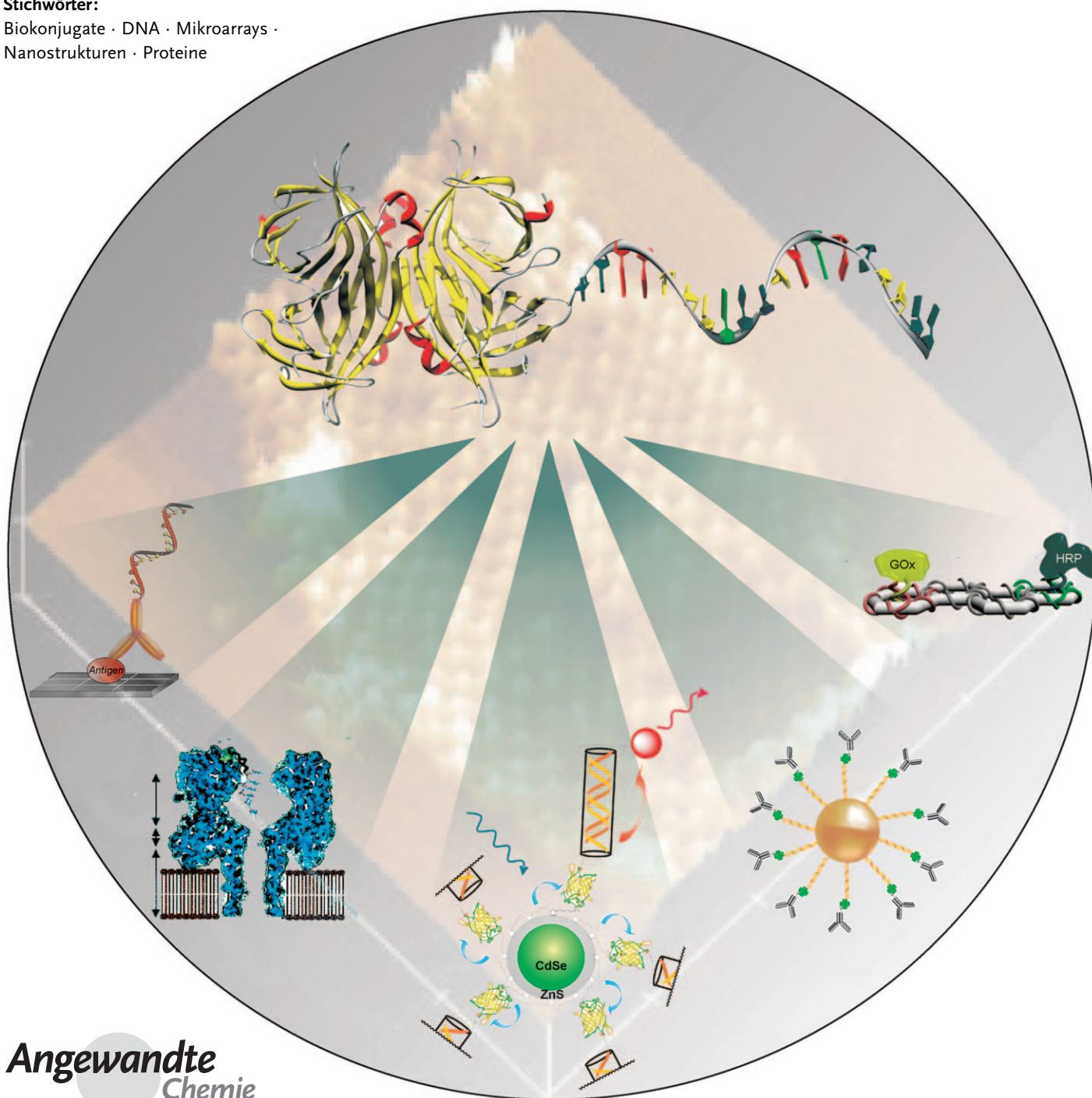


Halbsynthetische DNA-Protein-Konjugate für Biosensorik und Nanofabrikation

Christof M. Niemeyer*

Stichwörter:

Biokonjugate · DNA · Mikroarrays · Nanostrukturen · Proteine



Durch Konjugation mit artifiziellen Nucleinsäuren lassen sich Proteine mit einem leicht herstellbaren, robusten Etikett versehen. Dieses Anhängsel ist durch hochspezifische, molekulare Erkennungsmechanismen wie die Watson-Crick-Basenpaarung selektiv adressierbar. Solche DNA-Protein-Konjugate mit kombinierten Eigenschaften haben vielfältige Verwendungsmöglichkeiten, z. B. in hochempfindlichen biomedizinischen Analyseverfahren, der Grundlagenforschung zur molekularen Erkennung oder dem Aufbau von DNA-Nanostrukturen. Dieser Aufsatz fasst die aktuellen Methoden zur Synthese dieser Konjugate zusammen und präsentiert den aktuellen Stand ihrer Anwendungen. So wurden DNA-Protein-Konjugate zu Modellsystemen zusammengesetzt, die die Untersuchung von katalytischen Kaskadenreaktionen oder von Lichtsammelkomplexen ermöglichen. Außerdem finden diese Hybridkonjugate Verwendung bei der Biofunktionalisierung planarer Oberflächen bei Mikro- und Nanoarrays oder zur Funktionalisierung anorganischer Nanopartikel. Entsprechend finden sich mögliche Anwendungen im Bereich der Detektion, der Materialwissenschaften und der Katalyse.

