

Hochdurchsatz-Analyse der Selbstorganisation von DNA-Nanostrukturen in Echtzeit mittels FRET-Spektroskopie**

Barbara Saccà,* Rebecca Meyer, Udo Feldkamp, Hendrik Schroeder und Christof M. Niemeyer*

Seit Seemans wegbereitender Veröffentlichung von 1982^[1] hat die DNA-basierte Nanotechnologie eine rasante Entwicklung erlebt. Die Selbstorganisation synthetischer Oligonucleotide ist heute fast eine Routinemethode zur Herstellung von supramolekularen Gittern mit Strukturmerkmalen im Nanometerbereich.^[2] Trotz dieser Fortschritte ist die Charakterisierung der assemblierten Nanostrukturen immer noch auf wenige physikochemische Methoden beschränkt. Dies sind hauptsächlich Gelelektrophorese, Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM) und inzwischen auch die Kryoelektronenmikroskopie.^[2] Alle diese Methoden sind destruktiv und ermöglichen daher nur Endpunktanalysen der Produkte, sodass die Untersuchung und Optimierung des Assemblierungsprozesses durch Manipulation der zu untersuchenden Probe nicht möglich ist. Zur Lösung dieses Problems beschreiben wir hier eine neue spektroskopische Methode auf der Grundlage des resonanten Förster-Energietransfers (FRET) zur Beobachtung der Selbstorganisation von DNA-Kacheln und DNA-Nanoarrays in Echtzeit und im Hochdurchsatz.^[3] Wie für mehrere DNA-Nanostrukturen mit unterschiedlicher Sequenzwahl demonstriert wird, ermöglicht dieser Ansatz die vollständige thermodynamische Charakterisierung des Assemblierungsprozesses.

Wie schematisch in Abbildung 1 a gezeigt, wählten wir für unsere Untersuchungen neun Oligonucleotide, die sich zu einem kreuzförmigen DNA-Motiv, der 4×4 -Kachel, zusammenfügen, die aus vier vierarmigen DNA-Kreuzungsmotiven aufgebaut ist.^[4] Fünf Kacheln mit den Bezeichnungen A, A², B, B² und B³ wurden mit unterschiedlicher Oligonucleotid-Zusammensetzung entworfen (Abbildung S1 a–e in den Hintergrundinformationen).^[5] Die Kacheln A² und B³ wurden so entworfen, dass sie sich spezifisch miteinander zu zweidimensionalen nanoskalierten Gittern (A²B³) mit einer

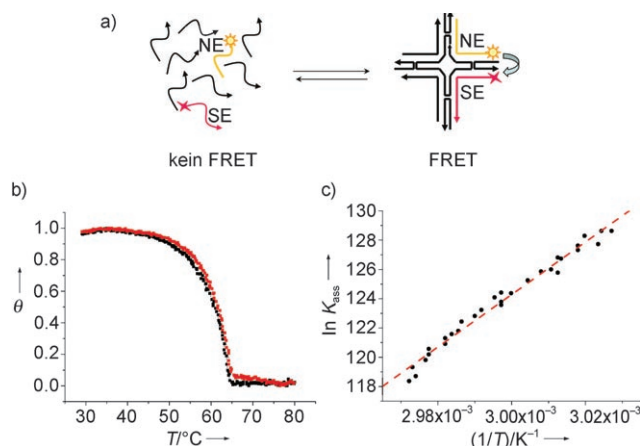


Abbildung 1. a) Markierungsstrategie für die thermodynamische FRET-Analyse der Selbstorganisation einzelner DNA-Kacheln. Die mit 3'-Fsc markierten NE- (oder BNE-3 für Kachel B³) und die mit 5'-TAMRA markierten SE-Oligomere (oder BSE-3 für Kachel B³) wurden als Reporterstränge gewählt. Der Abstand zwischen beiden Fluorophoren in der entstehenden Überstruktur wurde theoretisch auf ca. 4 nm bestimmt, wodurch ein effizienter Energietransfer ermöglicht wird.

b) Thermische FRET-Analyse der Kachel A (0.4 µM). Änderung des assemblierten Anteils (θ) während des Aufheizens (rote Kurve) und Abkühlens (schwarze Kurve) der Oligonucleotidmischung im Bereich von 29–80 °C (0.1 °C min⁻¹). Der Übergang ist reversibel und kooperativ ($T_m = 61.0$ °C). Dies zeigt, dass der Assemblierungs-/Dissoziationsprozess nach einem einfachen Modell mit zwei Zuständen verläuft. Die Anwendung der Van't-Hoff-Analyse liefert die Arrhenius-Kurve in (c). Aus Steigung und Achsenabschnitt der linearen Regression (gestrichelte rote Linie) ergeben sich jeweils die Änderungen von Enthalpie (ΔH_{vH}) und Entropie (ΔS_{vH}) des Assemblierungsprozesses.

inneren Periodizität von etwa 19.3 nm verbinden (Abbildung 2 a und S3).

