23]

Niemeyer und Mitarbeiter untersuchten eine Anzahl von Streptavidin-DNA-Aggregaten. Biotinylierte Oligonucleotide werden kommerziell vertrieben oder sind durch Derivatisierung kommerzieller modifizierter Oligonucleotide mit heterobifunktionellen Linkern leicht zugänglich.^[29] Die Komplexe können auch verwendet werden, um andere biotinylierte Spezies an einen gegebenen DNA-Streptavidin-Komplex zu binden. Grundlage hierfür ist die Vierbindigkeit von Streptavidin (die eventuell noch erhöht werden kann). Zum Beispiel wurden biotinylierte Antikörper an oligonucleotid gebundenes Streptavidin gekuppelt, woraufhin der Antikörper-Komplex an eine spezifische Stelle einer Goldoberfläche adsorbierte, an die das komplementäre Oligonucleotid über eine Gold-Schwefel-Bindung gebunden war.^[30]

Bisher hat man meist kommerzielle modifizierte Oligonucleotide genutzt, die für gänzlich andere Zwecke (meist molekularbiologische) im Markt eingeführt waren. Das Leistungsvermögen der Synthesechemie hat sich folglich noch gar nicht vollständig entfaltet, einige bemerkenswerte Beispiele liegen aber vor. So synthetisierten Abell und Mitarbeiter asymmetrische Proteinhanteln ausgehend von eigens hergestellten modifizierten Oligonucleotiden, die spezifisch an Proteine binden und auch als Primer für die PCR (Polymerasekettenreaktion) fungieren (Abbildung 1d).^[31] Dies könnte ein erster Schritt hin zu einer organisierten Synthese von Replikaten der zellulären Multiproteinfabriken sein.

Ein anderes Beispiel für die Kombination von Organischer Chemie und DNA-Codierung präsentierte von Kiedrowski und Mitarbeiter.^[32] In dieser Studie wurde ein dreibindiger Linker zur Synthese eines Y-förmigen, dreifach verknüpften Oligonucleotids als Templat verwendet. Das Templat konnte mit drei komplementären Oligonucleotiden hybridisieren, die wiederum stereochemisch definiert mit einem zweiten dreifach verknüpften Linker vernetzen konnten (Abbildung 1e). Der gesamte Prozess kann als stereochemisch definierte Replikation einer Konnektivität aufgefasst werden – ein Vorgang, der ein hohes Maß an Kontrolle erfordert.

Die Nanoelektronik ist seit jeher eines der innovativsten Teilgebiete der Nanowissenschaften. Folgerichtig wurde der Basenpaarcode der DNA auch zur Herstellung von nanoelektronischen Funktionseinheiten genutzt. Ein Beispiel ist die durch Keren et al. beschriebene sequenzspezifische Lithographie von Einzelmolekül-DNA.^[33] Bei dieser Methode wird ein Protein, RecA, mit einer einzelsträngigen DNA verknüpft, die sequenzspezifisch in eine lange dsDNA invasiv einbauen kann. Die lange DNA-Doppelhelix wurde durch stromlose Metallisierung in einen metallischen Nanodraht umgewandelt, wobei der mit dem Nucleotid-Protein-Komplex maskierte Abschnitt nicht metallisiert wurde. Auf diese Weise wurde ein Metalldraht mit einem isolierenden Abschnitt erhalten, dessen Position und Länge durch die Sequenz des Einzelstrangabschnitts festgelegt ist.

In einem anderen Beispiel für die Verwendung von DNA-Codes in der Nanoelektronik wurden Kohlenstoffnanoröhren mit Oligonucleotiden derivatisiert.^[34] Die so modifizierten Nanoröhrchen könnten zu Gruppen von Nanoröhrchen verbunden werden. Auf diese Weise entstünde ein Material, das außergewöhnliche mechanische Eigenschaften hat und dessen Bausteine wegen der DNA-Substituenten wasserlöslich sind.

In einem weiteren Ansatz, der auf den Basenpaarungseigenschaften der DNA beruht, wurde über die Verknüpfung von DNA mit synthetischen Polymeren berichtet.^[35]

2.2.3. RNA und synthetische Analoga natürlicher Nucleinsäuren

Die Fähigkeit, durch Basenpaarung Information zu speichern, ist nicht allein der DNA vorbehalten. Die Basenpaarung von einzelsträngiger RNA mit DNA wurde genutzt, um Oligonucleotide (eventuell mit Objekten verknüpft) am RNA-Strang zusammenzufügen.^[29] Daneben kann die Wechselwirkung zwischen RNA-Molekülen untereinander herangezogen werden, um ungewöhnliche und komplexe Strukturen aufzubauen, die ausschließlich durch nichtkovalente Bindungen zusammengehalten werden. Die künstlichen modularen Einheiten, aus denen RNA-Nanoobjekte aufgebaut werden, heißen Tekto-RNA.^[36] Diese gezielt modifizierbaren RNA-Bausteine werden zum selbstorganisierten, regulierbaren Aufbau von RNA-Überstrukturen mit breitem Anwendungsbereich eingesetzt.^[37]

Derzeit gibt es ein großes Interesse an kleinen doppelsträngigen RNAs (auch als kleine interferierende RNAs oder siRNAs bezeichnet), die sich zur sequenzspezifischen Unterdrückung der Genexpression in Eukaryotenzellen verwenden lassen.^[38] Exogen verabreichte siRNA reduziert wirkungsvoll und spezifisch die Expression von homologen endogenen Genen. Dieser Ansatz zum Gen-Silencing kann dazu beitragen, die beim Einsatz herkömmlicher Antisense-Moleküle auftretenden Dosierungsprobleme zu lösen.

Peptidnucleinsäuren (PNAs) sind synthetische DNA- oder RNA-Mimetika, bei denen die Nucleobasen an ein ungeladenes peptidisches Polyamid-Rückgrat gebunden sind.^[39] PNA-Oligomere können mit komplementären DNA- und RNA-Oligomeren (oder anderen PNA-Oligomeren) stabile Watson-Crick-Duplexe bilden und durch invasiven Einbau in die Helix an Zielstrukturen in Duplex-DNA binden.^[40] Die chemischen, biologischen und medizinischen Anwendungen von RNAs in der Wirkstoff-Forschung, Gendiagnostik, molekularen Erkennung und ihre mögliche Rolle bei der Entstehung des Lebens wurden kürzlich in einer Übersicht zusammengefasst.^[41]

Modifizierte PNA-Moleküle fungieren als molekularer Signalgeber („molecular beacons“) zur denaturierungsfreien Erkennung spezifischer Sequenzen in der dsDNA. Molekulare Signalgeber sind empfindliche Fluoreszenzsonden, die selektiv mit definierten DNA- und RNA-Zielmolekülen hybridisieren. In Kombination mit PNA als dehybridisierendem Agens wurden molekulare Signalgeber eingesetzt, um eine ausgewählte Zielsequenz in einer dsDNA direkt zu detektieren und speziell um komplementäre von fehlgepaarten dsDNA-Sequenzen zu unterscheiden.^[42] Der Vorteil von

PNA- gegenüber DNA-Signalgebern besteht darin, dass ungereinigte und nicht deproteinierte DNA-Proben analysiert werden können. Mit dieser Eigenschaft könnten die PNA-Signalgeber in der aufkommenden DNA-Fluoreszenzdiagnostik Anwendung finden.^[43]

PNAs bieten ein breites Spektrum an Möglichkeiten zur Regulierung und Steuerung von Spezifität, Affinität und Sterik von Basenpaarwechselwirkungen.^[7] Entscheidende Eigenschaften sind: die Fähigkeit zur Bildung von Dreifachhelices, die potenzielle Chiralität^[44] und die verglichen mit dsDNA stärkere Basenpaarung bei PNA-DNA-Hybridien (wegen des elektrisch neutralen PNA-Rückgrats).

Andere kürzlich entwickelte DNA-Analoga, fixierte Nucleinsäuren („locked nucleic acids“, LNAs), sind modifizierte Nucleotide, die eine 2'-O,4'-C-Methylenbrücke enthalten. Diese Brücke ist in der 2'-endo-Konformation eingefroren, wodurch die Flexibilität des Ribofuranoseringes eingeschränkt ist und die Struktur in einer starren bicyclischen Formation fixiert wird. Es resultiert ein erhöhtes Hybridisierungsvermögen und eine außergewöhnliche biologische Stabilität.^[45] Ein LNA-Strang bildet stabilere Hybride mit seinem Zielmolekül als ein DNA-Strang,^[46] was einen breiteren Spielraum an experimentellen Bedingungen zulässt.^[47]

Ein weiterer Typ von Nucleinsäuren, die L-*α*-threo-Furanosyloligonucleotide oder TNAs, wurde durch Eschenmoser und Mitarbeiter synthetisiert.^[48] Komplementäre TNA-Stränge bilden stabile Doppelhelices und Watson-Crick-Basenpaare mit DNA, RNA und TNA. Mehrere DNA-Polymerasen wurden hinsichtlich ihrer Aktivität für ein TNA-Templat untersucht, und einige waren erstaunlich gut in der Lage, TNA-Abschnitte zu kopieren.^[49]

Es gab auch Versuche, das Konzept der DNA-Basenpaarung durch die Synthese einer Pseudo-DNA mit voluminösen polycyclischen Basen auszuweiten.^[50]

2.2.4. DNA-Chips und DNA-Nachweis: Lesen des Codes und das Wechselspiel von Affinität und Spezifität bei der Basenpaarung

Die Genanalyse ist mit die häufigste technische Anwendung, die den Basenpaarcode der DNA nutzt. Für Forschungs- und diagnostische Zwecke werden die Zellen auf bestimmte Gene oder auf den Expressionsgrad bestimmter Genprodukte hin untersucht.^[51,52] Für parallele Gtentests werden so genannte „Sensing-Arrays“ eingesetzt. Deren prinzipieller Aufbau besteht aus einer Anordnung von Oberflächen-Spots, an denen jeweils unterschiedliche Oligonucleotide verankert sind, die mit den DNA- oder RNA-Zielmolekülen oder den Analytmolekülen Basenpaarungen eingehen. Der Hybridisierungsvorgang wird mithilfe von signalgebenden Fluoreszenz-,^[51] elektroaktiven^[53] oder Nanopartikelmarkern^[28,54] ausgelesen. Versuche zum vollelektronischen Nachweis von markierten und unmarkierten Nucleinsäuren und Proteinen wurden unternommen,^[55] die erzielten Empfindlichkeiten sind bislang aber unzureichend (mehr als 10⁴ Analytmoleküle sind erforderlich). Ein Sensing-Array mit vollelektronischer Nachweistechnik könnte mit einfach applizierbaren, preiswerten und patientennahen Diagnostika kombiniert werden. Mögliche Anwendungen finden

sich in der Umweltanalytik, für Tests auf Biokampfstoffe sowie beim Nachweis von Pathogenen.