1. Einleitung

Die Evolution hat eine immense Vielfalt an hochspezialisierten Nanomaschinen aus Proteinen, Nucleinsäuren und anderen (Makro-)Molekülen für die zahlreichen anspruchsvollen Aufgaben innerhalb und außerhalb der lebenden Zelle hervorgebracht. Viele dieser faszinierenden Nanomaschinen entstehen durch Selbstorganisation verschiedenster Protein- und Nucleinsäurekomponenten.^[1] So bildet sich beispielsweise das Ribosom spontan aus mindestens drei Nucleinsäuren und über 50 Proteinbausteinen. Diese Selbstorganisation wird durch verschiedene nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren der beteiligten Proteine mit ausgewählten Nucleotiden und dem Phosphatrückgrat der ribosomalen RNA angetrieben und gesteuert.^[2] Solche erstaunlichen Beispiele der Selbstorganisation nativer Systeme führten zu einer intensiven Erforschung biomimetischer Bottom-up-Strategien für die Herstellung künstlicher Systeme in der Größenordnung von 5–100 nm, einem Bereich, der mit herkömmlichen mikrostrukturtechnischen oder chemischen Herangehensweisen nur schwer zugänglich ist.^[3] Aus den ersten Vorschlägen zur Herstellung künstlicher Objekte im Nanometerbereich ausgehend von biomolekularen Bausteinen (z. B. Proteinen und Nucleinsäuren)^[4,5] ist mittlerweile ein eigenständiges Forschungsgebiet hervorgegangen, das häufig als Nanobiotechnologie bezeichnet wird.^[6,7]

Bei der Bottom-up-Konstruktion nanoskaliger Objekte haben sich synthetische DNA-Oligonucleotide als besonders nützlich erwiesen.^[8–11] Dank der hoch spezifischen Watson-Crick-Basenpaarung ist es möglich, künstliche Rezeptoren zu entwerfen, die auf der Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Adenin und Thymin sowie von Guanin und Cytosin auf komplementären Nucleinsäuresträngen beruhen. DNA-Moleküle lassen sich leicht synthetisieren und weisen eine hohe physikochemische Stabilität auf. Kurze DNA-Doppelhelices

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	1221
2. Synthese von DNA-Protein-Konjugaten	1221
3. Anwendungen	1226
4. Zusammenfassung und Ausblick	1234

zeigen eine hohe mechanische Starrheit, und darüber hinaus liefert die Natur eine Vielzahl an hochspezifischen DNA modifizierenden Enzymen, wie die Ligasen und die Nucleasen, mit deren Hilfe DNA auf atomarer Ebene präzise manipulierbar ist. Daher lässt sich DNA ausgezeichnet für die molekulare Nanokonstruktion einsetzen.

Durch die Herstellung halbsynthetischer DNA-Protein-Konjugate werden die einzigartigen strukturgebenden Eigenschaften der DNA mit der enormen Funktionsvielfalt von Proteinen verknüpft. Diese wurden über Milliarden von Jahren durch die Evolution für hochspezifische Funktionalität optimiert, z. B. für die chemische Katalyse, die Energieumwandlung und die Translokation anderer Komponenten durch Membranen. Dieser Aufsatz fasst die aktuellen Methoden zur Herstellung von DNA-Protein-Konjugaten zusammen und beschreibt wichtige Anwendungen dieser Hybridmoleküle in der Bioanalytik und den Nanowissenschaften.

2. Synthese von DNA-Protein-Konjugaten

Für die chemische Kupplung von synthetischen DNA-Oligomeren und Proteinen sind verschiedenste Methoden bekannt, die auf kovalenten wie auch nichtkovalenten Bindungen beruhen. Da wichtige Fortschritte in diesem Gebiet bereits in anderen Übersichtsartikeln zusammengefasst wurden,^[12] sollen im Folgenden in erster Linie die neuesten Entwicklungen beleuchtet werden.

[*] 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

2.1. Nichtkovalente Kupplungen

2.1.1. Die Biotin-(Strept-)Avidin-Wechselwirkung

Ein häufig verwendetes und einfaches Verfahren zur Synthese von DNA-Protein-Konjugaten beruht auf der besonders effektiven Wechselwirkung von D-Biotin (Vitamin H) mit den homotetrameren Proteinen Avidin und Streptavidin (STV). Dank der außergewöhnlich hohen Affinitätskonstante dieser Wechselwirkung (ca. $10^{14} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$), der hohen chemischen und thermischen Stabilität von STV sowie der Verfügbarkeit einer Vielzahl von Biotinderivaten und schonenden Biotinylierungsmethoden bilden Biotin-STV-Konjugate die Basis für viele diagnostische und analytische Verfahren.^[13,14] Biotinylierte Oligonucleotide lassen sich leicht mithilfe automatisierter Phosphoramidit-Festphasensynthese herstellen und sind kommerziell erhältlich. Das Mischen von biotinylierter DNA und dem Zielprotein (Schema 1 a), das chemisch oder gentechnisch mit (Strept-)Avidin gekuppelt wurde, führt direkt zu den gewünschten DNA-Protein-Konjugaten. Diese Methode wurde bereits häufig für die Herstellung von Reagentien für bioanalytische Assays verwendet (siehe Abschnitt 3.1.1) und eignet sich für den Aufbau von Nanostrukturen, wie an einigen Beispielen gezeigt wurde (siehe Abschnitt 3.2.1). Wegen der hohen Affinität von (Strept-)Avidin für Biotin spielt die Dissoziation der Konjugate normalerweise keine Rolle, allerdings ist die tetramere Struktur von (Strept-)Avidin ein Problem für solche DNA-Protein-Konjugate, denn sie macht es schwer, wenn nicht sogar unmöglich, die Stöchiometrie der DNA-Protein-Konjugate zu kontrollieren und ist damit ein wesentliches Hindernis auf dem Weg zu definierten Nanostrukturen. Zwar kann monobiotinyliertes POI mithilfe molekularbiologischer Techniken erzeugt werden,^[15] allerdings wird auch die gentechnische Konjugation des POI mit STV durch den tetrameren Aufbau von STV erschwert. Die Verwendung eines relativ großen Verbindungsproteins wie STV kann ebenfalls Schwierigkeiten verursachen.