Um die Selbstorganisation der Oligonucleotide in situ durch FRET-Spektroskopie überwachen zu können, wurden zwei Oligomere des „Ostarms“ der Kachel (das „nordöstliche“ Oligomer NE und das „südöstliche“ Oligomer SE) terminal mit Fluorescein (Fsc) als Donor bzw. mit Tetramethylrhodamin (TAMRA) als Akzeptor markiert. Der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren in der endgültigen Überstruktur (ca. 4–5 nm) und ihre relative Position zueinander ermöglichen es, die Entstehung von Überstrukturen in den verschiedenen Konstrukten und deren thermodynamische Eigenschaften im Detail zu analysieren.^[6] Die Assemblierung einer äquimolaren Mischung aller für eine bestimmte Überstruktur benötigten Oligonucleotide (je 0.4 µM) wurde dann in einem Echtzeit-PCR-Thermocycler untersucht.^[5] Hierbei wurde die FRET-Effizienz als Abnahme der Emission des Fsc-Donors infolge des Energietransfers zum TAMRA-Akzeptor gemessen^[7] und die Effizienzänderung

[*] Dr. B. Saccà, R. Meyer, Dr. U. Feldkamp, Dr. H. Schroeder, Prof. Dr. C. M. Niemeyer
Technische Universität Dortmund, Fakultät Chemie
Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-755-7082
E-Mail: barbara.sacca@tu-dortmund.de
christof.niemeyer@tu-dortmund.de

[**] Diese Arbeit wurde durch das Zentrum für Angewandte Chemische Genomik, eine gemeinsame Forschungsinitiative der Europäischen Union und des Ministeriums für Innovation, Wissenschaft, Forschung und Technologie des Landes Nordrhein-Westfalen, sowie durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Beihilfe FE 943/1-1 für U.F.) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

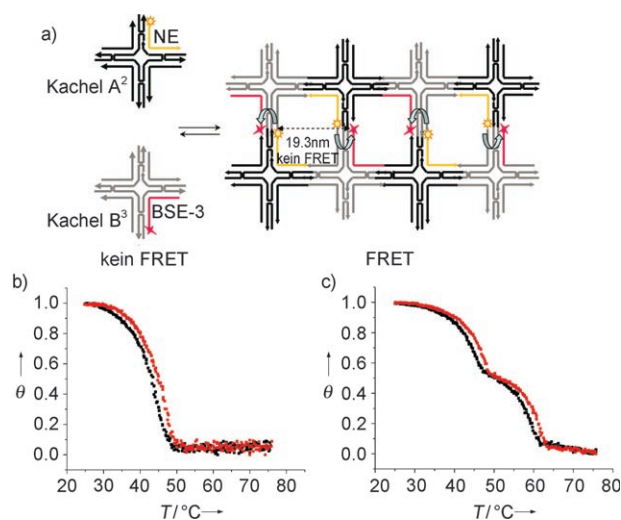


Abbildung 2. a) Zwei-Kacheln-Markierungsstrategie für die thermische FRET-Analyse der Kachel-an-Kachel-Assoziation zum A²B³-Übergitter. Als Reporteroligomere dienen das mit 5'-Fsc markierte Oligonucleotid NE von Kachel A² und das mit 3'-TAMRA markierte Oligonucleotid BSE-3 von Kachel B³. Die korrekte Bildung des Nanoarrays ermöglicht einen FRET zwischen den Fluorophoren benachbarter Kacheln. FRET-Thermalkurven für die Bildung der A²B³-Nanoarrays mit b) der Zwei-Kacheln- und c) der Einzelkachel-Markierungsstrategie. Die Überlagerung von Aufheiz- (rote Kurve) und Abkühlprofil (schwarze Kurve) belegt die Reversibilität des Assemblierungs-/Dissoziationsprozesses. Bei der Zwei-Kacheln-Markierung (Abbildung 2a) ist ein einzelner kooperativer Übergang sichtbar ($T_m = 43.3^\circ\text{C}$), der die Kachel-an-Kachel-Assemblierung darstellt. Die Einzelkachelmarkierung dagegen ermöglicht die Beobachtung sowohl der Bildung von Kachel A² ($T_m = 59.7^\circ\text{C}$) als auch der Kachel-an-Kachel-Assemblierung ($T_m = 44.0^\circ\text{C}$).