Es wurden mehrere chemische Strategien zur geordneten Immobilisierung von Nucleinsäuren auf Oberflächen eingeführt, darunter Elektropolymerisation, Streptavidin-Biotin-Kupplung und Thiol-Gold-Kupplung.^[56] Aufgabe ist es nun, vollelektronische Nachweismethoden für nichtmarkierte DNA-Moleküle zu entwickeln, die ohne eine Amplifizierung des Analyten (z.B. durch Polymerasekettenreaktion) auskommen. Hierfür gibt es zwei wesentliche technische Voraussetzungen: 1) Es müssen nanotechnologische Verfahren zur Signalverstärkung verfügbar sein; 2) es muss eine Methode geben, um die Affinität und Spezifität des Erkennungsprozesses bei der Basenpaarung *gleichzeitig* zu steigern. Der erste Punkt eröffnet ein völlig neues Forschungsgebiet, bezüglich des zweiten Punktes liegen schon substanzliche Ergebnisse vor (siehe z.B. den Übersichtsartikel von Demidov und Frank-Kamenetskii zum speziellen Wechselspiel zwischen Affinität und Selektivität bei den Wechselwirkungen von Nucleinsäuren^[7]). Die bisher entwickelten Ansätze zur gleichzeitigen Steigerung von Affinität und Selektivität greifen auf Oligonucleotide mit neuartigen Topologien zurück (cyclische, dendrimere oder nanopartikelgebundene Oligomere) oder auf neue Oligonucleotid-Analoga (LNAs, PNAs).^[7]

2.2.5. Zum Bedarf an Synthesestrategien für bionanotechnologische Bausteine

Gegenwärtig ist die Anwendung der DNA in der Nanotechnologie vor allem dadurch eingeschränkt, dass effiziente chemische Strategien zur Präparation, Reinigung und Handhabung der notwendigen Bausteine fehlen. Die heute verfügbaren Festphasentechniken liefern Oligonucleotide in Milligramm-Mengen – oder sogar darunter, falls hohe Reinheiten, sehr lange Moleküle (über 40 Nucleotide) oder anschließende Derivatisierung gefordert sind. Die Kosten für die Herstellung von Gramm-Mengen sind in der Regel untragbar. In der Organischen Chemie bedient man sich zur Herstellung und Reinigung von Nucleinsäuren meist biochemischer und molekularbiologischer Verfahren wie der Gel-elektrophorese und der Polymerasekettenreaktion. Diese Techniken, die zur Herstellung geringster Produktmengen entwickelt wurden, müssen erst entsprechend angepasst werden, um größere Mengen zu liefern. Selbst die leistungsfähigen und wegen ihrer Präzision geschätzten Verfahren auf der Basis von Restriktionsendonukleasen oder DNA-Ligasen sind bei weitem nicht effizient genug, um große Substratmengen sinnvoll zu bewältigen. Ebenfalls benötigt werden praxistaugliche Verfahren zur Derivatisierung von Oberflächen und zur Vernetzung von Bausteinen.^[57] Es wird große Anstrengungen erfordern, die derzeit verfügbaren Methoden an den Bedarf einer zukünftigen Bionanotechnologie anzupassen.

3. Strukturcodes für die DNA-Erkennung auf der Nanoskala: Form und Flexibilität

In der Basensequenz eines DNA-Segments ist auch die Dynamik des Strangs codiert. Die DNA nimmt unaufhörlich Formen und Strukturen an, die von der kanonischen B-Form abweichen; sie bildet Knäuel im Zellkern, sie „schwappet faul umher in einer molekularen Nährsuppe von Transkriptionsfaktoren und anderen regulatorischen Proteinen, die sich um den Kern herumtreiben“.^[58]

Mithilfe der Kraftfeldmikroskopie (AFM) können wir uns ein klares Bild von den scheinbar chaotischen Bewegungen eines einzelnen DNA-Moleküls machen. Abbildung 2 zeigt

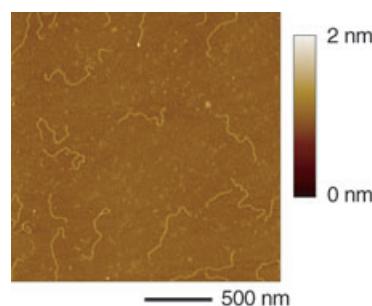


Abbildung 2. AFM-Aufnahme eines Tropfens mit palindromischen DNA-Dimeren, die durch Dimerisierung eines aus dem Plasmid pBR322 ausgeschnittenen Restriktionsfragments erhalten wurden. Die 1878 Basenpaare langen DNA-Moleküle wurden in einer Lösung mit 4 mM HEPES-Puffer (pH 7.4), 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ und ca. 1 nM DNA-Molekülen auf der Oberfläche von frisch gespaltenem Muskovit gespreizt. Zur Digitalisierung der Helixachsen und anschließenden Krümmungsanalyse wurden nur diejenigen Moleküle herangezogen, die sich vollständig innerhalb des Abbildungsrahmens befinden und keine anomalen Strukturen einnehmen (Schleifen, Knicke, angebundene Objekte). Kleinere DNA-Fragmente (oder nichtumgesetzte Monomere) wurden anhand ihrer Konturlängen erkannt und ausgeschlossen.

als Beispiel die AFM-Aufnahme eines Tropfens mit Molekülen von gleicher Sequenz und Länge, der auf der Oberfläche eines frisch gespaltenen Glimmerkristalls gespreizt ist. Die Makromoleküle haben unterschiedliche Gestalt und Konformation, obwohl sie in chemischer und biologischer Hinsicht alle völlig identisch sind. Entgegen dem ersten Eindruck jedoch ist die scheinbar chaotische Dynamik, die zu dieser Formenvielfalt führt, nicht zufallsbedingt.

3.1. Der Code für die DNA-Form: von der Ångström- zur Nanometerskala

Die räumlich-zeitliche Gestalt eines DNA-Moleküls wurde durch Überlagerung seiner thermisch fluktuierenden Strukturen mit der energetisch niedrigsten Struktur eines Strangs mit dieser Sequenz analysiert.^[59,60] Die mittlere Struktur der dsDNA wird von der Sequenz bestimmt: Die Unterschiede in der räumlichen Anordnung, bedingt durch die unterschiedlichen Basenpaare entlang des Strangs, führen zu einer deterministischen Modulation der relativen Orienta-

tierungen der mittleren Basenpaarebene. Die Orientierungen werden üblicherweise mit den Orientierungsparametern für die Basenpaarstufen gekennzeichnet: roll, tilt, twist (Abbildung 3).

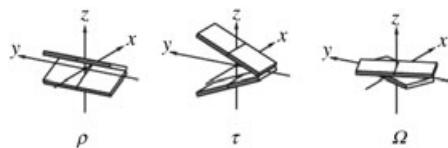


Abbildung 3. Die Orientierungsparameter der Dinucleotidstufen: roll (ρ), tilt (τ) und twist (Ω). Die Kombination der drei Verdrehungen entlang des DNA-Strangs verursacht lokale und globale Krümmungen.

Ein beträchtlicher Aufwand wurde unternommen, um die Parametersätze festzulegen, die den energetisch günstigsten Strukturen entsprechen. Eine kritische Diskussion der Ansätze findet sich in einer Übersicht von Crothers.^[61] In Tabelle 1 sind Parameter aufgeführt, wie sie zunächst durch Berechnung energieminimierter Konformere erhalten^[62] und

Tabelle 1: Orientierungsparameter (in Grad) der Basenpaarstufen von dsDNA (siehe Abbildung 3).^[64, 88] Die 5'-Enden sind in der linken Spalte angegeben, die 3'-Enden in der oberen Reihe; z. B. beträgt der Rollwinkel einer 5'-TA-3'-Stufe 8.0°.

Rollwinkel ρ	A	C	G	T
A	-5.4	-2.5	1.0	-7.3
C	6.8	1.3	4.6	1.0
G	2.0	-3.7	1.3	-2.5
T	8.0	2.0	6.8	-5.4
Tiltwinkel τ	A	C	G	T
A	-0.5	-2.7	-1.6	0.0
C	0.4	0.6	0.0	1.6
G	-1.7	0.0	-0.6	2.7
T	0.0	1.7	-0.4	0.5
Twistwinkel Ω	A	C	G	T
A	35.975	33.737	34.428	35.260
C	34.078	33.146	33.478	34.428
G	34.647	33.325	33.146	33.737
T	34.450	34.647	34.078	35.975

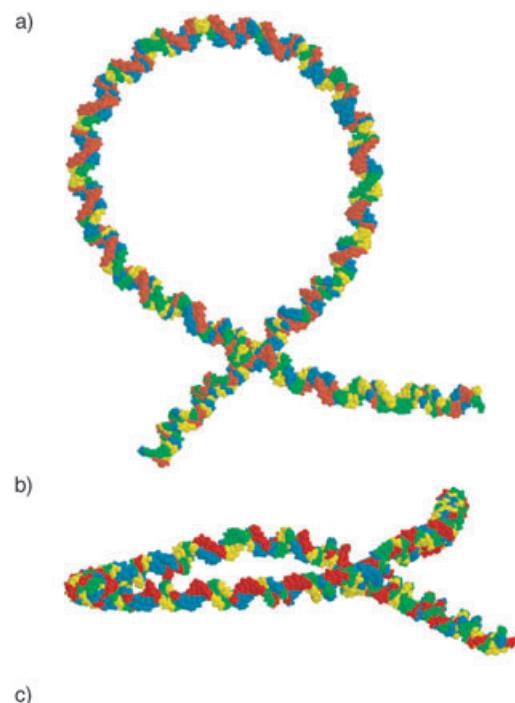
anschließend mithilfe von Ergebnissen aus Gelverzögerungsexperimenten verfeinert wurden.^[63, 64] Die Roll-, Tilt- und Twistwinkel der Dinucleotidstufen weichen erheblich von den Winkeln der kanonischen B-Struktur ab, wie sie von Watson und Crick vorgeschlagen^[1] und von Arnott und Hukins verfeinert worden war.^[65] Mit solchen Sätzen von Winkeln (die mit der Näherung der nächsten Nachbarn abgeleitet wurden) ist es leicht möglich, aus der Sequenz eines Moleküls die Strangkonformation mit der niedrigsten Energie zu bestimmen.

