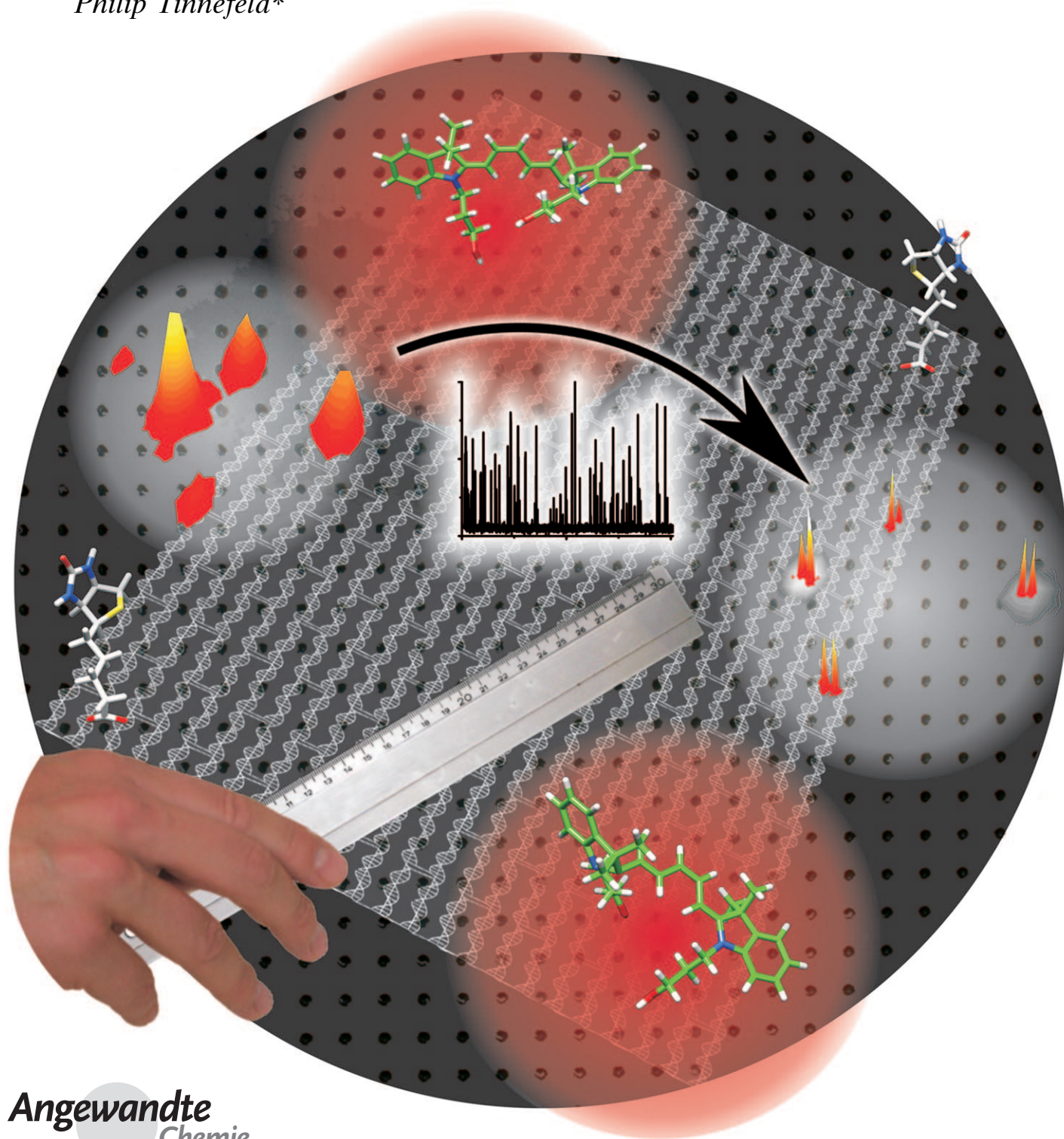


DNA-Origami als Nanometerlineal für die super-auflösende Mikroskopie**

Christian Steinhauer, Ralf Jungmann, Thomas L. Sobey, Friedrich C. Simmel* und Philip Tinnefeld*