über die Temperatur im Bereich zwischen 29 und 80°C aufgezeichnet. Die Aufheiz- und Abkühlgeschwindigkeiten betrugen $0.1^\circ\text{Cmin}^{-1}$. Ein typisches Beispiel für eine aufgenommene Assemblierungs-/Dissoziations-Kurve ist in Abbildung 1b gezeigt. Die Überlagerung von Aufheiz- und Abkühlkurven sowie die rasche Änderung des assemblierten Anteils (θ) in einem relativ engen Temperaturbereich um die Schmelztemperatur (T_m) belegen die Reversibilität und Kooperativität der Überstrukturbildung (Abbildung 1b und S4a–e). Dies weist darauf hin, dass im Organisationsprozess nur zwei Zustände im Gleichgewicht auftreten: die dissoziierten Oligonucleotide und die vollständig assemblierten Kacheln. Da wir die Bildung von Intermediaten experimentell ausschließen konnten (Tabelle S2, Abbildungen S5, S6), war die Anwendung der Van't-Hoff-Analyse auf die Schmelzkurven (Abbildung 1c) möglich, um das thermodynamische Profil der Nanostrukturbildung zu berechnen.^[8]

Die Ergebnisse der Assemblierung mehrerer verschiedener Kacheln sind in Tabelle 1 zusammengefasst, zusätzliche Daten für verschiedene Konzentrationen finden sich in der Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen.^[5] Alle untersuchten Konstrukte wiesen stark negative Werte für ΔH_{VH} auf, was auf einen günstigen Enthalpiebeitrag zum Assemblierungsprozess hinweist. Dies kann der kooperativen Bildung ausgedehnter Wasserstoffbrückennetzwerke zugeschrieben werden, die zu der enthalpisch bevorzugten endgültigen Überstruktur führt. Andererseits deuten die negati-

Tabelle 1: Van't-Hoff-Analyse thermodynamischer Parameter für die Selbstorganisation von DNA-Nanostrukturen.

DNA-Nanostruktur ^[a]	T_m ^[b] [$^\circ\text{C}$]	ΔH_{VH} ^[c] [kcal mol ⁻¹]	ΔS_{VH} ^[c] [kcal mol ⁻¹ K ⁻¹]	$\Delta G_{\text{VH}}(25^\circ\text{C})$ ^[d] [kcal mol ⁻¹]
A	61.0	-370 ± 10	-0.86 ± 0.03	-113 ± 1
A(nc)	45.8	-213 ± 5	-0.45 ± 0.025	-78 ± 7
A ²	59.9	-324 ± 34	-0.73 ± 0.1	-107 ± 4
B	61.4	-477 ± 10	-1.18 ± 0.03	-125 ± 1
B ²	61.2	-379 ± 31	-0.89 ± 0.09	-114 ± 4
B ³	63.1	-451 ± 22	-1.10 ± 0.06	-124 ± 3
A ² B ³ _{Kachel-an-Kachel}	43.3	-113 ± 3	-0.33 ± 0.01	-16 ± 4
A ² B ³ (nc)	n.a. ^[e]	n.a.	n.a.	n.a.