Positive oder negative Roll- oder Tiltwinkel erzeugen lokale Biegungen der Achse der Doppelhelix, was zu einem Zickzackmuster in der Strangachse führen kann. Die Achse bleibt dabei im Wesentlichen gerade, es sei denn, die Bie-

gungen sind mit der Helixwindung des Doppelstrangs synchronisiert. In diesem Fall entstehen ausgedehnte beständige Krümmungen, die sich vom Ångström- in den Nanometerbereich fortsetzen können.^[66]

Ein Beispiel für eine großformatige Krümmung ist das 211 Basenpaare lange Segment der Kinetoplasten-DNA des Trypanosomatiden *Crithidia fasciculata*. Es ist die am stärksten gekrümmte natürliche DNA, die derzeit bekannt ist. Ihre Sequenz (Abbildung 4c) ist durch eine periodische Wiederkehr von Abschnitten mit drei bis sechs Adeninresten charakterisiert; die Zentren der meisten dieser Abschnitte sind zehn oder elf Basenpaare voneinander entfernt, d. h. im Mittel eine Helixwindung. Diese mit der Helixwindung perfekt synchronisierte Verteilung der A-Abschnitte führt dazu, dass die energetisch günstigste Konformation dieses kurzen DNA-Segments eine Kreisform annimmt (Abbildung 4a,b). Den ersten experimentellen Nachweis einer solchen starken Krümmung erbrachten Griffith et al.^[67]

Intrinsische Krümmungen wurden durch Röntgenkristallographie an sehr kurzen doppelsträngigen Oligonucleotiden nachgewiesen.^[68] Bei längeren DNA-Molekülen kamen Gelverzögerung,^[69, 70] Zirkularisierungskinetiken,^[71, 72] Elektro-



GATCCCGCCT **AAAA**TTCCAA CCG**AAA**ATCG CGAGGTTACT
TTTTGGAGC CCG**AAA**ACCA CCC**AAA**ATCA AGG**AAA**ATG
GCC**AAA**ATGCC**AAA**ATAGCG**AAA**ATA CCCG**AAA**AT
TGGC**AAA**ATTAAC**AAA**ATA TAGCGAATT CCCTGAATT
TAGGC**AAA**AAACCCCGAA AATGGCCAAA AACGCACTGA
AAAT**CAAA**AT CTGAACGTCT CGG

Abbildung 4. Dreidimensionale Struktur des gekrümmten Segments der *Crithidia-fasciculata*-DNA (<http://archimede.chem.uniroma1.it/web-dna.html>). a) Blick etwa senkrecht zur Krümmungsebene (Adenin rot, Thymin blau, Guanin grün, Cytosin gelb); b) Blick etwa parallel zur Krümmungsebene; deutlich zu erkennen ist die Segregation der Adenin- und Thyminbasen an den beiden Seiten der Krümmungsebene; c) Basensequenz des DNA-Moleküls.

nenmikroskopie (EM)^[73] und AFM^[74,75] zum Einsatz. Ebenfalls beschrieben wurden molekulodynamische Methoden zur Simulation von Krümmungen.^[76] Die in diesen Experimenten eingesetzten dsDNA-Konstrukte enthalten gewöhnlich folgende Strukturmerkmale: 1) anomale flexible Stellen wie Einzelstrangbereiche,^[75] interne Schleifen aufgrund von Fehlpaarungen,^[70] einen einzelnen Knick^[77] oder einen doppelsträngigen Linker, der Dreifachhelixbereiche verknüpft,^[78] oder 2) Segmente, deren Krümmung durch Synchronisation^[75] oder Dissonanz^[60,71] der Adeninabschnitte mit der Helixwindung gesteuert wird. Sämtliche Ansätze zur Untersuchung der intrinsischen Krümmung beruhen auf der Bestimmung der globalen Parameter des Gesamtstrangs, z.B. der Persistenzlänge, des Abstands zwischen den Strangenden oder des J-Faktors der Zyklisierung. Durch Vergleich dieser globalen Parameter mit Parametern von Referenzsegmenten wurden Informationen über die codierenden Sequenzen und die molekularen Mechanismen der Krümmungsbildung erhalten. Auch ein kombinatorischer Ansatz wurde für solche Studien vorgeschlagen.^[71]

Die Trajektorie der Doppelhelixachsen individueller dsDNA-Stränge auf einem Substrat kann mit EM oder AFM verfolgt werden. Damit ist es möglich, die intrinsische Krümmung einer DNA durch eine Einzelmolekül-Strategie zu untersuchen, woraus sich Methoden zur Kartierung von natürlichen DNA-Strängen beliebiger Sequenz ableiten. Zu diesem Zweck misst man die Winkelablenkung entlang von Strangsegmenten eines Ensembles von Profilen (Abbildung 5a), bildet den Mittelwert und trägt diesen als Funktion der Position der Bruchstücke entlang der Kette auf (Abbildung 5b).^[74]

Auf diese Weise kann die intrinsische DNA-Krümmung theoretisch vorausgesagt und experimentell bestätigt werden, entweder als Mittelwert für einen bestimmten DNA-Strang oder in Form von Lokalwerten entlang der Kette. Trotz dieser Ergebnisse und vieler hochauflösender NMR- und röntgenkristallographischer Analysen von lokalen Biegungen in Oligonucleotiden bleibt der Ursprung von großräumigen Krümmungen auf atomarer Ebene Gegenstand der Debatte. Als sicher gilt, dass eine weit reichende Krümmung Adeninsegmente in definierten Abständen erfordert und die Zusammensetzung der Sequenzen zwischen den Adeninsegmenten eine geringe Rolle spielt (siehe Abbildung 4c).^[79] Wie nun die Adeninsegmente die Bildung einer Krümmung bewirken, ist nicht klar. Die Diskussion konzentriert sich vor allem auf die Geometrieparameter der Basenpaare an den Verbindungsstellen der Adeninsegmente mit dem übrigen Strang.^[68,80]

Es ist etwas überraschend, dass alle theoretischen Ansätze auf der Basis von Modellen des nächsten Nachbarn^[63,81,82] sehr ähnliche Ergebnisse für den Verlauf der Helixachse auf der Nanoskala liefern, obwohl unterschiedliche Parameter zur Beschreibung der Basenpaarstufen herangezogen werden (siehe auch die Tabellen 1 und 2 in Lit. [61]). Daher müssen wir zu dem Schluss kommen, dass die Krümmung eine weit reichende überstrukturelle Eigenschaft ist, die in erster Linie dadurch festgelegt wird, wie die Doppelhelix die lokalen Biegungen selektiert, zusammensetzt und über unterschiedliche Größenkalen synchronisiert: Die individuellen Parameter der Biegungen spielen hingegen eine untergeordnete

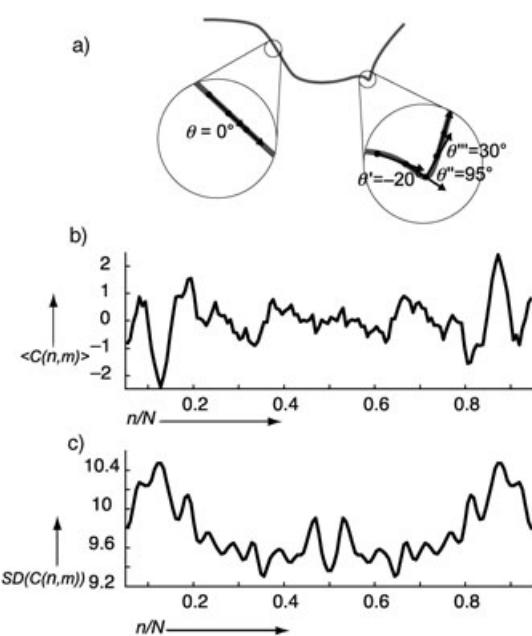


Abbildung 5. a) Methode zur Quantifizierung einer lokalen DNA-Krümmung aus AFM-Bildern. Die Achse des DNA-Strangs wird segmentweise digitalisiert und die lokale Orientierung des Strangs numerisch bestimmt. b) Auftragung der experimentellen lokalen DNA-Krümmung (aus den AFM-Bildern) entlang eines Strangs von palindromischen Dimeren mit Schwanz-Schwanz-Verknüpfung; die Dimeren wurden unter Verwendung der EcoRV- und PstI-Stellen der Plasmid-DNA pBR322 erzeugt.^[74] Die mittlere lokale Krümmung $\langle C(n,m) \rangle$ (in Grad, n ist die Position der Sequenz, $m = 2$ Helixwindungen ist der Abschnitt, über den gemittelt wird) ist als Funktion der Position der Bruchstücke entlang der Strangkontur, n/N , aufgetragen. Die experimentelle Kurve wurde durch Mittelung der beiden gleichen Hälften symmetrisiert, um die Krümmungsinformation der DNA-Sequenz zu verdoppeln. c) Die experimentelle lokale Flexibilität desselben DNA-Moleküls, aufgetragen als Standardabweichung (SD) der lokalen Strangkrümmung.

Rolle. Somit ist der Strukturcode der DNA nicht einfach durch die Sequenz (die Wörter) festgelegt, sondern etwas subtiler durch die Art, wie die Sequenzen in der Kette angeordnet sind (die Sprache). Dabei bleibt festzuhalten, dass eine gewisse Flexibilität in der Sequenz erlaubt ist, ohne dass gravierende Veränderungen der Molekülgestalt verursacht würden.

3.2. Der Code für die Flexibilität der DNA: von der Dinucleotidstufe bis in die Mikrometerskala

Die Sequenz eines DNA-Moleküls legt nicht nur das Profil mit der niedrigsten Energie fest, sondern bestimmt auch dessen lokale Reaktion auf thermische Fluktuationen. Auf diese Weise steuert die Sequenz die Bildung von Konformeren und Überstrukturen. Wichtig ist, dass eine Konformation auch dann eine biologische Funktion haben kann, wenn sie nur sehr niedrig besetzt ist. Niedrig besetzte Zustände können ohne Weiteres Prozesse auslösen, die durch stabilere Konformere unbeeinflusst bleiben. Das bedeutet, dass wir unsere Betrachtung nicht auf Konformere in

Senken des Energieprofils beschränken dürfen, wenn wir die Funktion eines Oligonukleotids vollständig verstehen wollen. Eine der experimentellen Observablen, die Aufschluss über den zugänglichen Konformationsraum eines Strangs gibt, ist die lokale axiale Flexibilität. Diese beschreibt die Tendenz der langen Doppelhelixachse, sowohl lokal als auch global von einer geraden Trajektorie abzuweichen.