2.1.2. Die Ni-NTA-Hexahistidin-Wechselwirkung

Um die Schwierigkeiten einer Konjugation mithilfe von (Strept-)Avidin zu umgehen, wurde kürzlich eine alternative Methode zur Herstellung von DNA-Protein-Konjugaten entwickelt. Diese Methode nutzt die spezifische Wechselwir-

kung zwischen einem Oligohistidin-haltigen Peptid und einem Nickel(II)-Ion, das durch Nitrilotriessigsäure (NTA) komplexiert ist, für die Konjugation (Schema 1 b).^[16–19] Dabei vermittelt das Nickel(II)-Ion eine Wechselwirkung zwischen NTA und einem POI, das eine Hexahistidinmarkierung (His₆-Tag) trägt. Zwei dieser Histidinreste können zusammen mit einem NTA-Molekül alle sechs Koordinationsstellen des Nickel(II)-Ions besetzen. Ein His₆-Tag wird häufig gentechnisch am N- oder C-Terminus eines rekombinanten Proteins angefügt, sodass das Protein anschließend einfach durch Affinitätschromatographie über eine NTA-Matrix mit immobilisiertem Nickel(II) aufgereinigt werden kann.^[20,21] Vor kurzem stellten Turberfield et al. ein DNA-Protein-Konjugat vor, das auf dieser Wechselwirkung zwischen Ni²⁺-NTA und His₆-Tag beruht.^[18] Ausgehend von kommerziell erhältlichen, aminomodifizierten DNA-Oligonucleotiden stellten sie zuerst Oligonucleotide her, die eine, zwei oder drei NTA-Gruppen enthielten (Abbildung 1). Es war bekannt, dass die räumliche

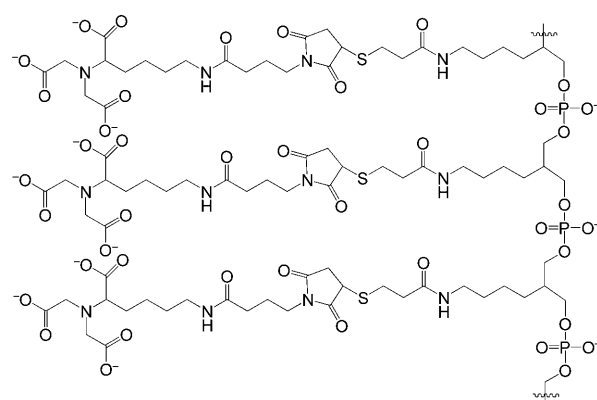


Abbildung 1. Tris(NTA)-modifizierte DNA. Die Oligonucleotideinheit wurde weggelassen.

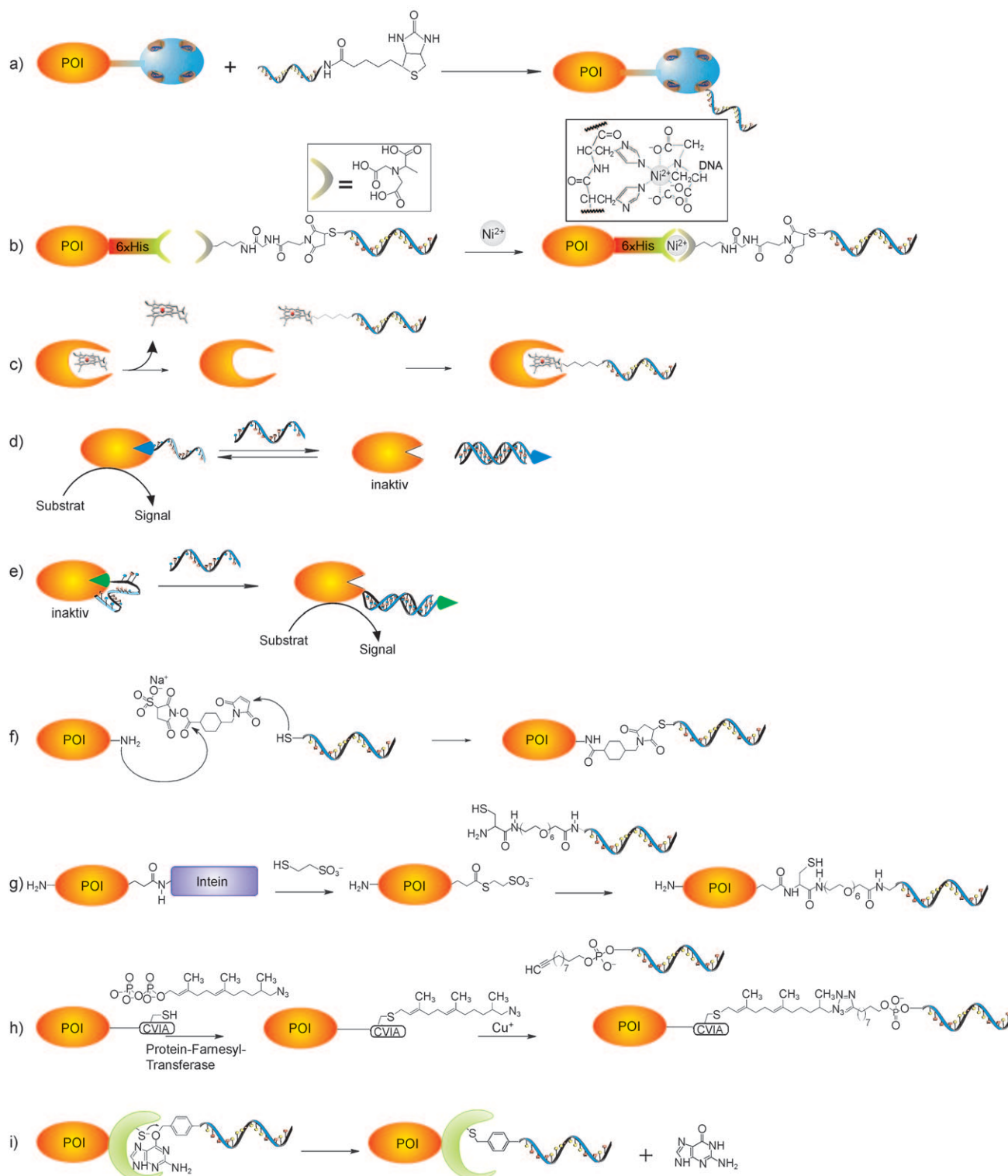
Konzentration mehrerer NTA-Gruppen zu einer Verstärkung der Wechselwirkung mit His₆-markierten Proteinen führt.^[22] Auch Turberfield und Mitarbeiter beobachteten eine erhöhte Stabilität in Abhängigkeit von der Zahl an NTA-Liganden pro Oligonucleotid bei DNA-Protein-Konjugaten, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) als POI enthielten. So wurden Dissoziationskonstanten (K_D) von 120 bzw. 6 nM für Bis(NTA)- und Tris(NTA)-DNA gefunden. Diese ortsspezifische Verbindung kann durch die Zugabe eines Nickelchelators wie Ethylendiamintetraacetat oder durch Imidazol einfach wieder aufgelöst werden. Um die grundsätzliche Anwendbarkeit dieser DNA-Protein-Konjugationsmethode zu demonstrieren, wurden verschiedene DNA-Nanostrukturen mit dem His₆-markierten GFP modifiziert.^[18]