[a] Alle einzelnen Kacheln A, A², B, B² und B³ sowie das assemblierte Nanoarray A²B³ wurden bei einer Konzentration von $0.4 \mu\text{M}$ in 1X-TEM-Puffer hergestellt, wie in den Hintergrundinformationen beschrieben. Die Negativkontrollen (nc) für Kachel A und Nanoarray A²B³ wurden wie die jeweiligen vollständigen Überstrukturen hergestellt, jedoch fehlten Oligonucleotid C in A(nc) bzw. die Oligonucleotide AN und BS-3 in A²B³(nc). Die hier beschriebenen Daten zur A²B³-Nanoarraybildung beziehen sich auf den Kachel-an-Kachel-Anlagerungsschritt (siehe Abbildung 2b und S7a). [b] Die Schmelztemperatur (T_m) ist definiert als die Temperatur, bei der 50% der endgültigen Struktur vollständig assembliert und 50% vollständig dissoziiert sind. [c] Die Berechnungen der Van't Hoff'schen Enthalpie- und Entropieänderungen (ΔH_{VH} und ΔS_{VH}) für den reversiblen thermischen Übergang sind in den Hintergrundinformationen beschrieben. [d] Freie Enthalpien (ΔG_{VH}) wurden für 25°C mit der Gibbs-Gleichung berechnet: $\Delta G_{\text{VH}} = \Delta H_{\text{VH}} - T\Delta S_{\text{VH}}$. [e] In der Negativkontrolle zur Nanoarraybildung, A²B³(nc), war eine Bestimmung der thermodynamischen Parameter nicht möglich (not applicable, n.a.).

ven Werte für ΔS_{VH} auf die vorhersehbare Zunahme innerer Ordnung im System hin, die aus der perfekten Anordnung aller Oligonucleotide im Konstrukt resultiert. Dabei bewirken die deutlich höheren enthalpischen Terme jedoch die Stabilität der Überstruktur unter normalen Bedingungen, wie aus den Werten für die freie Enthalpie bei 25°C (ΔG_{VH}) ersichtlich ist. Kontrollexperimente, in denen die Assemblierung der Kachel A ohne das zentrale Oligomer C durchgeführt wurde, zeigten einen deutlich geringeren Schmelzpunkt und niedrigere Stabilität der gebildeten Überstrukturen an (siehe A(nc) in Tabelle 1 und Abbildung S4 f).

Die Kacheln A, A², B und B² (Abbildung S1 a–d) haben identische Doppelstrang-Kernstrukturen und unterscheiden sich nur in zwei (vgl. A mit A² und B mit B²) bzw. vier (vgl. A mit B und A² mit B²) Einzelstrangüberhängen, sodass der gesamte GC-Gehalt (58%) der Duplexbereiche der Struktur konstant bleibt. Trotz des identischen Kerns bewirken die Änderungen in den Einzelstrangüberhängen signifikante Unterschiede in der thermodynamischen Stabilität, wie die Differenzen von über $150 \text{ kcal mol}^{-1}$ für die Enthalpie und mehr als 1°C für die Schmelztemperatur zeigen (Tabelle 1). Darüberhinaus belegen Experimente, in denen Kachel A bezüglich der Zahl von Einzelstrangüberhängen modifiziert wurde, dass die An- und Abwesenheit sowie die Kombination von Einzelstrangüberhängen die Stabilität und Integrität der Kachel deutlich beeinflussen kann, selbst wenn die Kernstruktur unverändert bleibt (Tabelle S3, Abbildung S8). Somit demonstrieren diese Ergebnisse deutlich, dass auch bei konstanten Doppelstrangkernen der Kacheln geringfügige Sequenzänderungen in den einzelsträngigen Bereichen si-

gnifikante Veränderungen der thermodynamischen Stabilität der gesamten Überstruktur bewirken können.

Wir untersuchten dann die Auswirkungen von drastischen Änderungen der Oligonucleotidsequenzen, wie sie in Kachel B³ realisiert sind (Abbildung S1 e). Während die Zahl der Basenpaare gegenüber den anderen Kacheln gleich blieb, wurden die Sequenzen aller neun Oligonucleotide modifiziert, aus denen die Kachel B³ besteht. Hieraus resultierte ein GC-Gehalt des Doppelstrangkerns von 46 % für die Kachel B³ (vgl. 58 % in den Kacheln A, A², B und B²). Trotz des geringeren GC-Gehalts wies Kachel B³ eine höhere thermodynamische Stabilität als Kachel A auf, zeigte jedoch eine ähnliche Stabilität wie Kachel B (Tabelle 1).