Während man sich über die Determinanten der DNA-Krümmung weitgehend einig ist (siehe Abschnitt 3.1), ist die Flexibilität der DNA noch immer Gegenstand der Diskussion. Die folgenden Überlegungen spiegeln den Standpunkt der jeweiligen Autoren wider und müssen an einigen Stellen sicher modifiziert werden, sobald mehr Ergebnisse vorliegen.

Die axiale Flexibilität des Strangs wird durch die räumliche Anordnung der Sequenz bestimmt, insbesondere durch die Van-der-Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den benachbarten Basenpaaren.^[66, 82–84] Dominieren werden die elektrostatischen Wechselwirkungen durch den starken Dipol im G-C-Basenpaar (vergleichen mit der diffusen Ladungsverteilung im A-T-Basenpaar).^[84, 85] Benachbarte A-T-Basenpaare können daher ohne gegenseitige Verschiebung gestapelt werden, wohingegen die repulsiven Dipole benachbarter G-C-Basenpaare eine leichte Versetzung und infolgedessen einen höheren positiven Rollwinkel verursachen.

Ein anderer Faktor, der die axiale Flexibilität beeinflusst, ist die Kompressibilität der großen wie auch der kleinen Furche. Diese führt dazu, dass in den Furchen exocyclische Gruppen vorliegen.^[86] De Santis und Mitarbeiter haben gezeigt, dass unter Annahme einer Elastizität erster Ordnung die axiale Flexibilität mit der Schmelztemperatur eines DNA-Abschnitts thermodynamisch korreliert. Zu diesem Zweck wurde jeder Dinucleotidstufe eine formale Schmelztemperatur zugeordnet und über die Sequenz gemittelt. Eine so erhaltene Dinucleotid-basierte Flexibilitätsskala erklärt zufriedenstellend die Verteilung von statischen und dynamischen Krümmungen in DNA-Bildern und ebenso die sequenzabhängige thermodynamische Stabilität von Nucleosomen.^[64, 74, 87, 88]

Die axiale Flexibilität eines nanometerlangen Strangs kann mit der Persistenzlänge P beschrieben werden, einem Parameter, der gewöhnlich als Maß für die Biegesteifigkeit von Polymeren verwendet wird. P ist definiert als die Länge, über die die Orientierung der Polymerachse bei thermischer Anregung beibehalten wird. Mit einer Reihe von Techniken (Lichtstreuung,^[89] Rotationsdiffusion,^[90] DNA-Zyklisierungskinetik,^[91] Kryo-^[60] und konventionelle Elektronenmikroskopie^[92, 44] sowie Kraftfeldmikroskopie^[93]) wurde eine Persistenzlänge von etwa 50 nm für B-Form-DNA mit gemischter Sequenz abgeschätzt. Der gemessene Wert der Persistenzlänge, wie er durch die meisten Techniken bestimmt wird, hängt nicht nur von der intrinsischen Flexibilität des DNA-Moleküls ab, sondern, wegen der lokalen intrinsischen Krümmung, auch von der Anisotropie der axialen Flexibilität.^[60, 94]

Auf der Längenskala der Dinucleotidstufen wurde die axiale Flexibilität (die Biegbarkeit) anhand des Konformationsraums der spezifischen Basenstufen in der Kristallstruktur von DNA-Oligomeren und DNA-Protein-Komplexen ermittelt.^[82, 95, 96] Bei DNA-Oligomeren röhren die Deformationen, die zur lokalen Verbiegung der DNA führen (und die

Bestimmung der Biegbarkeit ermöglichen), von der Gitterstruktur des DNA-Oligomerkristalls her. In DNA-Protein-Komplexen wurde die lokale Biegbarkeit der Kette anhand der Fähigkeit des Proteins, die DNA zu biegen, nachgewiesen. Die Experimente ergaben, dass die Pyrimidin-Purin-Stufen leichter deformiert werden als die Purin-Pyrimidin- und Purin-Purin-Stufen. Für die Biegbarkeit der Dinucleotidstufen resultierte folgende Reihenfolge: CG > CA(=TG) > TA > CC(=GG) > TC(=GA) > GC > TT(=AA) > GT(=AC) > CT(=AG) > AT. Olson und Mitarbeiter leiteten auch harmonische Energiefunktionen aus den Mittelwerten und der Verteilung der Basenstufenparameter ab.^[97]

Bildgebende Verfahren zur Visualisierung der DNA-Trajektorien ermöglichen die Kartierung zum einen der lokalen intrinsischen Krümmungen entlang der Kette und zum anderen der sequenzabhängigen lokalen Modulationen der Flexibilität. Aus den Krümmungsdaten wurden für eine Gruppe von symmetrischen Molekülen (erzeugt durch Dimerisierung eines Segments der Plasmid-DNA pBR322) Flexibilitätskurven wie in Abbildung 5c erhalten.^[74] Diese Diagramme zeigen, dass im Allgemeinen die lokale Flexibilität an den stärker gebogenen Stellen des Moleküls höher ist. Das bedeutet, dass die Sequenz den Konformationsraum der Kette vorgibt, indem sie auf gleiche Weise die intrinsische Krümmung und die Flexibilität moduliert. In Moleküldynamiksimulationen (auf der Basis von „all atom“-Potentialen) wurde gezeigt, dass Oligonucleotid-Duplexe mit Adeninsequenzen im Wesentlichen gerade und steif sind und dass die stärker gebogenen und verdrehten Stufen (bezüglich der kanonischen B-Form) dynamisch stärker deformierbar sind.^[98]

Es gibt sechzehn mögliche Dinucleotide, davon nur zehn mit einmaliger Symmetrie. Die Abbildung 6 zeigt die fraktionale Häufigkeit der Dinucleotidstufen entlang der Kette des in Abbildung 5 gezeigten Dimers. Für die AA(=TT)-, TA- und AT-Stufen resultiert eine gute Korrelation mit der Flexibilität, wohingegen die CG-, CA(=TG)- und GC-Stufen Antikorrelation zeigen. Dieses Ergebnis widerspricht den oben diskutierten Zuordnungen von Biegsamkeiten der Dinucleotide. Tatsächlich hatten die Kristallstrukturen darauf hingedeutet, dass die CG- und CA(=TG)-Stufen am biegsamsten sind. Ähnlich wie im Fall der Krümmung sind die mit unterschiedlichen Techniken bestimmten Flexibilitäten im Nanometerstab und auf atomarer Ebene also kaum in Einklang zu bringen. Mögliche Ursachen dieser Unstimmigkeit werden im Folgenden diskutiert.

Ein Argument wäre, dass die zur Verfügung stehenden kristallographischen Daten nicht ausreichen. Wie die Autoren der diesbezüglichen Studie selbst betonen, halten die berechneten harmonischen Energiefunktionen neu hinzukommenen Daten womöglich nicht stand.^[97] Die röntgenkristallographisch analysierten Oligonucleotide enthielten außerdem Segmente mit systematisch GC-reichen Enden und AT-reichen Zentrum,^[99] was möglicherweise die statistische Signifikanz der Analyse beeinflusst. Hinzu kommt, dass die Verteilung der Geometrieparameter der Dinucleotide in den Kristallstrukturen des analysierten Oligonucleotidsatzes (etwa hundert) nur wenig mit der Verteilung in DNA-Protein-Komplexen korreliert.^[61] Beiden Analysen zufolge

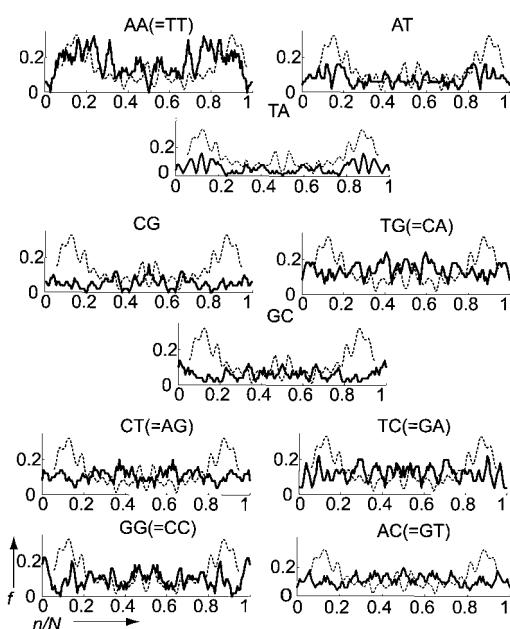


Abbildung 6. Häufigkeit von Dinucleotidstufen entlang der Molekülketten, deren Krümmung und Flexibilität in Abbildung 5 dargestellt ist. Die Häufigkeit ist mit der gleichen räumlichen Auflösung aufgetragen wie die Krümmungsparameter in Abbildung 5. f ist die fraktionale Häufigkeit der Dinucleotidstufen, n/N die fraktionale Position entlang der Strangkontur. Die Kurven sind jeweils mit dem Profil der Strangflexibilität (gestrichelt, unskaliert; aus Abbildung 5c) überlagert und lassen entsprechende Korrelationen erkennen.

sind die CG- und die CA(=TG)-Paare besonders biegsam, was den AFM-Studien im Nanometerbereich klar widerspricht.^[74]

Eine weitere Ursache für die Unstimmigkeiten könnte sein, dass die mikroskopischen Eigenschaften entlang des Strangs herausgemittelt werden. Laut Okonogi et al. ist die CG-Stufe am flexibelsten und die GC-Stufe am unflexibelsten, die AT- und TA-Stufen liegen dazwischen.^[100] Die gemittelte Flexibilität der CG- und GC-Stufen ist geringer als die der AT- und TA-Stufen. Auf dieser Grundlage wurden Sequenzen mit AT- und TA-Stufen als die flexibelsten unter allen Dinucleotiden eingestuft.^[100] An dieser Stelle ist aber zu berücksichtigen, dass sich die Einzelkomponenten einer Helixstruktur keineswegs nur aufzufaddieren und mitteln, sondern mit der Helixwindung synchronisiert sind. Auf diese Weise kann durch geeignete Synchronisation von ansonsten wenig biegsamen Dinucleotidstufen eine hohe lokale Flexibilität entstehen. Auch wird die Krümmung der DNA in erster Linie dadurch festgelegt, wie die Doppelhelix die lokalen Biegungen selektiert, zusammensetzt und über unterschiedliche Längenskalen synchronisiert; das Ausmaß der individuellen Deformationen spielt nur eine untergeordnete Rolle (siehe Abschnitt 3.1).