Angewandte
Chemie

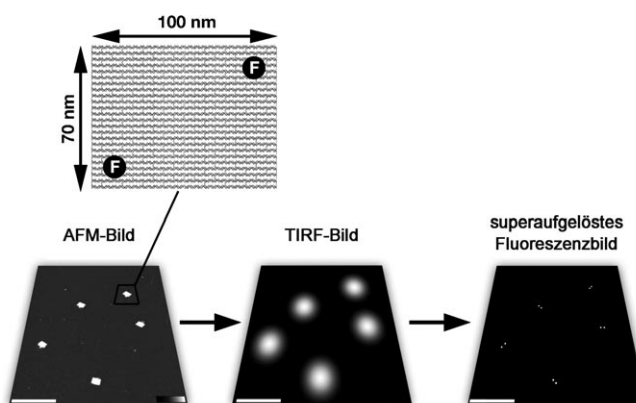
Die Selbstorganisation von DNA-Molekülen bietet durch die hochparallele Zusammenlagerung zu Nanostrukturen ein nützliches Werkzeug für die Bottom-up-Synthese.^[1] Die DNA-Origamitechnik^[2] ist ein besonders eindrucksvolles Beispiel der DNA-Selbstorganisation und nutzt das Falten eines langen Einzelstrang-DNA-Gerüsts mit kurzen DNA-Verbindungssträngen, die nur an bestimmten Punkten entlang dieses Gerüsts binden können. Mit dieser Technik kann in einem einzigen Experiment eine große Zahl (eine Milliarde oder mehr) identischer Strukturen zusammengesetzt werden. Eines der herausragenden Merkmale der Origamitechnik ist die exakte Adressierbarkeit der gebildeten DNA-Strukturen. Jeder einzelne Verbindungsstrang kann als Bindungsstelle für viele verschiedene Arten von Molekülen oder anderen Nanoobjekten dienen; diese werden entweder direkt an einen Verbindungsstrang oder über einen komplementären DNA-Strang gebunden.

DNA-Nanostrukturen werden im Allgemeinen mit Rasterkraftmikroskopie (AFM) oder Elektronenmikroskopie untersucht.^[3] Durch die jüngsten Fortschritte in der Fluoreszenzmikroskopie jenseits der Beugungsgrenze (superauflösende Mikroskopie) können jetzt auch Strukturen kleiner 200 nm optisch aufgelöst und analysiert werden.^[4] Wir zeigen, dass fluoreszenzmarkierte Verbindungsstränge (markiert mit Cy5 oder ATTO655) an definierten Positionen der rechteckigen DNA-Origamistrukturen einen wohldefinierten Abstand aufweisen. Dazu werden mithilfe verschiedener superauflösender Techniken wie dem hochauflösenden Einzelmolekül-Imaging mit Photobleichen (SHRIMP), der direkten, stochastischen, optischen Rekonstruktionsmikroskopie (dSTORM) und der Blink-Mikroskopie einzelne Moleküle sukzessive lokalisiert und superaufgelöste Bilder rekonstruiert.^[5–7] Da mehr als 200 adressierbare Positionen auf dem Origami verfügbar sind, die individuell markiert werden können, bietet diese Technik einen sehr vielseitigen Standard zur Kalibrierung superauflösender Mikroskope, die auf der aufeinanderfolgenden Lokalisierung von einzelnen Molekü-

len basieren (z.B.: PALM, STORM, FPALM, dSTORM, PAINT und Blink-Mikroskopie).^[8,9]

Bisher wurden inhomogene fadenförmige Strukturen wie Aktinfilamente oder Mikrotubuli verwendet, um diese optische Auflösung zu demonstrieren. Auch kurze doppelsträngige DNA diente als Nanometerlineal,^[5,9–11] sie hat jedoch den Nachteil, dass schon bei kurzen Distanzen eine nicht zu vernachlässigende Flexibilität auftritt.^[12] Darüber hinaus ist es schwierig, die DNA so zu immobilisieren, dass sie unter relevanten Bedingungen eine feste Orientierung aufweist. Ein verlässlicher Standard ist daher wünschenswert, um die erzielbare Auflösung zu demonstrieren und zu quantifizieren, die optische Vergrößerung zu bestätigen, Aberrationen zu korrigieren sowie die photochemischen und photophysikalischen Eigenschaften der Fluoreszenzsonden unter definierten Bedingungen zu untersuchen und zu eichen.^[6,7]

Unser Konzept ist in Schema 1 dargestellt. Um die grundsätzliche Funktionsweise zu demonstrieren, wurden zwei diagonal gegenüberliegende Verbindungsstränge des (100 × 70) nm großen Origamirechtecks mit Fluoreszenzson-