2.1.3. Antikörper-Hapten-Wechselwirkung

Außer Biotin und NTA als Liganden können DNA-Oligonucleotiden auch weitere Affinitätsmarkierungen durch Festphasensynthese angefügt werden. So kann der Chromophor Fluorescein (Fsc) als Hapten verwendet werden, an das anti-Fsc-Immunglobulin-G(IgG)-Antikörper spezifisch



Christof M. Niemeyer studierte Chemie an der Universität Marburg und promovierte am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim/Ruhr bei Manfred T. Reetz. Nach einem Forschungsaufenthalt am Center for Advanced Biotechnology in Boston (USA) bei Charles R. Cantor habilitierte er sich an der Universität Bremen (2000) und hat seit 2002 den Lehrstuhl für Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik an der TU Dortmund inne. Er erforscht die Eigenschaften und Anwendungen von Bio-konjugaten und ist Gründer der Firma Chimera Biotech, die diagnostische Anwendungen von DNA-Protein-Konjugaten kommerzialisiert.



Schema 1. Strategien für die Konjugation von DNA mit einem Zielprotein (protein of interest, POI). a) Biotin-(Strept-)Avidin-Kupplung; b) Ni-NTA-His₆-Konjugation; c) Kofaktor-Rekonstitution von Apoenzymen, die genutzt werden kann, um die enzymatische Aktivität d) an- und e) auszu-schalten; kovalente Konjugate werden häufig unter Verwendung von heterodispezifischen Vernetzungsreagentien erzeugt (f; gezeigt: sulfoSMCC). Eine andere Möglichkeit ist die Herstellung als Fusionsprotein mit einem Intein (g), die enzymatische Modifizierung durch Protein-Farnesyl-Transferase (h) oder Verwendung der O⁶-Alkylguanin-DNA-Aalkyltransferase (SNAP-Tag) (i) als reaktiver Teil der gentechnischen Fusion mit dem POI.

binden können.^[23] Es gibt bereits eine Vielzahl an Publikationen zur Verwendung Fsc-modifizierter DNA-Oligonucleotide, die mithilfe von anti-Fsc-IgG mit einem Chromophor,

Fluorophor oder Reporterprotein verbunden sind, als Sonden für die In-vitro-Detektion von komplementären Nucleinsäuresequenzen.^[24] Üblicherweise wird die Fsc-IgG-Bindung in

analytischen Ansätzen weder auf molekularer Ebene charakterisiert noch für weitergehende präparative Aufbauschritte genutzt. Unlängst haben Mao und Mitarbeiter Fsc-modifizierte Oligonucleotide genutzt, um ein Hapten-modifiziertes DNA-Nanoarray zu konstruieren. Dieses Array diente anschließend als Templat für die Erzeugung einer sehr dicht gepackten Anordnung des entsprechenden anti-Fsc-Antikörpers. Der Abstand zwischen den Antikörpern betrug dabei lediglich 20 nm.^[25] Andere häufig verwendete Hapten-Antikörper-Paare, die bereits in verschiedenen diagnostischen Methoden Anwendung gefunden haben,^[26] sind IgGs gegen Biotin, Dinitrophenol, Digoxigenin oder kurze Peptide wie der FLAG-Tag.^[27]

2.1.4. Aptamere

Für die Konjugation von Nucleinsäuren und Proteinen können auch Affinitätsmarker verwendet werden, die durch die Nucleinsäure selbst gebildet werden. Aptamere sind Nucleinsäuresequenzen, die dreidimensionale Strukturen bilden, die mit hoher Affinität an eine Zielstruktur binden.^[28,29] Diese Aptamersequenzen können einfach während der Festphasensynthese an das gewünschte Oligonucleotid angefügt werden. Zwar gibt es bis heute nur eine begrenzte Zahl an Aptameren gegen spezifische Proteine, weshalb die meisten Studien mit dem gut erforschten anti-Thrombin-Aptamer^[30] als Modell durchgeführt wurden, es konnte aber gezeigt werden, dass diese Methode der Konjugation grundsätzlich für Anwendungen in der Bioanalytik und Nanostrukturtechnik einsetzbar ist (siehe Abschnitt 3.2.2).