Auch diese Ergebnisse legen nahe, dass andere Faktoren neben dem GC-Gehalt (z. B. das „Atmen“ von DNA-Enden, Stapelwechselwirkungen zwischen benachbarten Basen, Hydratationseffekte und andere konformationsabhängige Kräfte) eine entscheidende Rolle für die Stabilität komplexer DNA-Überstrukturen spielen, deren Beschreibung als einfache Ansammlung kanonischer B-DNA-Doppelstränge offensichtlich nicht ausreichend ist.^[9,10]

Schließlich untersuchten wir die Assemblierung der Kacheln A² und B³ zu ausgedehnten Gittern A²B³ unter Verwendung zweier unterschiedlicher Markierungsstrategien (Abbildung 2 und S7). Zum einen wurden einzelne Kacheln, A² oder B³, wie oben beschrieben markiert. Zum anderen, um gezielt die Kachel-an-Kachel-Assemblierung zu den supramolekularen Gittern A²B³ zu beobachten, wählten wir die gegenüberliegenden Termini der Oligomere NE und SE für die Fluoreszenzmarkierung (5'-Fsc-markierter Strang NE in Kachel A² und 3'-TAMRA-markierter Strang BSE-3 in Kachel B³, siehe Abbildung 2a). Mit der Einzelkachel-Markierungsstrategie (Abbildung 2c und S7c) konnten wir klar den ersten Schritt der Nanoarraybildung erkennen, also die Bildung einzelner Kacheln (T_m von 59.7 °C für Kachel A² und 63.8 °C für Kachel B³). Ebenso konnte der zweite Schritt, also die Kachel-an-Kachel-Assoziation durch Hybridisierung der Einzelstrangüberhänge, deutlich beobachtet werden (T_m von 44 °C). Diese Kurve mit zwei Übergängen können jedoch nicht für eine Van't-Hoff-Analyse verwendet werden, da hierfür ein einzelner, reversibler Übergang zwischen nur zwei Zuständen erforderlich ist. Wir haben daher die Kachel-an-Kachel-Anlagerung separat mit der Zwei-Kacheln-Markierungsstrategie untersucht (Abbildung 2a). Diese zeigte erwartungsgemäß den Übergang zwischen nur zwei Zuständen, sodass eine Van't-Hoff-Analyse möglich war (Abbildung 2b und S7a). Die entsprechenden thermodynamischen Daten zeigen im Vergleich zur Bildung einzelner Kacheln eine geringere Stabilität (Tabelle 1), vermutlich weil hier nur die Hybridisierung komplementärer Einzelstrangüberhänge zwischen den zwei Kacheln erfasst wird. Die erfolgreiche Assemblierung der A²B³-Supergitter wurde ebenfalls durch AFM-Aufnahmen bestätigt (Abbildung S3). Zusätzliche Kontrollen ohne die Oligomere AN und BS-3 (A²B³(nc) in Tabelle 1 und Abbildung S7b) ließen keinen Übergang während des Assemblierungs-/Dissoziationsprozesses erkennen.

Zusammenfassend zeigen die oben beschriebenen Daten klar das Potential unserer neuen Methode, die Bildung von supramolekularen DNA-Nanostrukturen in Echtzeit zu be-

obachten. Nach unserem besten Wissen wurde bisher keine andere Methode beschrieben, die eine vollständige thermodynamische Charakterisierung der Assemblierung von DNA-Nanostrukturen ermöglicht. Darüber hinaus ist unsere Methode effizient in Bezug auf Zeitaufwand und Materialverbrauch. Kleine Mengen (30 µL) von bis zu 96 Proben können parallel analysiert werden, um Reproduzierbarkeit und Änderungen im Sequenzdesign und in experimentellen Bedingungen wie Oligonucleotidkonzentration, Ionenstärke und Zusammensetzung des Puffers zu untersuchen. Wir erwarten daher, dass unsere Methode vielseitig anwendbar ist, um Sequenztwürfe und experimentelle Bedingungen für die Bildung von DNA-Nanostrukturen zu erforschen und zu optimieren. Deshalb sollte unsere neue Methode zur raschen Weiterentwicklung der DNA-basierten Nanotechnologie beitragen.

Eingegangen am 18. Oktober 2007,
veränderte Fassung am 3. Dezember 2007
Online veröffentlicht am 7. Februar 2008

Stichwörter: DNA-Nanostrukturen ·
FRET (resonanter Förster-Energietransfer) ·
Nanobiotechnologie · Selbstorganisation · Thermische Analyse