Schema 1. Das DNA-Origami ist mit zwei fluoreszenzmarkierten Verbindungssträngen (F in schwarzem Kreis) markiert, die einen definierten Abstand zueinander haben (oben). Nach der Vorbereitung werden AFM-Bilder der immobilisierten Origamiprobe aufgenommen (unten links), um so deren korrekte Form zu überprüfen. Daran schließt sich eine TIRF-Abbildung an (unten Mitte). Mittels superauflösender Fluoreszenzmikroskopie können die einzelnen Fluorophore auf der Origamiprobe identifiziert werden (unten rechts). Länge des Balkens: 500 nm, AFM-Höhenskala: 6 nm.

den markiert, was einen Fluorophorabstand deutlich unterhalb der Beugungsgrenze zur Folge hat. Anschließend wurden die Origamiprobe zur Entfernung von überschüssigen Verbindungssträngen gereinigt und mit einem AFM in einer Flüssigkeitszelle vermessen, um ihre korrekte Struktur zu überprüfen (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Origamiprobe auf einer Glasoberfläche immobilisiert und mit interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF) untersucht (Immobilisierungsprotokolle und experimentelle Methoden sind in den Hintergrundinformationen zu finden). Die TIRF-Aufnahme ergibt ein beugungsbegrenztes Bild, in dem die Emissionsmuster der Fluorophore überlappen.

[*] R. Jungmann,^[‡] T. L. Sobey, Prof. Dr. F. C. Simmel
Physics Department E14 & Center for Nanoscience
Technische Universität München
James-Frank-Straße 1, 85748 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-13820
E-Mail: simmel@ph.tum.de

C. Steinhauer,^[‡] Prof. Dr. P. Tinnefeld
Angewandte Physik – Biophysik & Center for Nanoscience
Ludwig-Maximilians-Universität München
Amalienstraße 54, 80799 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-2050
E-Mail: philip.tinnefeld@lmu.de

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Die Autoren bedanken sich bei Rob Fee und Helene Budjarek für experimentelle Unterstützung sowie bei Paul Rothmund für hilfreiche Ratschläge. Die Arbeit wurde von der DFG (Inst 86/1051-1), der Nanosystems Initiative Munich, dem LMU Center for Nanoscience und dem Elitenetzwerk Bayern unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200903308> zu finden.

Jedoch erlauben superauflösende bildgebende Verfahren, die Position jedes einzelnen Fluorophors zu identifizieren.

Als erstes Modellsystem untersuchten wir eine Origami-Struktur mit zwei am 5'-Ende ATTO655-markierten Verbindungssträngen an der rechten unteren und linken oberen Ecke (siehe Schema 1 und Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Die Fluorophore haben einen Abstand von 89.5 nm (bei angenommenen 10.67 Basen pro Windung und 3 nm zwischen den Helices im Origami).^[2] Abbildung 1 a

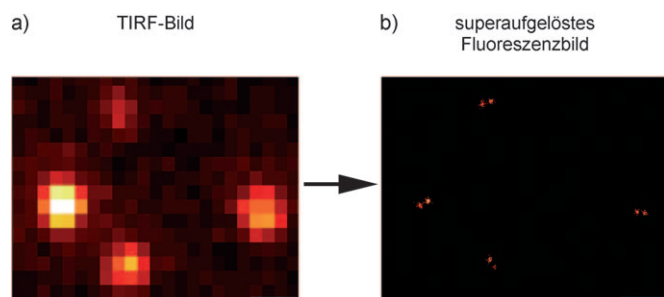


Abbildung 1. a) TIRF-Bild von der Oberfläche immobilisierten DNA-Origamirechtecken mit zwei ATTO655-markierten Verbindungssträngen. Die Positionen der einzelnen Fluorophore können aufgrund ihrer überlappenden Punktverbreiterungsfunktionen nicht bestimmt werden. b) Superauflösendes Fluoreszenzbild desselben Ausschnitts unter Verwendung der Blink-Mikroskopie: Die Positionen der Fluorophore sind nun deutlich aufgelöst. Länge des Balkens: 500 nm.

zeigt eine TIRF-Aufnahme der Origamiprobe, die über einen Biotin-Linker auf einem Glassubstrat immobilisiert ist. Da der Abstand der beiden Fluorophore kleiner als die Beugungsgrenze ist, zeigt das Bild einen einzelnen verschwommenen Punkt für jedes Origami, das zwei Fluorophore trägt. Wir untersuchten diese Strukturen mit drei superauflösenden Techniken: Blink-Mikroskopie, SHRImp und dSTORM.