2.1.5. Rekonstitution von Apoenzymen

Ein halbsynthetischer Ansatz wurde für Enzyme entwickelt, die einen nicht diffusionsfähigen organischen Kofaktor enthalten, der oft auch als prosthetische Gruppe bezeichnet wird. Diese Gruppe befindet sich im aktiven Zentrum und ist für die katalytische Aktivität essenziell. Bekannte Beispiele für prosthetische Gruppen sind Porphyrin- und Flavinderivate. Diese Kofaktoren können häufig aus dem Protein entfernt werden, wodurch das so genannte Apoenzym entsteht, das anschließend mit einem artifiziellen Analogon des nativen Kofaktors rekonstituiert werden kann. Diese Rekonstitution wird im Bereich der strukturellen Enzymologie und Biotechnologie häufiger eingesetzt.^[31] Die Rekonstitution ist auch eine Methode zur Herstellung von hybriden DNA-Enzym-Konjugaten, da eine entsprechende Nucleinsäure chemisch mit dem Kofaktor konjugiert und das Apoenzym nachfolgend mit diesem Kofaktor zum Holoenzym rekonstituiert werden kann (Schema 1c). Die Praktikabilität dieses Konzepts wurde von Fruk et al. nachgewiesen, die dafür chemische Konjugate aus DNA und Häm (Protoporphyrin IX) herstellten, die zur Rekonstitution von Apomyoglobin^[32] oder Apomeerrettichperoxidase^[33] verwendet wurden. Die entstandenen halbsynthetischen DNA-Enzym-Konjugate waren wieder voll funktionell, konnten durch ihren DNA-Teil an eine komplementäre, auf einer Oberfläche immobilisierte Nucleinsäure binden und so zu Detektionszwecken^[34,35] und für die Katalyse eingesetzt werden (siehe Abschnitt 3.2.3).

Ein ähnliches Konzept verfolgten Simon et al., die Apoflavinreduktase mit einem Flavin-Oligonucleotid-Konjugat rekonstituierten (Schema 1d).^[36] Die Hybridisierung des DNA-Protein-Hybrids mit einem komplementären Oligonucleotid führt zu einer Dissoziation des Kofaktors, sodass das Enzym inaktiviert wird. Auf diese Weise war es anschließend möglich, eine spezifische Ziel-DNA zu detektieren. Ghadiri und Mitarbeiter stellten chemische Konjugate aus einer Protease und DNA-Oligonucleotiden her,^[37] die am anderen Ende ein Inhibitormolekül enthielten (Schema 1e). Dieser Inhibitor blockiert das aktive Zentrum des Enzyms solange die DNA einzelsträngig ist, sodass keine katalytische Aktivität detektierbar ist. Durch Hybridisierung mit einer komplementären Ziel-DNA bildet sich eine rigide Doppelstrang-DNA, sodass der Inhibitor aus dem aktiven Zentrum entfernt wird und die katalytische Aktivität des Enzyms wiederhergestellt ist. Diese DNA-abhängige allosterische Aktivierung wurde bereits für den Nachweis von Ziel-DNA^[37] und die Konstruktion von molekularen logischen Elementen eingesetzt.^[38]

2.2. Kovalente Kupplung

Zur Umgehung der problematischen Dissoziation nicht-kovalenter reversibler Wechselwirkungen sowie zur einfacheren Charakterisierung der DNA-Protein-Konjugate bietet es sich an, DNA und Protein kovalent miteinander zu verknüpfen. Die ersten Arbeiten auf diesem Gebiet nutzen die statistische Kupplung von Nucleinsäuren und Proteinen durch homodifunktionelle Vernetzungsreagentien wie Glutardialdehyd^[39] oder durch UV-induzierte Konjugation,^[40] um Sonden für Nucleinsäure-Hybridisierungsassays herzustellen. Allerdings führen diese Ansätze normalerweise nicht zu Konjugaten mit definierter Stöchiometrie.

2.2.1. Disulfid- und Maleinsäureimidkupplung

Die Herstellung von DNA-Protein-Konjugaten gelingt unter Einsatz von Thiolchemie zur Kupplung von Oligonucleotid und Protein. So ist es z. B. möglich, Cysteinreste gentechnisch in rekombinante Proteine einzufügen und diese nachfolgend zur Herstellung von DNA-Konjugaten mit definierter Stöchiometrie und Regioselektivität bezüglich des Kupplungsortes zu nutzen. In einer richtungsweisenden Arbeit erzeugten Corey und Schultz^[41] ein halbsynthetisches DNA-Protein-Konjugat, indem sie ein Alkylthiol-modifiziertes DNA-Oligonucleotid über eine Disulfidbindung mit einem Cystein im Protein *Staphylococcus*-Nuclease (SN) kuppelten. Das Oligonucleotid-SN-Konjugat wurde so zu einer synthetischen sequenzspezifischen Nuclease, da der DNA-Einzelstrang mit komplementären Bereichen auf einer Plasmid-DNA eine Dreifachhelix bilden kann und so nur noch ortsspezifisch das DNA-Rückgrat schneidet. Spätere Arbeiten zeigten, dass DNA-SN-Konjugate mit einer erhöhten Geschwindigkeitskonstanten an komplementäre Doppelstrang-DNA (dsDNA) hybridisieren, was vermutlich auf Coulomb-Wechselwirkung zwischen der basischen SN und der Ziel-DNA zurückzuführen ist, wodurch die effektive Konzentra-

tion des Konjugats im Bereich der Zielsequenz erhöht wird.^[42,43] Die ortsspezifische Kupplung von Thiol-modifizierten Oligonucleotiden mit Proteinen wurde verwendet, um definierte DNA-Protein-Konjugate herzustellen, in denen ein einzelnes DNA-Oligonucleotid kovalent im Lumen einer α -Hämolsin-Pore fixiert ist. Diese auch „DNA-Nanoporen“ genannten Konjugate eignen sich als neuartige Sensoren (3.2.5).^[44,45]