- [1] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, 99, 237–247.
- [2] Aktuelle Übersichtsartikel: N. C. Seeman, *Nature* **2003**, 421, 427–431; K. V. Gothelf, T. H. LaBean, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 4023–4037; U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 1888–1910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1856–1876; C. Lin, Y. Liu, S. Rinker, H. Yan, *ChemPhysChem* **2006**, 7, 1641–1647; N. C. Seeman, *Mol. Biotechnol.* **2007**, 37, 246–257, zit. Lit.
- [3] Zu allgemeinen Prinzipien der FRET-Spektroskopie und deren Anwendung zur Untersuchung von Nucleinsäurehybridisierung siehe: T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, 2, 55–75; L. Stryer, R. P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 719–726; R. H. Fairclough, C. R. Cantor, *Methods Enzymol.* **1978**, 48, 347–379; R. M. Clegg, *Methods Enzymol.* **1992**, 211, 353–388; R. M. Clegg, A. I. Murchie, A. Zechel, D. M. Lilley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 2994–2998; R. M. Clegg, A. I. Murchie, D. M. Lilley, *Biophys. J.* **1994**, 66, 99–109; D. M. Lilley, T. J. Wilson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 507–517, zit. Lit.
- [4] H. Yan, S. H. Park, G. Finkelstein, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Science* **2003**, 301, 1882–1884.
- [5] Detaillierte Angaben zu Sequenzdesign, experimentellen Protokollen, Van't-Hoff-Analysen, Charakterisierung von Kacheln und Gittern durch Gelelektrophorese und AFM sind in den Hintergrundinformationen verfügbar.
- [6] Eine alternative Markierung des „Westarms“ führte zu ähnlichen Ergebnissen, was darauf hindeutet, dass die FRET-Reporter die Stabilität der gesamten Überstruktur, und nicht nur von Teilstrukturen in unmittelbarer Nähe der Fluorophore anzeigen (siehe Tabellen S4 und S2).
- [7] Wir konnten keinen Anstieg der TAMRA-Emission beobachten, höchstwahrscheinlich aufgrund von Löschungseffekten, die durch andere, nicht-dipolare Energietransfermechanismen verursacht wurden, wie bereits vorher für Fsc-TAMRA-FRET-Systeme beschrieben wurde: M. Torimura, S. Kurata, K. Yamada, T. Yokomaku, Y. Kamagata, T. Kanagawa, R. Kurane, *Anal. Sci.* **2001**, 17, 155–160; L. Edman, U. Mets, R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 6710–6715; Y. Jia, A. Sytnik, L. Li, S. Vladimirov, B. S. Cooperman, R. M. Hochstra-

- sser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7932–7936; M. Sauer, K.-T. Han, R. Muller, S. Nord, A. Schulz, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N. J. Marx, C. Zander, K. H. Drexhage, *J. Fluoresc.* **1995**, *5*, 247–261. Um die temperaturabhängigen Änderungen der Fluoreszenzemission von Fsc zu kompensieren, wurden parallel Kontrollen ohne TAMRA-Akzeptor durchgeführt (zu Details siehe Hintergrundinformationen).
- [8] Zur Van't-Hoff-Analyse von Zwei-Zustands-Gleichgewichtssystemen siehe: C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry: Part I–III*, Freeman, New York, **1980**; K. J. Breslauer, *Methods Mol. Biol.* **1994**, *26*, 347–372; J. L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 515–537, zit. Lit. Details zu den in dieser Studie durchgeführten Rechnungen sind in den Hintergrundinformationen verfügbar.
- [9] Nur wenige theoretische Modelle zur Berechnung der Stabilität komplexer DNA-Überstrukturen wurden bisher in der Literatur beschrieben. Zum Beispiel wurden Moleküldynamiksimulationen für PX- und JX-Kacheln durchgeführt: P. K. Maiti, T. A. Pascal, N. Vaidehi, J. Heo, W. A. Goddard III, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1463–1479; P. K. Maiti, T. A. Pascal, W. A. Goddard III, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, *7*, 1712–1720; für weitere Beispiele theoretischer Modelle supramolekularer DNA-Strukturen siehe: C. Anselmi, G. Bocchinfuso, P. De Santis, M. Savino, A. Scipioni, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 601–613; C. Anselmi, P. De Santis, R. Paparcone, M. Savino, A. Scipioni, *Biophys. Chem.* **2002**, *95*, 23–47.
- [10] Nur sehr wenige Beispiele zur Beobachtung von Schmelzprofilen von DNA-Kacheln mittels UV-Spektroskopie wurden beschrieben (siehe: R. Schulman, E. Winfree, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15236–15241, und Lit. [4]). Es wurde beobachtet, dass die Kacheln kooperativ bei ungefähr 60 °C schmelzen, was mit den hier beschriebenen Daten gut übereinstimmt.