Die für die Blink-Mikroskopie erforderlichen AUS-Zustände werden durch metastabile Radikationen hervorgerufen, die durch Redoxreaktionen erzeugt werden.^[7] Dieses Verfahren zeichnet sich durch ein einfaches Setup (nur ein Laser), eine hohe Geschwindigkeit und die Möglichkeit aus, dass gängige Fluorophore sogar in Gegenwart von Sauerstoff eingesetzt werden können.^[13,14] Wegen der induzierten AUS-Zustände, die durch ein reduzierendes und oxidierendes System (ROXS) – realisiert durch 50 μ M Ascorbinsäure, 50 μ M Methylviologen (MV) in Gegenwart von Sauerstoff – kontrolliert werden, ist nur ein ausreichend geringer Bruchteil der Moleküle zu jedem Zeitpunkt fluoreszierend.^[13,15] Dies ist in Abbildung 2a veranschaulicht, die das Fluoreszenzverhalten eines einzelnen DNA-Origami zeigt, das über elektrostatische Wechselwirkung auf einem Glassubstrat fixiert wurde. Die Spur zeigt häufiges Blinken der Farbstoffe mit AN-Zeiten passend zur Bildwiederholungsgeschwindigkeit der Kamera von 4 ms und AUS-Zeiten von ca. 200 ms.

Die nachträgliche Lokalisierung aller Fluorophore ermöglicht die Rekonstruktion von superaufgelösten Bildern, wie in Abbildung 1b dargestellt ist. Aus diesen Bildern wurden die Abstände zwischen beiden Molekülen in jedem

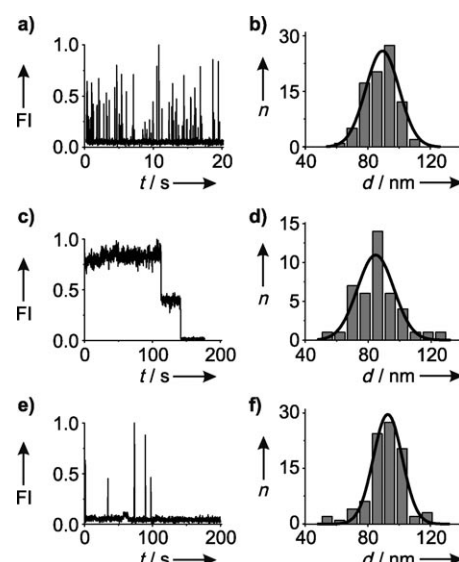


Abbildung 2. Superauflösende Mikroskopie von doppelt markiertem DNA-Origami. Intensität(FI)-Zeit(t)-Spuren (a,c,e) eines Origamikonstrukts und Histogramm der gemessenen Abstände d (b,d,f). Methoden: Blink-Mikroskopie (a,b), SHRImp (c,d) und dSTORM (e,f).

einzelnen Origamirechteck bestimmt und daraus eine Abstandsverteilung gewonnen, die in Abbildung 2b gezeigt ist. Bei 84 gemessenen Punkten wurde eine Distanz von (88.2 ± 9.5) nm ermittelt, was mit dem theoretischen Abstand von 89.5 nm gut übereinstimmt. Die Positionen der einzelnen Moleküle wurden mit einer Genauigkeit von ± 5.9 nm und der Abstand zwischen zwei Fluorophoren mit einer Genauigkeit von ± 8.3 nm ermittelt.^[16] Die Lokalisierungsgenauigkeit ist also nahezu ausschließlich für die Breite der Verteilungsfunktion verantwortlich. Das lässt darauf schließen, dass Origami-Strukturen ein robuster und reproduzierbarer Längsstandard im Nanometerbereich sind.

Ferner haben wir mehrere Immobilisierungsstrategien verglichen, da es durchaus von Bedeutung sein kann, Origami in unterschiedlichen Umgebungen einsetzen zu können. Wird ein Origamirechteck über einen einzelnen, mittig befestigten Biotin-Linker an eine BSA-passivierte Oberfläche gebunden, so führt das zu einer sehr schlechten Ausbeute (rund 20 %) an auflösbaren Strukturen, die einen Abstand von nur (62.2 ± 10.4) nm aufweisen (siehe Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Wir gehen davon aus, dass die Probe sich um den Anknüpfungspunkt dreht oder krümmt und daher nur ein geringer Teil der Origami-Strukturen aufgelöst werden kann. Bindet man drei Biotin-Linker in einer Reihe senkrecht zur Verbindungsline der beiden Farbstoffmoleküle (siehe Schema S1 in den Hintergrundinformationen), wird die Bewegung eingeschränkt, und 71 % der Konstrukte konnten aufgelöst werden; ihr Abstand betrug (76.4 ± 8.7) nm. Wird berücksichtigt, dass aufgrund inaktiver Fluorophore oder unvollständig markierter DNA vor der Messung 79 % der Origami-Strukturen zwei fluoreszierende Moleküle tragen (Daten aus Photobleichexperimenten sind nicht gezeigt), bedeutet das, dass ca. 90 % der korrekt gebildeten Strukturen aufgelöst werden konnten. Für die elektrostatisch immobilisierten Origamirechtecke, die den zu erwartenden Abstand

