

# Rationale Konstruktion von dynamischen DNA-Systemen\*\*

Udo Feldkamp\* und Christof M. Niemeyer\*

DNA-Strukturen · Nanobiotechnologie ·  
Nanostrukturen · Selbstorganisation

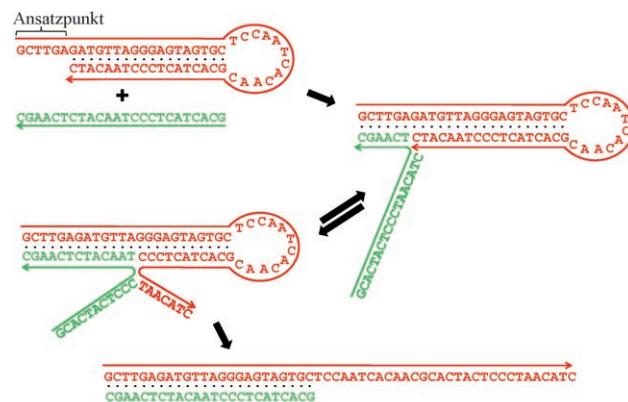
Während des letzten Vierteljahrhunderts hat sich die Verwendung von DNA-Molekülen als Bausteine für Konstruktionen im Nanometerbereich rasant weiterentwickelt – beginnend mit einfachen, aber wegbereitenden vierarmigen Kreuzungsmotiven aus DNA-Doppelhelices<sup>[1]</sup> bis hin zu aktuellen, komplexen Strukturmotiven, die als Bausteine für ausgedehnte supramolekulare Konstrukte fungieren.<sup>[2]</sup> Die wesentliche Eigenschaft, die DNA so vielversprechend für die Bottom-up-Nanotechnologie macht, ist die außergewöhnliche Spezifität der Hybridisierung einzelsträngiger Nucleinsäuren mit ihren Watson-Crick-Komplementen bei der Bildung stabiler Doppelhelices. Dies ermöglicht die Programmierung der Selbstorganisation sorgfältig entworfener Oligonucleotide zu einer Vielfalt von Überstrukturen. Des Weiteren können reversible Übergangsmechanismen zwischen verschiedenen stabilen oder metastabilen Zuständen, z.B. Sekundärstrukturkonformationen, in DNA-Überstrukturen integriert werden, sodass aus statischen Gerüsten dynamische Nanofunktionseinheiten werden.<sup>[3]</sup> Solche Funktionseinheiten können z.B. mechanische Arbeit verrichten,<sup>[4]</sup> Informationen übersetzen,<sup>[5]</sup> Nanopartikel aggregieren und dissoziieren<sup>[6]</sup> oder Proteine binden und freisetzen.<sup>[7]</sup> Der Entwurf statischer DNA-Anordnungen erfolgt inzwischen zunehmend nach systematischen Regeln, die eine Retrosynthese der gewünschten Überstrukturen hin zu den Oligonucleotiden ermöglichen, die diese Überstrukturen bilden;<sup>[8,9]</sup> dagegen sind dynamische DNA-Funktionseinheiten zumeist individuelle Entwürfe, die sehr unterschiedliche Konformationszustände, Übergangsreaktionen und entsprechende auslösende Stimuli nutzen, z.B. die Oligonucleotidverdrängung, Änderungen von Ionenkonzentrationen oder pH-Werten der Puffer oder die Bindung kleiner Moleküle.<sup>[3,10]</sup>

[\*] Dr. U. Feldkamp, 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: christof.niemeyer@tu-dortmund.de  
udo.feldkamp@tu-dortmund.de

[\*\*] Wir danken dem Zentrum für Angewandte Chemische Genomik, einer gemeinsamen Forschungsinitiative der Europäischen Union und des Ministeriums für Innovation, Wissenschaft, Forschung und Technologie des Landes Nordrhein-Westfalen, sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Beihilfe FE 943/1-1 für U.F.) für die Unterstützung unserer Arbeit.

In einer kürzlich erschienenen Publikation stellten Pierce und Mitarbeiter eine Methode zur systematischen Entwicklung dynamischer DNA-Systeme vor, die auf einzelsträngigen Sequenzen, Duplexen und Haarnadelschleifen als Grundbausteinen beruhen und verschiedene Strukturkonformationen durch Hybridisierungs-/Dissoziationspfade verbinden.<sup>[11]</sup> In einer ersten Demonstration ihres Konzepts beschrieben sie Kaskaden von Hybridisierungsreaktionen, die so programmiert waren, dass sie die schrittweise Selbstorganisation komplexer statischer Überstrukturen unterstützen oder Übergänge zwischen verschiedenen Komformationszuständen einer dynamischen DNA-Funktionseinheit ausführen.