Ein weiterer Unterschied muss beachtet werden, wenn man die Biegbarkeiten von Dinucleotiden, wie sie durch Röntgenbeugungsanalyse wie in Lit. [82, 95] oder durch spektroskopische Methoden wie in Lit. [100] bestimmt werden, mit den durch AFM bestimmten Flexibilitäten

vergleichen will. In der Kraftfeldmikroskopie werden die Moleküle aus dem 3D-Raum der Lösung in den Quasi-2D-Raum der Substratoberfläche überführt. Durch diese Reduktion von Freiheitsgraden könnten Bewegungen aus der Ebene heraus gedämpft und damit die Flexibilität innerhalb der Ebene erhöht werden. Dies ist eine weitere mögliche Ursache dafür, dass auf unterschiedlichen Längenskalen widersprüchliche Ergebnisse erhalten wurden. Dennoch sind die Untersuchungen an geglätteten DNA-Molekülen aus Sicht der Strukturbioologie sehr wertvoll, da solche Moleküle die strukturellen Einschränkungen imitieren, die in DNA-Protein-Komplexen herrschen. Praktischerweise wird also der intrinsische Nachteil dieses Verfahrens dazu genutzt, Aufschluss über die Topologie solcher Komplexe zu gewinnen.

Informationen über die Strukturcodes von DNA für den Nanometerbereich können auch aus Komplexen der DNA mit Strukturproteinen wie den Histonen abgeleitet werden (siehe Abschnitt 3.3). Insbesondere wurde analysiert, wie die konformativ starren und flexiblen Sequenzen kombiniert sind, um die Position der Proteine an der umhüllenden DNA-Kette festzulegen. Nach Travers bestätigen diese Analysen, dass AT und TA als relativ flexible Stufen einzuordnen sind.^[86] Die Aussage, dass TA wohl die flexibelste Stufe ist, wird durch die sehr geringe Stapelungsenergie der Stufe und durch die Ergebnisse von Zhang und Crothers^[71] sowie McConnell und Beveridge^[98] untermauert. Diese Folgerung passt sehr gut zu den Ergebnissen der AFM-Experimente.

Für die AA-Stufe scheint eine Energiebarriere zu existieren, die größere Verzerrungen verhindert. Andererseits fanden Richmond und Davey^[101] kürzlich bei strukturellen Untersuchungen des Nucleosomenkerns, dass gerade an den Verbindungsstellen zwischen der AA-Stufe und den flankierenden Sequenzen besonders starke Verzerrungen auftreten. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Eigenschaften dieser Stufe sehr stark vom unmittelbaren Sequenzkontext beeinflusst werden (A. A. Travers, persönliche Mitteilung). Die hohe Flexibilität, die dem AA-Paar anhand von AFM-Experimenten zugewiesen wurde, resultiert möglicherweise auf einer Mittelung mit den mechanischen Eigenschaften der flankierenden Positionen.

Als Resümee bleibt, dass uns die subtile Verflechtung der auf unterschiedlichen Längenskalen wirkenden Erkennungsmechanismen der DNA vieles über die strukturellen Grundlagen großenabhängiger molekularer Phänomene verrät.

3.3. Indirektes Auslesen bei der DNA-Protein-Erkennung

DNA-bindende Proteine können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe umfasst Proteine wie die Histone und histonähnliche Proteine, die die Chromosomenstruktur aufrechterhalten und je nach erforderlicher Funktion modifizieren. Solche Proteine sind von DNA-Strängen umschlungen. Die Protein-DNA-Wechselwirkungen sind hoch spezifisch und hängen von der sequenzabhängigen Krümmung und Flexibilität der beteiligten DNA-Abschnitte ab. Die in kompetitiven Rekonstitutionsexperimenten ermittelten freien Standardenthalpien von Nucleosomen konnten durch ein statistisch-thermodynamisches Krümmungs- und

Flexibilitätsmodell zufriedenstellend reproduziert werden.^[64, 87, 88]

In die zweite Gruppe fallen Proteine, die durch Wechselwirkung mit DNA-Steuerungselementen an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Diese Proteine gelangen an ihre Bindungsstelle, indem sie zunächst an eine nichtspezifische Stelle der DNA binden und dann durch eindimensionale Diffusion oder durch Transfer zwischen Segmenten (oder beides) an ihren spezifischen Bindungsort wandern.^[102] Sie erkennen ihre spezifische Bindungsstelle, indem sie die spezifischen Wechselwirkungen durch einen als „direktes Auslesen“ (direct read-out) bezeichneten Erkennungsmechanismus abtasten.^[103, 104] Es handelt sich also um einen Erkennungsprozess auf atomarer Ebene.

Der hoch detaillierte Abtastvorgang kann an jeder Position entlang des DNA-Strangs stattfinden oder, wirksamer noch, nur an bestimmten Positionen wie solchen, an denen sich die DNA leichter biegen lässt. Das heißt, dass das Protein während seiner eindimensionalen Diffusion die DNA ständig zu bestimmten lokalen Konformationen verbiegt und dadurch austestet, auf welche Weise die DNA Konformationswechsel ausführen kann. Dieser als „indirektes Auslesen“ (indirect read-out) bezeichnete Mechanismus entspricht einem Abtasten von Konformations- und mechanischen Eigenschaften auf der Nanoskala.^[105]

Bustamante et al. postulierten, dass die eindimensionale Diffusion des Cro-Proteins entlang der DNA sich in einer Propagation von Biegewellen äußert, auf deren Scheitelpunkt das Protein reitet.^[106] Die Leichtigkeit, mit der die DNA gebogen wird, könnte dem Protein die Ankunft an der spezifischen Position signalisieren. Je weniger Energie für die Biegung aufzuwenden ist, desto stabiler ist der zunächst intermediaire Protein-DNA-Komplex an dieser Stelle und desto mehr Zeit steht dem Protein zur Verfügung, um die Stelle nach sequenzspezifischen Wechselwirkungen abzutasten. Die Rolle der DNA-Biegung bei der transkriptionalen Regulation wurde in einer Übersicht diskutiert.^[103] Die Zahl an neu entdeckten DNA-biegenden Proteinen steigt ständig an, und die Hinweise verdichten sich, dass alle Proteine, die die DNA abtasten, diese auch biegen können. Beim indirekten Auslesen wird auf einen flexibleren Code zugegriffen als beim sequenzspezifischen direkten Auslesen, denn eine bestimmte Sequenz kann durch eine nicht verwandte Sequenz ersetzt werden, solange diese genauso gekrümmmt und flexibel ist.^[107]

Der indirekte Ausleseprozess ist der für die Erkennung von Strukturproteinen dominante Mechanismus. Dieser Mechanismus ist auch die erste Komponente beim Erkennungsprozess zwischen Proteinen der zweiten Gruppe und ihren spezifischen Bindestellen. Ein Beispiel für eine indirekte Erkennung, die ohne direkte Wechselwirkungen stattfindet (d.h. außerhalb der Van-der-Waals-Radien liegt), ist die Erkennung zwischen dem FIS-Aktivatorprotein und seinen Bindungsstellen.^[108]

3.4. Bildung von Schleifen: festgelegt durch den DNA-Code

Wie Griffith et al. am Beispiel der stark gekrümmten DNA aus *Crithidia fasciculata* gezeigt haben,^[67] kann die

Flexibilität der DNA zur Bildung von Schleifen führen. Schleifen sind Überstrukturen, die die Genexpression steuern können. In einem DNA-Strang vermitteln Schleifen die Wechselwirkungen zwischen Komponenten, die in der Primärstruktur weit voneinander entfernt sind.^[109] Die Bildung von Schleifen (die durch AFM direkt beobachtet werden kann^[110]) hängt von der richtigen Synchronisierung der Basenpaardeformierbarkeit mit der Doppelhelixwindung ab. Matsumoto und Olson^[97] simulierten einen in natürlicher Form geraden Strang mit intrinsisch flexiblen und steifen Dimerstufen im Abstand halber Windungen (5 bp). Die Rechnungen ergaben, dass der Strang in eine bevorzugte Richtung biegt und Schleifen bildet.

3.5. Kristalloberflächen können den Strukturcode der DNA lesen

Makromoleküle können vielfältige Wachstums- und Ordnungsprozesse steuern, darunter die Bildung von anorganischen Kristallkeimen, Aggregaten und Mustern sowie die Stabilisierung von Phasen.^[111] Entsprechend intensiv wird derzeit nach kompatiblen Kombinationen von biologisch-anorganischen Materialien geforscht. Insbesondere wird untersucht, wie die ordnenden Eigenschaften biologischer Moleküle auf anorganische Systeme transferiert werden können. In die engere Wahl kommen z.B. Peptide, die selektiv an Metall- und Metalloidoberflächen binden oder das Wachstum einer anorganischen Halbleiteroberfläche steuern können.^[112]

Die Frage drängt sich auf, ob neben Peptiden und Proteinen auch eine DNA-Kette an der biologisch-anorganischen Schnittstelle erkannt wird. Ein gerader DNA-Einzelstrang kann auf einer Oberfläche um seine Achse rotieren, sodass viele Orientierungen gleich wahrscheinlich sind und sich die chemischen Merkmale zu einer zylindrischen Symmetrie mitteln. Bei einem intrinsisch gekrümmten Segment hingegen ist die Rotation in gewissem Umfang eingeschränkt.

Die intrinsische DNA-Krümmung legt für das gekrümmte Segment eine Mittelebene fest. Die beiden Flächen des Strangs (die beiden Seiten der Ebene) verhalten sich chemisch unterschiedlich, und zwar wegen der unterschiedlichen räumlichen Verteilung der Dinucleotide, die die Krümmung verursachen. Tatsächlich erkennt man im hochauflösten Molekülmodell (Konformation mit der niedrigsten Energie) des gekrümmten *Crithidia-fasciculata*-Fragments, dass die fast ebene Struktur eine A-reiche und eine T-reiche Seite hat, weil die sich wiederholende A-Region mit der Helixwindung synchronisiert ist (siehe Abbildung 4b). Prinzipiell kann diese Struktur im Mittel mit jeder der beiden Flächen auf Glimmer adsorbieren. Ein Beobachter kann jedoch durch direkte Betrachtung (mit EM oder AFM) nicht unterscheiden, welches die bevorzugte Adsorptionsseite ist – so es eine gibt –, da er nicht die Anordnung der Sequenz lesen kann.