Bei Verwendung eines entsprechenden, rekombinanten STV können mithilfe ortsspezifischer Disulfidbrückenbildung DNA-Konjugate hergestellt werden,^[46] die eine Alternative zur statistischen Kupplung mithilfe heterodispezifischer Vernetzungsreagentien bieten. Die gebildete Disulfidbrücke kann unter reduktiven Bedingungen reversibel gespalten werden; eine irreversible Kupplung ist dagegen mit Vernetzungsreagentien wie sulfoSMCC möglich, die eine Maleinsäureimidgruppe enthalten (Schema 1 f). Dieses Molekül ist ein repräsentatives Beispiel für die große Gruppe der heterodispezifischen Vernetzungsreagentien, die üblicherweise zuerst mit dem Protein gekuppelt werden, sodass auf der Proteinoberfläche Thiol-reaktive Maleinsäureimidgruppen entstehen. Anschließend wird das aktivierte Protein aufgereinigt und mit Thiol-modifizierten Oligonucleotiden gekuppelt.^[47–49] Ist eine ortsspezifische Kupplung erwünscht und enthält das POI zugängliche Cysteinreste, kann die Kupplungsreihenfolge durch die Verwendung von Amino-modifizierten Oligonucleotiden auch invertiert werden.^[50] Die Methode ist vielseitig einsetzbar, da die verwendeten Proteine nicht unbedingt gentechnisch modifiziert werden müssen und auch lange DNA-Fragmente gekuppelt werden können, die durch Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Thiol-modifizierten Primern synthetisiert werden können. Allerdings ist es bei dieser Methode notwendig, nach jeder Kupplung überschüssiges Oligonucleotid und Protein vom Konjugat zu trennen.

2.2.2. Bioorthogonale Chemie

Nicht immer ist ein einzelner Cysteinrest auf der Oberfläche des POI adressierbar. Daher wurden andere Kupplungsmethoden entwickelt, deren Chemie orthogonal zu jener der vielfältigen chemischen Gruppen in nativen Proteinen ist. Ein repräsentatives Beispiel ist die Ligation exprimierter Proteine (expressed protein ligation, EPL),^[51,52] bei der rekombinante Proteine, die C-terminal einen Thioester enthalten, spontan, selektiv und unter milden Reaktionsbedingungen mit N-terminalen Cystein-konjugaten von Nucleinsäuren reagieren.^[53] Wie in Schema 1 g gezeigt, wird bei dieser Methode das POI gentechnisch mit einer Inteindomäne fusioniert. Das Fusionsprotein wird anschließend in *E. coli* überexprimiert und an eine Affinitätsäulenmatrix gebunden. Durch die Zugabe einer niedermolekularen Thiolkomponente wie Mercaptoethansulfonsäure wird das POI durch eine Reaktion des Inteins von der Säulenmatrix getrennt, wodurch gleichzeitig ein C-terminaler Thioester am POI entsteht, der spezifisch mit einem Cystein-Nucleinsäure-Konjugat reagieren kann. Da die EPL-Methode sowohl Peptidnucleinsäure(PNA)- als auch DNA-Protein-Konjugate mit definierter, stöchiometrischer Zusammensetzung und

ortsspezifischer Verknüpfung ermöglicht, ist sie vielen konventionellen Kupplungstechniken überlegen.^[53–55]

Die aktuelle Forschung beschäftigt sich besonders mit der Entwicklung bioorthogonaler Ansätze zur selektiven chemischen Kupplung von Proteinen in vitro und in lebenden Zellen.^[56] Die wohl bekanntesten Methoden sind dabei die Staudinger-Ligation von Azid- und Phosphin-modifizierten Komponenten^[57] sowie die Kupfer(I)-katalysierte 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition von Aziden und Alkinen (CuAAC).^[58] Erst seit kurzem sind die photoinduzierbare 1,3-dipolare Cycloaddition, die durch Molekülspannung induzierte Azid-Alkin-Cycloaddition, die Kreuzmetathese von Allylsulfiden sowie die Diels-Alder-Reaktion von Tetrazin und *trans*-Cycloocten als Alternativen verfügbar.^[59] Die Staudinger-Ligation und die Huisgen-Cycloaddition wurden bereits häufig in der chemischen Biologie eingesetzt, um Biomoleküle zu markieren, die für die anschließende Untersuchung im lebenden System^[60] oder in der In-vitro-Bioanalytik eingesetzt wurden.^[61] Diese beiden Methoden wurden auch kürzlich verwendet, um DNA-Protein-Konjugate zu synthetisieren. So wurden Glycoproteine auf der Oberfläche von HEK-Zellen über den Zuckermetabolismus mit Azidgruppen ausgestattet, die anschließend selektiv mit Phosphinderivatisierten Oligonucleotiden modifiziert werden konnten (Abbildung 2).^[62,63] Die so mit DNA funktionalisierten Zellen

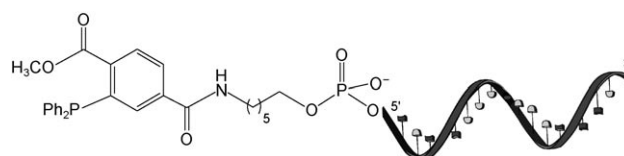


Abbildung 2. Phosphin-modifiziertes Oligonucleotid zur Synthese von DNA-Protein-Konjugaten durch Reaktion mit Azido-funktionalisierten Glycoproteinen.