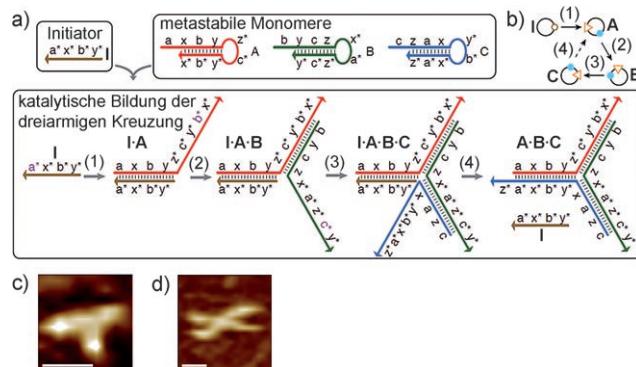
Die so genannte Strangverdrängung ist eines der am häufigsten genutzten Prinzipien zur Induktion von Strukturübergängen in DNA-Funktionseinheiten. Diese Technik wurde auch von Yin et al. eingesetzt.<sup>[11]</sup> Wie in Abbildung 1 gezeigt, wurden Haarnadelschleifen (rot) entworfen, die einen kurzen Überhang ungepaarter Basen aufweisen. Dieser „toehold“ (Ansatzpunkt) macht die Haarnadelstruktur metastabil.<sup>[12]</sup> Sie behält ihre Haarnadelkonformation stabil bei, solange sie alleine oder auch in Gegenwart weiterer ähnlich gestalteter Haarnadelschleifenmotive vorliegt. Zugabe eines Verdrängungsoligomers – eines DNA-Stranges, der das perfekte Watson-Crick-Komplement des Ansatzpunktes und der



**Abbildung 1.** Die grundlegende Strangverdrängungsreaktion. Farbige Pfeile markieren das Rückgrat der DNA-Stränge von 5'- in 3'-Richtung. Der Verdrängungsstrang (grün) hybridisiert mit dem ungepaarten Ansatzpunkt des metastabilen Haarnadelmoleküls (rot) und bildet so eine verzweigte Struktur. Der Verzweigungspunkt bewegt sich zufällig vor- und rückwärts, bis der rote Haarnadelstamm verdrängt und die Schleife geöffnet ist. Der resultierende Duplex enthält ein ungepaartes Ende, das für weitere Hybridisierungsreaktionen zur Verfügung steht.

darauf folgenden Stammsequenz ist; grün in Abbildung 1 – führt unmittelbar zur Hybridisierung und anschließend zur Wanderung des Verzweigungspunkts. Dabei löst der Verdrängungsstrang die intramolekularen Basenpaarungen des Haarnadelstrangs vollständig und öffnet so die Haarnadelschleife, da das resultierende Duplexmolekül energetisch günstiger ist als die ursprüngliche Haarnadelschleife mit kurzem Duplexstamm. (Somit kann der Verdrängungsstrang auch als „Treibstoff“ für die Strangverdrängung betrachtet werden und wird daher oft als „Treibstoffstrang“ bezeichnet.) Durch das Öffnen der Schleifenstruktur ändert sich die Rolle des Haarnadelmoleküls vom „Ziel“ der Strangverdrängung zu einem proaktiven Effektormolekül, denn der ungepaarte Teil der Haarnadel ist jetzt zugänglich und kann selbst wiederum als neuer Verdrängungsstrang für eine weitere Strangverdrängungsreaktion mit einem anderen Haarnadelziel wirken. Somit können Ketten sequenzieller Reaktionen und sogar komplexe Netzwerke von Strangverdrängungsprozessen ausgeführt werden. Ein intelligenter Entwurf einer solchen Reaktionskaskade wird diesen Prozess natürlich nicht nur zum schlichten Öffnen einer Vielzahl von Haarnadelschleifen nutzen – stattdessen kann jede Hybridisierung einer soeben geöffneten Schleife mit einem anderen DNA-Molekül als Schritt in der fortschreitenden Selbstorganisation einer wachsenden Überstruktur oder auch als ein Übergang zwischen unterschiedlichen Konformationszuständen einer dynamischen DNA-Funktionseinheit eingesetzt werden.