wie oben beschrieben aufwiesen, lag der Anteil der Strukturen mit zwei Fluorophoren bei 50 %. Diese niedrigere Ausbeute kann durch veränderte photophysikalische Bedingungen, hier eine Fluorophor-Glas-Interaktion, sowie durch die erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass ein Teil der Verbindungsstränge unspezifisch auf der nichtpassivierten Oberfläche haftet, erklärt werden.

Die SHRImp/NALMS-Technik^[5,10] hat den Vorteil, dass sie mit allen einzelmolekülkompatiblen Fluorophoren verwendet werden kann, ist aber in der Zahl der Moleküle beschränkt, die innerhalb eines beugungsbegrenzten Gebiets kolokalisiert werden können. Da ATTO655 stabile Emission in PBS-Puffer zeigt, mussten keine weiteren Maßnahmen, z. B. Sauerstoffentzug, ergriffen werden. Die mit drei Biotin-Linkern auf der BSA-Oberfläche immobilisierten Origami-Strukturen wurden so lange gefilmt, bis alle Moleküle gebleicht waren. Die Fluoreszenzpunkte wurden identifiziert und ihr Fluoreszenzverhalten auf Photobleichen hin untersucht (Abbildung 2c). In diesem Fall war das erste Molekül nach ca. 115 s und das zweite Molekül etwa 25 s später gebleicht. Die Einzelmoleküle wurden in umgekehrter chronologischer Reihenfolge lokalisiert. Die Position des zweiten Moleküls wurde anhand des Zeitfensters von 115 bis 140 s bestimmt. Die so erhaltene Intensitätsverteilung wurde von den vorhergehenden Rahmen subtrahiert, was eine Lokalisierung des ersten Moleküls ermöglichte. Eine statistische Datenanalyse ergab einen Abstand von (85.2 ± 14.2) nm (42 Punkte; Abbildung 2d), was wiederum – in Anbetracht der etwas geringeren gemessenen Entfernung im Fall der Biotin-Linker – mit dem theoretischen Abstand von 89.5 nm gut übereinstimmt.

Die dSTORM-Technik wurde verwendet, um experimentell Abstände zwischen zwei Cy5-Molekülen zu messen, die an ein Rechteck im Abstand von 99.1 nm gebunden waren.^[6] dSTORM nutzt die Tatsache, dass in Gegenwart von Thiolen wie β -Mercaptoethylamin (MEA) die Fluoreszenz von Cy5 mit blauer/grüner und roter Laseranregung ein- bzw. ausgeschaltet werden kann.^[17] dSTORM kann mit verschiedenen Di- und Tricarbocyanin-Derivaten verwendet werden, was Mehrfarbenaufnahmen ermöglicht und diese Technik flexibel bezüglich der Aufnahmegeschwindigkeit macht. Um Cy5 zu schalten, wurde der Sauerstoff enzymatisch entzogen, 50 μ M MEA zugegeben und zusätzlich ein 532-nm-Laser verwendet, um die Fluoreszenz anzuschalten. Abbildung 2e zeigt die Fluoreszenzspur eines mit Cy5 markierten Origami, anhand derer das AN-AUS-Blinken bei gleichzeitiger Anregung mit Licht der Wellenlängen 532 und 650 nm zu sehen ist. Die im Experiment gemessene Entfernung von (91.6 ± 12.2) nm (90 Punkte; Abbildung 2f) ist kleiner als im Origamidesign, was aber aufgrund des verwendeten Biotin-Ankers den Erwartungen entspricht.