Abbildung 7a erläutert schematisch die Strategie, die zur Identifizierung einer bevorzugten Adsorptionsseite angewandt wird: Die beiden Flächen eines dünnen quadratischen Objektes (etwa eines Quadrates aus Papier), eine schwarze und eine weiße, können nur anhand ihrer unterschiedlichen Farben erkannt werden, denn die Form ist jeweils identisch.

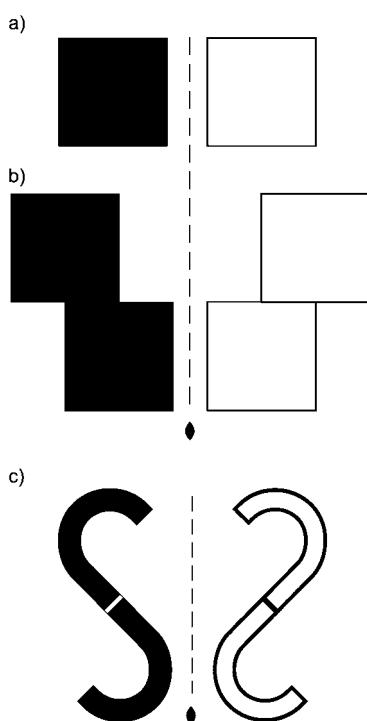


Abbildung 7. a) Die beiden verschiedenfarbigen Flächen eines dünnen quadratischen Objekts sind morphologisch nicht unterscheidbar. b) Verschiedenfarbige Flächen eines chiralen Objekts, das durch Verschmelzung von zwei Kopien des Objekts in (a) erzeugt wurde. Welche Fläche die zugewandte ist, kann anhand der Objektform angegeben werden, auch wenn die Farben nicht unterscheidbar sind. c) Ein palindromisches DNA-Dimer aus einem gekrümmten DNA-Segment, das in S-Form flach auf einer Oberfläche liegt, zeigt analoge Eigenschaften wie das Modell in (b). Die Flächen können ohne Ablesen der Basensequenz erkannt werden.

Ähnlich zu den Farben kann die Anordnung der Sequenz in den EM- oder AFM-Bildern nicht ausgemacht werden. Konstruiert man aber ein neues Objekt durch Verknüpfung zweier Quadrate zu einer chiralen Figur (wie in Abbildung 7b), werden die beiden prochiralen Flächen auch morphologisch unterscheidbar. Entsprechend wurden die beiden gekrümmten Segmente aus *Crithidia* entweder in Schwanz-Schwanz-Orientierung (PvuII-EcoRI-PvuII, durchgezogene Kurve in Abbildung 8) oder in Kopf-Kopf-Orientierung (NheI-SalI-NheI, gestrichelte Kurve in Abbildung 8) verknüpft und auf diese Weise zwei palindromische Dimeren konstruiert. Diese verhalten sich wie das in Abbildung 7b dargestellte prochirale Objekt. Ein solches gekrümmtes palindromisches Molekül, das zweidimensional eine S-Form annimmt (mit der internen Dyadenachse senkrecht zur Oberfläche), exponiert mit den beiden prochiralen Seiten entweder A-reiche oder T-reiche Sequenzen, da die A- und T-Basen an die beiden Seiten des gekrümmten Monomersegments segregiert sind (Abbildung 7c). Welche der beiden Flächen eine auf Glimmerplättchen aufgetragene Molekülpopulation der Kristalloberfläche zuwendet, kann also mit AFM nur dann identifiziert werden, wenn man palindromische Dimeren des Segments betrachtet, nicht das Segment

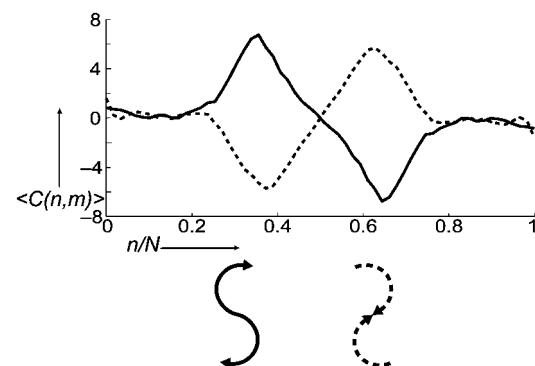


Abbildung 8. Experimentelle lokale DNA-Krümmung (aus AFM-Bildern) entlang eines Strangs von palindromischen Schwanz-Schwanzverknüpften (PvuII-EcoRI-PvuII, durchgezogene Kurve) und Kopf-Kopfverknüpften Dimeren (NheI-SalI-NheI, gestrichelte Kurve) des *Crithidia fasciculata*-Segments. Die mittlere lokale Krümmung (in Grad; gemittelt über ungefähr zwei Helixwindungen wie in Abbildung 5b) ist als Funktion der fraktionalen Position entlang der Strangkontur (n/N) dargestellt. Gemäß den Vorzeichen der lokalen Krümmung sind die mittleren Morphologien des jeweils bevorzugt gebildeten Schwanz-Schwanz- (S-Typ, durchgezogen) und Kopf-Kopf-Dimers (S*-Typ, gestrichelt) skizziert.

selbst. Bei der Analyse zweier großer Sätze palindromischer Dimeren des *Crithidia fasciculata*-Fragments (Abbildung 8) wurde gefunden, dass beide Dimeren dem Glimmer bevorzugt die T-reiche Seite exponieren. Eine statistische Analyse ergab, dass die eine der beiden Flächen fünf- bis neunmal häufiger der Glimmeroberfläche zugewandt ist als die andere.^[113]

Unserer Auffassung nach muss dieser Effekt als Erkennung einer DNA-Überstruktur auf der Basis des *indirekten* Ablesemechanismus interpretiert werden. Die Stärke der Erkennung wird nicht direkt durch die Sequenz, sondern durch das Ausmaß der Krümmung festgelegt. Auch bei Dimeren des pBR322-Restriktionsfragments, dessen Sequenzen geringer mit der Helixwindung synchronisiert sind als bei *Crithidia* und daher nur schwache Krümmungen aufweisen, wurde eine spezifische Erkennung von Oberflächen nachgewiesen, allerdings deutlich schwächer ausgeprägt (B. Samorì, P. De Santis et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Eine Kristalloberfläche, wie die von Glimmer, erkennt nicht die Basensequenz, sondern die Periodizität der Adeninsegmente. Wenn die Adeninsegmente nicht genau mit der Helixwindung synchronisiert sind, kann sich keine signifikante Krümmung bilden, und die komplementären Basen segregieren nicht zu ausgeprägten Flächen. Demnach erwarten wir, dass der Erkennungseffekt für gekrümmte dsDNA-Moleküle allgemeingültig ist. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die strukturellen Grundlagen des Erkennungsprozesses zu ermitteln und mithin den zugrundeliegenden Code zu entziffern.

Wir können die Hypothese aufstellen, dass ein solcher Erkennungsprozess in vorzellulären Stadien der Evolution von Bedeutung war. Anorganische Oberflächen haben als Katalysatoren bei präbiotischen Synthesen^[114] und als Template für die Selbstorganisation der immer komplexer werden Biostrukturen fungiert.^[115]

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die DNA-Sequenz birgt den Code für die im Nanometerbereich auftretenden Eigenschaften, Überstrukturen und Erkennungsmechanismen der DNA. Vom nanowissenschaftlichen Standpunkt gesehen erkennen wir, wie sich die DNA-Doppelhelix über Längenskalen hinweg unterschiedliche Merkmale aneignet. Die DNA verhält sich dabei wie eine Antenne, die gegenphasige „Störungen“ eliminiert und nur solche mit richtiger Phase zulässt.

Eine nanowissenschaftliche Betrachtung der Biologie führt uns unmittelbar zu den Methoden, auf die die Natur beim „Engineering“ komplexer Systeme zurückgreift. Oder, wie es Horst Störmer ausdrückte, „nanoscale science is raising the lid on the biggest LEGO of the universe.“

Die Biologie beginnt, nanowissenschaftliche Ansätze zu nutzen, und umgekehrt lassen sich auch die Nanowissenschaften zunehmend von der Biologie und insbesondere den Eigenschaften der DNA inspirieren. Durch ihren außergewöhnlich hohen Informationsgehalt ist die DNA prädestiniert dafür, hohe Komplexitätsgrade in Selbstorganisationsprozessen zu vermitteln, auch bei nichtbiologischen Materialien.

Die DNA ist an Erkennungsprozessen beteiligt, deren Selektivität und Ausmaß über Längenskalen hinweg moduliert werden, so wie beim direkten und indirekten Ablesemechanismus bei der Bildung von Protein-DNA-Komplexen. Das direkte Ablesen auf der Basis des Basenpaarcode ist in der Nanotechnologie bereits als Methodik etabliert. Die komplexeren Codes dienen gegenwärtig der bloßen Inspiration, vielleicht wird es aber bald möglich sein, diese Codes auf ähnliche Weise wie den Basenpaarcode einzusetzen. Vorstellbar wäre eine Methodensammlung von DNA-Erkennungsprozessen, mit der sich die Selbstorganisation auf unterschiedlichen Längen- und Energieskalen schalten lässt. Die Entdeckung, dass DNA-Überstrukturen von einer Kristalloberfläche erkannt werden, ist ein erster Schritt. Komplexe selbstorganisierende Nanostrukturen auf DNA-Basis^[10] könnten gezielt so angefertigt werden, dass sie von einer Kristalloberfläche erkannt werden. Auf diese Weise würden zwei Informationshierarchien zugleich genutzt. Ein weiterer Schritt hin zu höherer Komplexität wäre der Einsatz von DNA-bindenden Proteinen. Durch Aggregation von stark gekrümmten und geraden DNA-Segmenten, die über Konsensussequenzen mit ihren Proteinen verknüpft sind, könnten so gezielt DNA-Nanostrukturen auf kationischen Kristalloberflächen erzeugt werden.

Addendum

Seit Einreichung des Manuskripts sind mehrere wichtige Veröffentlichungen zum Thema erschienen. Sherman und Seeman beschrieben einen DNA-Walker, bestehend aus einer „zweibeinigen“ DNA, die kontrolliert über eine DNA-Ebene schreitet.^[116] Gesteuert wird der Walker durch Oligonucleotide, die die Füße des Zweibeiners an spezifische Stellen der DNA-Ebene binden.