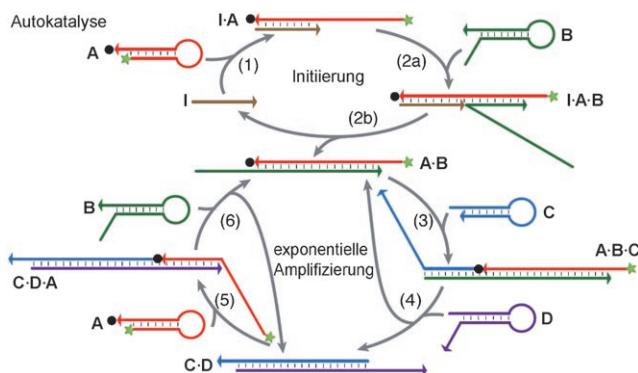
Pierce und Mitarbeiter veranschaulichten die Flexibilität ihrer Methode anhand von vier sehr unterschiedlichen Anwendungen, die jeweils vom recht abstrakten Gesamtentwurf bis zur In-vitro-Charakterisierung des Systems durchgeführt wurden.<sup>[11]</sup> Das erste Beispiel betrifft die Programmierung biomolekularer Selbstorganisationswege und demonstriert die katalytische Selbstorganisation eines dreiarmigen Kreuzungsmotivs. Dies ist ein recht einfaches Strukturmotiv, das aus drei Doppelhelix-Armen besteht, die an einem zentralen Verzweigungspunkt miteinander verbunden sind, sodass jeder der drei DNA-Stränge Teil von zwei verschiedenen Armen ist (siehe das Endprodukt in Abbildung 2a). Zu Anfang liegen die drei Stränge (**A**, **B**, **C** in Abbildung 2a) als metastabile Haarnadel-Monomere mit jeweils einem Ansatzpunkt in Lösung vor. Zugabe des Initiatormoleküls **I**, das komplementär zum Ansatzpunkt von Strang **A** und zur anschließenden Stammsequenz ist, öffnet Haarnadel **A** durch Strangverdrängung der komplementären Stammsequenz, die in Abbildung 2a mit  $y^*b^*x^*$  markiert ist (gelesen vom 5'-Ende in Richtung des 3'-Endes des Oligomers). Die resultierende ungepaarte Domäne  $z^*c^*y^*b^*$  ist komplementär zu Ansatzpunkt **b** und Stammsequenz  $ycz$  der Haarnadelschleife **B** und führt somit zur Öffnung von **B** durch Strangverdrängung. Der resultierende Produktduplex  $bycz/z^*c^*y^*b^*$  bildet den ersten Arm des angestrebten dreiarmigen Kreuzungsmotivs. Der ungepaarte Teil  $x^*a^*z^*c^*$  von **B** haftet sich nun an den Ansatzpunkt **c** von Haarnadel **C** und öffnet diese metastabile Struktur, wodurch der zweite Arm aufgebaut wird. Schließlich hybridisiert Teil  $a^*x^*b^*y^*$  von **C** mit  $ybxz$  von **A** und bildet den dritten Arm des Kreuzungsmotives. Die letzte Reaktion setzt außerdem **I** frei, das somit katalytisch den Zusammenbau eines weiteren Kreuzungsmotivs auslösen



**Abbildung 2.** a) Reaktionsnetzwerk für die Selbstorganisation eines dreiarmigen Kreuzungsmotivs. Durch Strangverdrängung öffnet Initiatormolekül **I** Haarnadel **A**, dann öffnet das ungepaarte Ende von **A** Haarnadel **B** und bildet den ersten Arm. Zwei weitere Strangverdrängungsreaktionen fügen die zwei restlichen Arme ein und führen zur Freisetzung von Katalysator **I**. b) Reaktionsgraph für den Kreuzungsaufbau. Die Kreise (Knoten) repräsentieren die Moleküle **I**, **A**, **B** und **C** aus Abbildung 2a, die Pfeile (Kanten) stehen für die vorgesehenen Aufbaureaktionen, die Symbole an den Kreisen kennzeichnen Hybridisierungsdomänen. Die leeren Dreiecke stehen für zugängliche Ansatzpunkte als Eingabedomänen (siehe Text), und die ausgefüllten Kreise markieren ursprünglich unzugängliche Subsequenzen, die komplementär zum Ansatzpunkt des nächsten Moleküls sind (Ausbabedomänen). c, d) AFM-Aufnahmen der drei- und vierarmigen Kreuzungsmotive, die mithilfe der programmierten biomolekularen Selbstorganisationsnetzwerke hergestellt wurden. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [11].