Die Kombination von DNA-Origami als molekularem optischem Tisch mit superauflösender Fernfeld-Fluoreszenzmikroskopie als analytischem Instrument ermöglicht es, neue Arten von Bottom-up-Strukturen im Nanometerbereich zu konstruieren und molekulare Interaktionen auf ihnen zu studieren. In dieser Arbeit haben wir DNA-Origami-Strukturen mit fest platzierten fluoreszierenden Sonden als Nanometerlineal zur Kalibrierung superauflösender Mikroskopie

verwendet. Die über den Versuchsaufbau angestrebten Abstände wurden für elektrostatische Immobilisierung experimentell bestätigt, wobei kleinere, aber ebenfalls reproduzierbare Entfernungen gemessen wurden, sobald zur Immobilisierung Biotin-Linker eingesetzt wurden. Damit könnten Origami-Strukturen zum Quantifizierungsstandard für superauflösende Mikroskopie und für andere spektroskopische Techniken, z. B. die Plasmonenkopplung, werden.^[18] Mit den jüngsten Fortschritten in der Origamitechnik^[19] kann unser Konzept auf drei Dimensionen oder auch für Superauflösungstechniken, die mit photoschaltbaren Proteinen arbeiten, erweitert werden.^[20] Einzelmolekülmethoden können somit das gesamte kritische Längenspektrum abdecken: von wenigen Nanometern mithilfe von Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) bis zur Größenordnung konventioneller optischer Mikroskopie. Derartige Fortschritte sind auch entscheidend für die Untersuchung von dynamischen Prozessen wie Diffusion oder gerichteter Transport auf DNA-basierten Nanostrukturen. Zum Beispiel könnten Brownsche DNA-„Walker“^[21] auf einem Origamiraster platziert und in Echtzeit mit superauflösender Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden.

Eingegangen am 18. Juni 2009

Online veröffentlicht am 14. Oktober 2009

Stichwörter: DNA-Origami · Fluoreszenzmikroskopie · Molekulares Lineal · Nanometerlineal · Superauflösende Mikroskopie

- [1] N. C. Seeman, *Mol. Biotechnol.* **2007**, *37*, 246; T. H. LaBean, H. Y. Li, *Nano Today* **2007**, *2*, 26.
- [2] P. W. Rothemund, *Nature* **2006**, *440*, 297.
- [3] R. Jungmann, T. Liedl, T. L. Sobey, W. Shih, F. C. Simmel, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10062.
- [4] S. W. Hell, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 24.
- [5] M. P. Gordon, T. Ha, P. R. Selvin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6462.
- [6] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttelpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6266; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6172.
- [7] C. Steinhauer, C. Forthmann, J. Vogelsang, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16840.
- [8] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642; A. Sharonov, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18911.
- [9] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793.
- [10] X. Qu, D. Wu, L. Mets, N. F. Scherer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11298.
- [11] T. Heinlein, A. Biebricher, P. Schlueter, C. M. Roth, D.-P. Herten, J. Wolfrum, M. Heilemann, C. Mueller, P. Tinnefeld, M. Sauer, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 949.
- [12] P. A. Wiggins, T. van der Heijden, F. Moreno-Herrero, A. Spakowitz, R. Phillips, J. Widom, C. Dekker, P. C. Nelson, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 137.
- [13] J. Vogelsang, T. Cordes, C. Forthmann, C. Steinhauer, P. Tinnefeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8107.
- [14] S. van de Linde, U. Endesfelder, A. Mukherjee, M. Schüttelpelz, G. Wiebusch, S. Wolter, M. Heilemann, M. Sauer, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 465.

- [15] J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, P. Tinnefeld, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5545; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5465.
 - [16] R. E. Thompson, D. R. Larson, W. W. Webb, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2775.
 - [17] M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3801.
 - [18] C. Sönnichsen, B. M. Reinhard, J. Liphardt, A. P. Alivisatos, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 741.
 - [19] S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Hogberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **2009**, *459*, 414; E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdough, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, J. Kjems, *Nature* **2009**, *459*, 73.
 - [20] W. Shen, H. Zhong, D. Neff, M. L. Norton, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6660.
 - [21] Y. Tian, Y. He, Y. Chen, P. Yin, C. Mao, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4429; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4355; R. Pei, S. K. Taylor, D. Stefanovic, S. Rudchenko, T. E. Mitchell, M. N. Stojanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12693; P. Yin, H. M. Choi, C. R. Calvert, N. A. Pierce, *Nature* **2008**, *451*, 318; S. Green, J. Bath, A. Turberfield, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, 238101; T. Omabegho, R. Sha, N. C. Seeman, *Science* **2009**, *324*, 67.
-