Mao et al. entwickelten einen vollautonomen DNA-Motor, der mithilfe eines integrierten DNA-Enzyms eine

zyklische Bewegung ausführt.^[117] Der Nanomotor zykliert ungestört zwischen einem offenen und geschlossenen Zustand, solange die Lösung das Substrat des Enzyms bereitstellt, und kann durch eine molekulare Bremse gestoppt werden. Es handelt sich um eine echte Umwandlung von chemischer Energie in nanoskalige Bewegung in einer vollsynthetischen Funktionseinheit.

Die Nanotechnologie von Oberflächen wird zunehmend zum Gegenstand der Computerchemie. Su und Smith beschrieben einen oberflächenbasierten DNA-Computer.^[118] Reif und Mitarbeiter berichteten über die Anwendung von DNA-Codes in der Cryptographie.^[119]

Die Bauprinzipien, die hinter der Anordnung von DNA-Molekülen stecken, treten mit wachsender Zahl an experimentellen Beispielen (etwa der DNA-Tetraeder von Goodman et al.^[120] oder die starren Dreiecksmodule von Mao et al.^[121]) immer klarer hervor. Winfree und Mitarbeiter versuchten, thermodynamische Bedingungen zu definieren, die für die Aggregation von Nucleinsäuresequenzen maßgebend sind.^[122]

Ebenfalls Mao und Mitarbeiter beschrieben kürzlich ein lithographisches Verfahren mithilfe von DNA-Arrays, das auf der Befüllung von Vertiefung auf der Array-Oberfläche durch Hochvakuumverdampfung von Metall beruht. Durch Abheben des Metallfilms von der Oberfläche erhält man eine nanoskalig gemusterte Metallstruktur, bei der es sich um ein Negativ des DNA-Musters handelt.^[123]

Am 28. Juli 2004 verstarb Sir Francis Harry Compton Crick.

Die experimentellen Arbeiten wurden durch folgende Institutionen und Programme unterstützt: Ministero dell’Istruzione Università Ricerca, Programmi Biotecnologie Legge 95/95 (5 %), Progetti di Interesse Nazionale 2001–2003, Progetti Pluriennali Università di Bologna, FISR D.M. 16/10/20 Anno 1999, ESF Eurocore „SONS“ Programme for 2003–2006. Wir danken Pasquale De Santis (Rom) für hilfreiche Diskussionen und Anmerkungen zum Manuskript. Andrew Travers (Cambridge) danken wir für unveröffentlichtes Material und hilfreiche Vorschläge, speziell zu den vergleichenden Analysen der Flexibilität der TA- und AA-Stufen (Abschnitt 3.2). Wir danken Dr. Andrea Giro für die Unterstützung bei der Anfertigung des Vortitelbildes.

Eingegangen am 28. Januar 2004,
veränderte Fassung am 12. April 2004
Online veröffentlicht am 5. November 2004

Übersetzt von Dr. Roswitha Harrer, Frankfurt

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [2] E. N. Trifonov, *Bull. Math. Biol.* **1989**, *51*, 417–432.
- [3] D. R. F. Leach in *DNA Recombination and Repair* (Hrsg.: P. J. Smith, C. J. Jones), Oxford University Press, Oxford, **1999**, S. 1–15.
- [4] B. K. Singleton, P. A. Jeggo in *DNA Recombination and Repair* (Hrsg.: P. J. Smith, C. J. Jones), Oxford University Press, Oxford, **1999**, S. 16–37.

[5] a) L. M. Adleman, *Science* **1994**, *266*, 1021–1024; b) C. Mao, T. H. LaBean, J. H. Relf, N. C. Seeman, *Nature* **2000**, *407*, 493–496.

[6] a) Y. Benenson, R. Adar, T. Paz-Elizur, Z. Livneh, E. Shapiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 2191–2196; b) Y. Benenson, T. Paz-Elizur, R. Adar, E. Keinan, Z. Livneh, E. Shapiro, *Nature* **2001**, *414*, 430–434.

[7] V. V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 62–71.

[8] V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco, *Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions*, University Science Books, Sausalito, **2000**.

[9] P. Sa-Ardyen, A. V. Vologodskii, N. C. Seeman, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3829–3837.

[10] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427–431.

[11] N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 225–248.

[12] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, *397*, 144–146.

[13] H. Yan, X. Zhang, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **2002**, *415*, 62–65.

[14] a) E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, N. C. Seeman, *Nature* **1998**, *394*; b) H. Yan, T. H. LaBean, L. Feng, J. H. Reif, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8103–8108; c) H. Li, S. H. Park, J. H. Reif, T. H. LaBean, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 418–419; d) R. M. Dirks, M. Lin, E. Winfree, N. A. Pierce, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1392–1403.

[15] L. Feng, S. H. Park, J. H. Reif, H. Yan, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4478–4482; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4342–4346.

[16] C. Mao, W. Sun, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5437–5544.

[17] W. M. Shih, J. D. Quispe, G. F. Joyce, *Nature* **2004**, *427*, 618–621.

[18] W. P. Stemmer, A. Crameri, K. D. Ha, T. M. Brennan, H. L. Heyneker, *Gene* **1995**, *164*, 49–53.

[19] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. J. Mills, F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature* **2000**, *406*, 605–608.

[20] a) P. Alberti, J. L. Mergny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1569–1573; b) D. Liu, S. Balasubramanian, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5912–5914; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5734–5736; c) C. M. Niemeyer, M. Adler, S. Lenhert, S. Gao, H. Fuchs, L. F. Chi, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 260–264; d) C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3933–3937; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3779–3783; e) J. W. J. Li, W. H. Tan, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 315–318.

[21] B. H. Robinson, N. C. Seeman, *Protein Eng.* **1987**, *1*, 295–300.

[22] E. Di Mauro, C. P. Hollenberg, *Adv. Mater.* **1993**, *5*, 384–386.

[23] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607–609.

[24] a) M. Hegner, P. Wagner, G. Semenza, *FEBS Lett.* **1993**, *336*, 452–456; b) S.-J. Park, A. A. Lazarides, C. A. Mirkin, P. W. Brazis, C. R. Kannewurf, R. L. Letsinger, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4003–4006; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3845–3848; c) C. Bamdad, *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1997–2003.

[25] a) A. Csáki, R. Möller, W. Straube, J. M. Köhler, W. Fritzsche, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, E81; b) R. Möller, A. Csáki, J. M. Köhler, W. Fritzsche, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, E91.

[26] a) C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, P. Hazarika, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5944–5948; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5766–5770; b) C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, M. Noyong, U. Simon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *311*, 995–999.

[27] L. M. Demers, D. S. Ginger, S. J. Park, Z. Li, S. W. Chung, C. A. Mirkin, *Science* **2002**, *296*, 1836–1838.

[28] S. J. Park, T. A. Taton, C. A. Mirkin, *Science* **2002**, *295*, 1503–1506.

[29] C. M. Niemeyer, W. Bürger, J. Peplies, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2391–2395; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2265–2268.

[30] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3798–3801; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3685–3688.

[31] J. M. Tomkins, B. K. Nabbs, K. Barnes, M. Legido, A. J. Blacker, R. A. McKendry, C. Abell, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 375–378.

[32] L. H. Eckardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Rein, M. Schweitzer, N. Windhad, G. von Kiedrowski, *Nature* **2002**, *420*, 286.

[33] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, *Science* **2002**, *297*, 72–75.

[34] K. A. Williams, P. T. Veenhuizen, B. G. de la Torre, R. Eritja, C. Dekker, *Nature* **2002**, *420*, 761.

[35] a) K. J. Watson, S. J. Park, J. H. Im, S. T. Nguyen, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5592–5593; b) L. Zhu, P. S. Lukeman, J. W. Canary, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10178–10179.

[36] L. Jaeger, N. B. Leontis, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2576–2580; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2521–2524.

[37] L. Jaeger, E. Westhof, N. B. Leontis, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 455–463.

[38] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494–498.

[39] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchart, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 3–7.

[40] V. V. Demidov, N. E. Broude, I. V. Lavrentieva-Smolina, H. Kuhn, M. D. Frank-Kamenetskii, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 133–139.

[41] P. E. Nielsen, *Mol. Biotechnol.* **2004**, *26*, 233–248.

[42] H. Kuhn, V. V. Demidov, J. M. Coull, M. J. Fiandaca, B. D. Gildea, M. D. Frank-Kamenetskii, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1097–1103.

[43] H. Kuhn, V. V. Demidov, B. D. Gildea, M. J. Fiandaca, J. C. Coull, M. D. Frank-Kamenetskii, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2001**, *11*, 265–270.

[44] S. Sforza, G. Haaima, R. Marchelli, P. E. Nielsen, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 197–204.

[45] M. Petersen, J. Wengel, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 74–81.

[46] U. Christensen, N. Jacobsen, V. K. Rajwanshi, J. Wengel, T. Koch, *Biochem. J.* **2001**, *354*, 481–484.

[47] D. Latorra, D. Hopkins, K. Campbell, J. M. Hurley, *Biotechniques* **2003**, *34*, 1150–1158.

[48] a) K. Schöning, P. Scholz, S. Guntha, X. Wu, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Science* **2000**, *290*, 1347–1351; b) A. Eschenmoser, *Science* **1999**, *284*, 2118–2124.

[49] J. C. Chaput, J. K. Ichida, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 856–857.

[50] a) H. Liu, J. Gao, S. R. Lynch, Y. D. Saito, L. Maynard, E. T. Kool, *Science* **2003**, *302*, 868–871; b) A. Marx, D. Summerer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1653–1654; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1625–1626.

[51] E. M. Southern, *Methods Mol. Biol.* **2001**, *170*, 1–15.

[52] M. J. Heller, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2002**, *4*, 129–153.

[53] a) E. Palecek, *Talanta* **2002**, *45*, 809–819; b) E. Palecek, F. Jelen, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2002**, *32*, 261–270; c) K. Kerman, M. Kobayashi, E. Tamiya, *Meas. Sci. Technol.* **2004**, *15*, R1–R11.

[54] T. A. Taton, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Science* **2000**, *289*, 1757–1760.

[55] C. Guiducci, C. Stagni, G. Zuccheri, A. Bogliolo, L. Benini, B. Samorì, B. Riccò, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 781–787.

[56] R. Hözel, N. Gajovic Eichelmann, F. F. Bier, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 555–564.

[57] M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, *41*, 1326–1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1276–1289.

[58] H. Pearson, *Nature* **2003**, *421*, 310–312.

[59] a) J. A. Schellman, S. C. Harvey, *Biophys. Chem.* **1995**, *55*, 95–114; b) C. R. Calladine, H. R. Drew, *J. Mol. Biol.* **1996**, *257*, 479–485.