kann. Die Bildung von dreiarmigen Kreuzungsprodukten wurde durch Gelelektrophorese und Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM) nachgewiesen (Abbildung 2c). Die Autoren zeigten zudem, dass die Selbstorganisationskette leicht durch weitere metastabile Haarnadelmoleküle erweitert werden kann, sodass auch Produkte höherer Ordnung, z.B. vierarmige Kreuzungsmotive, hergestellt werden können (Abbildung 2d).<sup>[11]</sup>

Die Gestaltung eines dynamischen Systems wurde als zweites Beispiel gewählt. Dabei wurde die Strangverdrängung zur katalytischen Bildung von DNA-Duplexmolekülen eingesetzt (Abbildung 3). Der initierende Strang öffnet eine erste Haarnadelstruktur **A**, die wiederum eine zweite öffnet (**B**). Eine dritte Strangverdrängungsreaktion vervollständigt den Duplex **AB**, wodurch das Initiatormolekül freigesetzt wird. Ein raffiniertes Netzwerk aus drei solchen Duplexbildungszyklen wurde entworfen, um einen kreuzkatalytischen Kreislauf zu bilden, der zwei Duplexspezies exponentiell amplifiziert. Zunächst katalysiert der Initiatorstrang die Bildung von Duplex **AB**. Ein ungepaartes Ende von **AB** kann nun mit dem Ansatzpunkt einer weiteren Haarnadel **C** hybridisieren und somit katalytisch die Bildung von Duplex **CD** initiieren. Ein ungepaartes Ende von **CD** wiederum ist komplementär zum Ansatzpunkt von **B** und kann dadurch Duplexbildung von **AB** initiieren. Insgesamt löst die ursprüngliche Hybridisierung von **AB** einen Zyklus aus, in dem nicht nur weitere Kopien von **AB** und **CD** hergestellt werden, sondern jeder Duplex auch die Bildung der anderen Duplexspezies katalysiert, sodass eine exponentielle Amplifizierung beider Duplexe erreicht wird. Ähnlich wie in der ursprünglichen Arbeit zu DNA-Nanomaschinen<sup>[4]</sup> wurde Fluor-



**Abbildung 3.** Reaktionsnetzwerk für die kreuzkatalytische Duplexamplifizierung. Im oberen Zyklus katalysiert das Initiatormolekül I die Bildung von Duplex **AB**. Im unteren Zyklus katalysiert das ungepaarte Ende von **B** die Bildung von Duplex **CD**, was wiederum die Bildung weiterer **AB**-Duplexe katalysiert (Details siehe Text). Der schwarze Kreis und der grüne Stern an Molekül **A** markieren Löscher und Fluorophor zur spektroskopischen Analytik der **AB**-Bildung. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [11].

resenzlösung zur quantitativen Analyse des Amplifizierungsnetzwerks verwendet, wodurch die Bedeutung der auf resonantem Förster-Energietransfer (FRET) basierenden Spektroskopie zur nicht-invasiven Charakterisierung von DNA-Nanostrukturbildung unterstrichen wird.<sup>[13]</sup>

Im dritten Beispiel wurde ein weiteres Gerüst hergestellt. Dabei hybridisiert jede geöffnete Haarnadel mit zwei anderen Haarnadeln anstatt mit einer, wie in den bisherigen Beispielen. Dies führt zur Bildung großer dendritischer Überstrukturen. Schließlich verwendeten Yin et al. ihre Haarnadelöffnungsmethode zur Konstruktion eines so genannten „zweibeinigen Wanderers“. Dieses Motiv kann sich schrittweise entlang einer linearen Duplexstrecke mittels Hybridisierung und Dissoziation an Haarnadeln fortbewegen, die in regelmäßigen Abständen an der Strecke angebracht sind.