wurden anschließend mithilfe DNA-vermittelter Immobilisierung (DNA-directed immobilization, DDI) im Mikrometernmaßstab angeordnet^[62,63] oder mithilfe eines Rasterkraftmikroskops (atomic force microscope, AFM) hinsichtlich der Zelladhäsion und der Strukturierung auf Oberflächen untersucht.^[64] Vor kurzem präsentierte dieselbe Gruppe die interessante Möglichkeit, native Proteine auf der Zelloberfläche direkt mit durch *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) aktivierten DNA-Oligonucleotiden zu koppeln.^[65] Dabei erfolgt die Konjugation zwar unspezifisch, jedoch ist die Methode offensichtlich schnell, effizient und sehr umfassend einsetzbar, da so nahezu jede Säugerzelle mit DNA-Oligonucleotiden modifizierbar ist. Die Stärken dieser Methode konnten bereits im Zusammenhang mit der DNA-vermittelten Bindung und anschließenden elektrochemischen Analyse des Metabolismus einer einzelnen Säugerzelle auf einem Mikroelektrodenarray^[66] und durch den programmierten Aufbau dreidimensionaler Mikrogewebe mit definierten Zell-Zell-Kontakten direkt in Lösung demonstriert werden.^[67]

Die CuAAC wurde bereits zur Modifizierung synthetischer DNA-Oligonucleotide genutzt,^[68] und darüber hinaus

sind heute auch Methoden verfügbar, die ohne Kupfer auskommen.^[69] Distefano und Mitarbeiter zeigten kürzlich, dass sich die Kupfer-katalysierte Cycloaddition im Zusammenspiel mit enzymvermittelter Proteinmodifizierung für die Herstellung von DNA-Protein-Konjugaten eignet (Schema 1h).^[70] Dabei nutzten sie das Enzym Protein-Farnesyl-Transferase (PFTase), um ein Azid-modifiziertes Isoprenoid spezifisch an eine kurze Erkennungssequenz zu binden, die dem POI gentechnisch angefügt wurde. Nach der Markierung durch die PFTase wurden die Azidogruppen mit Alkin-modifizierten Oligonucleotiden gekuppelt und DNA-Konjugate von fluoreszierenden Proteinen erhalten. In diesem Zusammenhang soll auch auf das große Potenzial des ortsspezifischen Einbaus nichtnatürlicher Aminosäuren mit chemisch adressierbarer Alkin- oder Azidfunktion in rekombinante Proteine^[71,72] für die Herstellung definierter DNA-Protein-Konjugate hingewiesen werden. Diesem Konzept folgend, wurde bereits ein DNA-Oligonucleotid durch spezifische Photovernetzung mit einem Protein gekuppelt, das die nichtnatürliche Aminosäure *p*-Benzoyl-L-phenylalanin enthielt. *p*-Benzoyl-L-phenylalanin wurde dabei durch ein artifizielles, orthogonales tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paar, das für ein Ambercodon decodiert, gentechnisch ins Protein eingefügt.^[73]

Die spezifische Kupplung von Proteinen und DNA ist auch auf rein enzymatischem Wege möglich. Tominga et al. verwendeten hierfür die mikrobielle Transglutaminase (MTG) aus *Streptomyces mobaraensis*, die einen Acyltransfer zwischen einem primären Amin und der γ -Carboxyamidgruppe einer Gln-Seitenkette in einem Peptid oder Protein katalysiert.^[74] Diese Reaktion verläuft mit guten Ausbeuten, wenn dem POI gentechnisch eine kurze, zusätzliche Peptidsequenz (Met-Lys-His-Lys-Gly-Ser) angefügt wird, die den Acylakzeptor Lys enthält. Als Acyldonor wirkt ein Oligonucleotid, das mit *N*-Carbobenzyloxyglutaminyglycin (Z-QG) modifiziert ist. So hergestellte DNA-Konjugate von eGFP (enhanced green fluorescent protein) und alkalischer Phosphatase wurden in DDI-Experimenten eingesetzt.^[74]

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Verwendung einer spezifischen enzymatischen Aktivität, die zu einer autokatalytischen Kupplung des Proteins selbst mit DNA-Oligonucleotiden führt. In einer frühen Arbeit gelang es Smith et al., mehrere Proteine auf einem linearen dsDNA-Fragment anzuordnen, indem sie die spezifische Bindung von DNA-(Cytosin-5)-Methyltransferasen an ihre Erkennungssequenzen innerhalb der dsDNA nutzten.^[75] Wird das synthetische Analogon 5-Fluorcytosin (^FC) anstelle von Cytosin in die Erkennungssequenz eingebaut, bildet sich eine kovalente Bindung zwischen der Transferase und der DNA. Durch Verwendung der beiden Methyltransferasen M.HhaI und M.MspI und ihrer jeweiligen Erkennungssequenz G^FCGC bzw. ^FCCGG konnten unterschiedliche, aber definierte Bereiche der linearen DNA adressiert werden. Da die Methyltransferasen gentechnisch mit anderen Bindungsdomänen oder POIs fusioniert werden können, sollten sich so auch Multiproteinkomplexe anordnen und aufbauen lassen.^[75,76]

Ein weiteres Protein, das sich autokatalytisch kovalent mit seinem Substrat verbindet, ist die humane O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT), die unter dem Namen

„SNAP-Tag“ von Johnsson und Mitarbeitern für Proteinfusionen entwickelt wurde.^[77,78] Die hAGT kann gentechnisch mit einem POI fusioniert und dann mit Benzylguanin-modifizierten DNA-Oligonucleotiden umgesetzt werden (Schema 1i). Besonders interessant ist bei dieser Methode, dass keine Aufreinigung des POI-SNAP-Tag-Konjugats vor der Kupplung mit der DNA nötig ist, wie durch die Herstellung verschiedener Einzelstrang-DNA(ssDNA)-Protein-Konjugate belegt werden konnte.^[79]

3. Anwendungen

Die Bioanalytik und die Herstellung biomolekularer Nanostrukturen sind die zwei Hauptanwendungsgebiete von DNA-Protein-Konjugaten in der aktuellen Forschung.

3.1. Bioanalytik

3.1.1. Sonden für die Nucleinsäure- und Proteindetektion

Da DNA-Protein-Konjugate aus zwei verschiedenen Makromolekülen bestehen, eignen sie sich für die Analyse von Nucleinsäuren wie auch von Proteinen (Abbildung 3).