[60] J. Bednar, P. Furrer, V. Katritch, A. Z. Stasiak, J. Dubochet, A. Stasiak, *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 579–594.

[61] D. M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 15163–15165.

[62] a) P. De Santis, A. Palleschi, M. Savino, A. Scipioni, *Biophys. Chem.* **1988**, *32*, 305–317; b) P. De Santis, A. Palleschi, S. Morosetti, M. Savino in *Structure and Dynamics of Nucleic Acids, Proteins and Membranes* (Hrsg.: E. Clementi, S. Chin), Plenum, New York, **1986**, S. 31–49.

[63] P. De Santis, A. Palleschi, M. Savino, A. Scipioni, *Biochemistry* **1990**, *29*, 9269–9273.

[64] a) D. Boffelli, P. De Santis, A. Palleschi, G. Risuleo, M. Savino, *FEBS Lett.* **1992**, *300*, 175–178; b) P. De Santis, A. Palleschi, M. Savino, A. Scipioni, *Biophys. Chem.* **1992**, *42*, 147–152.

[65] S. Arnott, D. W. Hukins, *J. Mol. Biol.* **1973**, *81*, 93–105.

[66] M. A. El Hassan, C. R. Calladine, *Philos. Trans. R. Soc. London* **1997**, *355*, 43–100.

[67] J. Griffith, M. Bleyman, C. A. Rauch, P. A. Kitchin, P. T. Englund, *Cell* **1986**, *46*, 717–724.

[68] R. E. Dickerson, D. Goodsell, M. L. Kopka, *J. Mol. Biol.* **1996**, *256*, 108–125.

[69] P. R. Hardwidge, R. B. Den, E. D. Ross, L. J. Maher, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2000**, *18*, 219–230.

[70] J. D. Kahn, E. Yun, D. M. Crothers, *Nature* **1994**, *368*, 163–166.

[71] Y. Zhang, D. M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3161–3166.

[72] a) Y. Zhang, D. M. Crothers, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 136–153; b) P. De Santis, M. Fuà, M. Savino, C. Anselmi, G. Bocchinfuso, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 9968–9976.

[73] a) J. A. Cognet, C. Pakleza, D. Cherny, E. Delain, E. Le Cam, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 997–1009; b) G. Muzard, B. Theveny, B. Revet, *EMBO J.* **1990**, *9*, 1289–1298.

[74] G. Zuccheri, A. Scipioni, V. Cavaliere, G. Gargiulo, P. De Santis, B. Samorì, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3074–3079.

[75] C. Rivetti, C. Walker, C. Bustamante, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 41–59.

[76] W. K. Olson, V. B. Zhurkin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 286–297.

[77] E. Le Cam, F. Fack, J. Menissier-de Murcia, J. A. Cognet, A. Barbin, V. Sarantoglou, B. Revet, E. Delain, G. de Murcia, *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 1062–1071.

[78] T. Akiyama, M. E. Hogan, *Biochemistry* **1997**, *36*, 2307–2315.

[79] T. E. Haran, J. D. Kahn, D. M. Crothers, *J. Mol. Biol.* **1994**, *244*, 135–143.

[80] a) A. Barbic, D. P. Zimmer, D. M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 2369–2373; b) D. Strahs, T. Schlick, *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 643–663.

[81] A. Bolshoy, P. McNamara, R. E. Harrington, E. N. Trifonov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2312–2316.

[82] A. A. Gorin, V. B. Zhurkin, W. K. Olson, *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 34–48.

[83] a) C. R. Calladine, *J. Mol. Biol.* **1982**, *161*, 343–352; b) K. Yanagi, G. G. Prive, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* **1991**, *217*, 201–214; c) M. A. Young, G. Ravishankar, D. L. Beveridge, H. M. Berman, *Biophys. J.* **1995**, *68*, 2454–2468.

[84] C. A. Hunter, *J. Mol. Biol.* **1993**, *230*, 1025–1054.

[85] a) C. A. Hunter, *Bioessays* **1996**, *18*, 157–162; b) J. Gallego, A. R. Pascual-Teresa, M. T. Pisabarro, F. Gago in *QSAR and Molecular Modeling. Concepts, Computational Tools and Applications* (Hrsg.: F. Sanz, J. Giraldo, F. J. R. Manaut), Prous Science, Barcelona, **1995**, S. 274–281.

[86] A. A. Travers, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2004**, *362*, 1423–1438.

[87] C. Anselmi, G. Bocchinfuso, P. De Santis, M. Savino, A. Scipioni, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 1293–1301.

[88] C. Anselmi, P. De Santis, R. Paparcone, M. Savino, A. Scipioni, *Biophys. Chem.* **2002**, *95*, 23–47.

[89] E. S. Sobel, J. A. Harpst, *Biopolymers* **1991**, *31*, 1559–1564.

[90] P. J. Hagerman, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1988**, *17*, 265–286.

[91] a) D. Shore, R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.* **1983**, *170*, 957–981; b) W. H. Taylor, P. J. Hagerman, *J. Mol. Biol.* **1990**, *212*, 363–376.

[92] C. Frontali, E. Dore, A. Ferrauto, E. Gratton, A. Bettini, M. R. Pozzan, E. Valdevit, *Biopolymers* **1979**, *18*, 1353–1373.

[93] T. Berge, N. S. Jenkins, R. B. Hopkirk, M. J. Waring, J. M. Edwardson, R. M. Henderson, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 2980–2986.

[94] A. Scipioni, C. Anselmi, G. Zuccheri, B. Samorì, P. De Santis, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2408–2418.

[95] W. K. Olson, A. A. Gorin, X. J. Lu, L. M. Hock, V. B. Zhurkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11163–11168.

[96] a) R. E. Dickerson, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1906–1926; b) R. E. Dickerson, T. K. Chiu, *Biopolymers* **1997**, *44*, 361–403.

[97] A. Matsumoto, W. K. Olson, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 22–41.

[98] K. J. McConnell, D. L. Beveridge, *J. Mol. Biol.* **2001**, *314*, 23–40.

[99] W. K. Olson, <http://rutchem.rutgers.edu/~olson/Bdna-list.html>, **1998**.

[100] T. M. Okonogi, S. C. Alley, A. W. Reese, P. B. Hopkins, B. H. Robinson, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 3446–3459.

[101] T. J. Richmond, C. A. Davey, *Nature* **2003**, *423*, 145–150.

[102] a) P. H. von Hippel, O. G. Berg, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 675–678; b) R. Fickert, B. Muller-Hill, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 59–68.

[103] J. Perez-Martin, V. de Lorenzo, *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, *51*, 593–628.

[104] A. A. Travers, *DNA-Protein Interactions, 1st Ed.*, Chapman & Hall, London, New York, **1993**.

[105] L. Jen-Jacobson, *Biopolymers* **1997**, *44*, 153–180.

[106] D. A. Erie, G. Yang, H. C. Schultz, C. Bustamante, *Science* **1994**, *266*, 1562–1566.

[107] B. Revet, S. Brahms, G. Brahms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7535–7539.

[108] I. K. Pemberton, G. Muskhelishvili, A. A. Travers, M. Buckle, *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 651–663.

[109] K. Rippe, P. H. von Hippel, J. Langowski, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 500–506.

[110] a) C. Wyman, E. Grotkopp, C. Bustamante, H. C. Nelson, *EMBO J.* **1995**, *14*, 117–123; b) K. Rippe, M. Guthold, P. H. von Hippel, C. Bustamante, *J. Mol. Biol.* **1997**, *270*, 125–138; c) M. Barna, T. Mergoum, J. A. Costoya, D. Ruggero, M. Branford, A. Bergia, B. Samorì, P. P. Pandolfi, *Dev. Cell* **2002**, *3*, 499–510.

[111] a) N. C. Seeman, A. M. Belcher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6451–6455; b) A. M. Belcher, X. H. Wu, R. J. Christensen, P. K. Hansma, G. D. Stucky, D. E. Morse, *Nature* **1996**, *381*, 56–58; c) G. Falini, S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi, *Science* **1996**, *271*, 67–69.

[112] a) S. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 8651–8655; b) S. Brown, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 269–272; c) S. R. Whaley, D. S. English, E. L. Hu, P. F. Barbara, A. M. Belcher, *Nature* **2000**, *405*, 665–668.

[113] B. Sampaolesi, A. Bergia, A. Scipioni, G. Zuccheri, M. Savino, B. Samorì, P. De Santis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13566–13570.

[114] R. Saladino, U. Ciambecchini, C. Crestini, G. Costanzo, R. Negri, E. Di Mauro, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 514–521.

[115] a) N. Lahav, S. Nir, A. C. Elitzur, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2001**, *75*, 75–120; b) P. Szabó, I. Scheuring, T. Czárán, E.

Szathmáry, *Nature* **2002**, *420*, 340–343; c) S. J. Sowerby, N. G. Holm, G. B. Petersen, *Biosystems* **2001**, *61*, 69–78; d) S. J. Sowerby, C. A. Cohn, W. M. Heckl, N. G. Holm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 820–822; e) C. Anselmi, P. De Santis, R. Paparcone, M. Savino, A. Scipioni, *Origins Life Evol. Biosphere* **2004**, *34*, 143–149.

[116] W. B. Sherman, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1203–1207.

[117] a) Y. Chen, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8626–8627; b) Y. Chen, M. Wang, C. Mao, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3638–3641; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3554–3557.

[118] X. Su, L. M. Smith, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3115–3123.

[119] A. Gehani, T. LaBean, J. Reif in *Aspects of Molecular Computing* (Hrsg.: N. Jonoska, G. Paun, G. Rozenberg), Springer, Heidelberg, **2004**, S. 167–188.

[120] R. P. Goodman, R. M. Berry, A. J. Turberfield, *Chem. Commun.* **2004**, 1372–1373.

[121] D. Liu, M. Wang, Z. Deng, R. Walulu, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2324–2325.

[122] R. M. Dirks, M. Lin, E. Winfree, N. A. Pierce, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1392–1403.

[123] Z. Deng, C. Mao, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4160–4162; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4068–4070.

Quality counts...

The best of chemistry every week

Wiley-VCH
P.O. Box 10 11 61
69451 Weinheim
Germany
Phone +49 (0) 6201 – 606-400
Fax +49 (0) 6201 – 606-184
e-mail: angewandte@wiley-vch.de
www.angewandte.org

12180404_gu

Angewandte Chemie International Edition is a journal of the GDCh, the German Chemical Society

GDCh

WILEY-VCH