Die beschriebenen Beispiele für Strangverdrängung in geschickt entworfenen metastabilen Haarnadelschleifen demonstrieren, wie leistungsfähig diese Methode zur systematischen Programmierung von Reaktionsnetzwerken für die Selbstorganisation von statischen Gerüsten, dynamischen Funktioneinheiten, und katalytischen Reaktionskaskaden ist. Als ein Werkzeug zur weiteren Systematisierung ihres Konstruktionskonzepts für nanotechnologische Anwendungen führten Yin et al. so genannte Reaktionsgraphen ein (Abbildung 2b).<sup>[11]</sup> In diesen wird ein Strukturmotiv oder Konformationszustand als Knoten dargestellt. Symbole an diesen Knoten zeigen potentielle Hybridisierungsdomänen an, die Konformationsänderungen entweder dieses Motivs (Eingabe-Ports) oder anderer Motive (Ausgabe-Ports) auslösen können. Kanten, die Knoten verbinden, zeigen Aufbau- oder Abbaureaktionen an, die von einem Motiv/Zustand zum nächsten führen. Eine solche abstrakte Notation von Reaktionsnetzwerken ist ein Hilfsmittel im Entwurfsprozess und ermöglicht die vollständige Beschreibung der Funktionalität und der Strukturübergänge der Zielsysteme, wie auch von Zwischenstufen. Hierzu kommt sie mit nur wenigen verschiedenen Elementen und recht einfachen Regeln zur Erstellung eines Graphen aus diesen Elementen aus. Dadurch wird eine Automatisierung der Übersetzung eines

Reaktionsgraphen in konkrete Moleküle, also Haarnadelmodelle und deren Nucleotidsequenzen, stark erleichtert.

Zusammenfassend hat die Arbeit von Pierce und Mitarbeitern eine sehr wichtige Bedeutung in (mindestens) dreierlei Hinsicht. Erstens wurden einfache, elementare DNA-Motive, nämlich die metastabilen Haarnadelstrukturen, als leistungsfähige Bausteine und effiziente Signalüberträger für Aufbau/Abbau-Reaktionen eingeführt. Wie eindrucksvoll anhand mehrerer komplexer Reaktionsnetzwerke demonstriert wurde, ermöglicht diese Herangehensweise die systematische Konstruktion statischer und dynamischer DNA-Nanosysteme. Zweitens wurde eine abstrakte Formalisierung solcher Reaktionsnetzwerke entwickelt, wodurch der vollautomatisierte Entwurf von DNA-basierten Funktionseinheiten und Maschinen einen deutlichen Schritt näher rückt. Drittens kann mindestens eines der demonstrierten funktionalen Reaktionsnetzwerke unmittelbar in eine Biosensorikanwendung umgesetzt werden. So bietet sich der elegante und faszinierende kreuzkatalytische Duplexamplifizierungskreislauf als empfindliches Detektionssystem für DNA- oder RNA-Zielmoleküle in der Diagnostik an.<sup>[14]</sup> Es ist daher zu erwarten, dass dieser Arbeit<sup>[11]</sup> eine Vielzahl weiterer Studien und Anwendungen in Biosensorik und Nanobiotechnologie folgen wird.

Online veröffentlicht am 21. April 2008

- [1] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237–247.
- [2] Aktuelle Übersichtsartikel: a) N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427–431; b) K. V. Gothelf, T. H. LaBean, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4023–4037; c) U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1888–1910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1856–1876; d) C. Lin, Y. Liu, S. Rinker, H. Yan, *ChemPhys-Chem* **2006**, *7*, 1641–1647; e) N. C. Seeman, *Mol. Biotechnol.* **2007**, *37*, 246–257, zit. Lit.
- [3] F. C. Simmel, W. U. Dittmer, *Small* **2005**, *1*, 284–299.
- [4] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, Jr., F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature* **2000**, *406*, 605–608.
- [5] S. Liao, N. C. Seeman, *Science* **2004**, *306*, 2072–2074.
- [6] P. Hazarika, B. Ceyhan, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6631–6633; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6469–6471.
- [7] W. U. Dittmer, E. Reuter, F. C. Simmel, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3634–3637; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3550–3553.
- [8] P. W. K. Rothemund, N. Papadakis, E. Winfree, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e424.
- [9] P. W. K. Rothemund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302.
- [10] C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3933–3937; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3779–3783.
- [11] P. Yin, H. M. T. Choi, C. Calvert, N. A. Pierce, *Nature* **2008**, *451*, 318–322.
- [12] S. J. Green, D. Lubrich, A. J. Turberfield, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2966–2975.
- [13] B. Saccà, R. Meyer, H. Schroeder, U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2165–2168; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2135–2137.
- [14] Willner und Mitarbeiter nutzten die Replikation von DNAzymen – kurzen DNA-Oligonucleotiden mit katalytischer Aktivität –, um Signalverstärkungsnetzwerke zu erzeugen: B. Shlyahovsky, V. Pavlov, L. Kaganovsky, I. Willner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4933–4937; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4815–4819; Y. Weizmann, Z. Cheglakov, V. Pavlov, I. Willner, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 554–558; Y. Weizmann, Z. Cheglakov, V. Pavlov, I. Willner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2296–2300; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2238–2242.