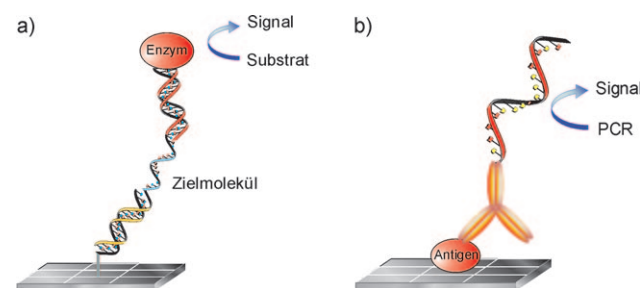


Abbildung 3. Verwendung von DNA-Protein-Konjugaten in analytischen Systemen. Sowohl der Nucleinsäure- als auch der Proteinanteil können genutzt werden: a) Ein Sandwich-Hybridisierungsassay, bei dem das im Konjugat vorhandene Protein ein Enzym ist und direkt als Reporter fungiert; b) eine Immunpolymerasekettenreaktion (IPCR), bei der das Protein ein Antikörper ist. Die daran gebundene DNA wird über PCR-Amplifikation detektiert.

Die ersten Anwendungen dieser Hybridmoleküle konzentrierten sich auf den Einsatz in nicht radioaktiven Hybridisierungsassays (Abbildung 3a). Dabei wurden Nucleinsäuren nachgewiesen, und zur katalytischen Amplifikation des Signals wurden alkalische Phosphatase (AP),^[80] Meerrettichperoxidase (HRP),^[81] β -Galactosidase,^[82] Lipasen^[83] oder Esterasen^[84] eingesetzt. Sano et al. beschrieben 1992 einen vollkommen neuartigen Assay, die Immuno-PCR (IPCR),^[85] die durch die Verwendung von DNA-Protein-Konjugaten den hoch empfindlichen Nachweis von Proteinen und anderen Antigenen ermöglicht. Wie in Abbildung 3b zu sehen, handelt es sich bei der IPCR um eine Abwandlung des Standard-ELISA-Nachweisverfahrens (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay). Allerdings wird bei der IPCR als Signal die Nucleinsäure des DNA-Protein-Konjugats durch PCR amplifiziert, wodurch das Signal nahezu exponentiell ver-

stärkt wird, was die IPCR 1000- bis 10000-mal empfindlicher macht als ein analoges ELISA-System. Dementsprechend ist dieser Immunassay sehr interessant für Anwendungen in der klinischen Diagnostik und für die biomedizinische Forschung.^[48,86–88] Kürzlich wurde von Landegren und Mitarbeitern eine verwandte Methode entwickelt: die Proximity-Ligation, die ebenfalls auf DNA-Antikörper-Konjugaten beruht.^[89] Dabei werden Oligonucleotide, die an zwei verschiedenen Antikörpern befestigt sind, miteinander ligiert, falls ein bestimmtes Zielprotein vorliegt, das die beiden DNA-Antikörper-Konjugate in räumliche Nähe bringt. Das ligierte DNA-Molekül kann anschließend per PCR oder Rolling-Circle-Amplifikation vervielfältigt werden. Diese Methode eignet sich auch für die Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Zellen. Grundsätzlich ist für alle diese Immunassays eine effiziente Verknüpfung von DNA-Markern und Antikörpern essenziell. Zwar wurde auch eine kovalente Konjugation mithilfe einer Maleinsäureimidkuppelung beschrieben,^[48] allerdings werden die signalgebenden Konjugate häufig *in situ* durch die Wechselwirkung von (Strept-)Avidin und Biotin generiert.^[88]

3.1.2. Biochips

Dank der Verfügbarkeit und hohen physikochemischen Stabilität von Nucleinsäuremolekülen lassen sich DNA-Mikroarrays mittlerweile industriell herstellen und finden vielfältige Anwendungen in der Genom- und Biomedizinforschung.^[90,91] Schwierig ist hingegen die Herstellung von Mikroarrays empfindlicher Proteine (wie Rezeptoren und regulatorische Proteine) durch Immobilisierung auf chemisch aktivierten Oberflächen, da die Proteine bei diesem Prozess leicht denaturieren können.^[61] Die DNA-vermittelte Immobilisierung (DDI) von DNA-Protein-Konjugaten an DNA-Mikroarrays bietet hier eine milde Methode zur parallelen Positionierung mehrerer empfindlicher Proteine an einer Oberfläche (Abbildung 4).^[12,47] Die DDI-Methode nutzt dabei die hohe Spezifität der Watson-Crick-Basenpaarung komplementärer Oligonucleotide, wobei eines als Marker am zu immobilisierenden Protein gebunden ist, während das andere an der Oberfläche fixiert ist und so als spezifisches Fängermolekül wirkt. Bei DDI-Anwendungen erfolgt die laterale Oberflächenstrukturierung auf Grundlage stabiler Nucleinsäuren, sodass die resultierenden DNA-Mikroarrays fast unbegrenzt haltbar sind. Erst unmittelbar vor der Verwendung werden die Mikroarrays mit den DNA-Protein-Konjugaten funktionalisiert, um z.B. als Biochip in einem Immunassay eingesetzt zu werden.^[55,92–95] Ein besonderer Vorteil der DDI liegt darin, dass die Proteine ihre biologische Aktivität behalten, da sie durch eine kurze dsDNA-Brücke und nicht durch kovalente oder nichtkovalente Kontakte direkt mit der Oberfläche verbunden sind, wodurch sie konformativ eingeschränkt sein und (teilweise) denaturiert werden können. Nach der Verwendung kann ein DDI-basiertes Array sogar durch alkalische Denaturierung der dsDNA-Helix regeneriert werden.^[35,96,97]

Gegenüber der heterogenen Immunsorption an Festphasen ist die Verwendung DDI-basierter Mikroarrays bei der Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen vor-

teilhaft, da die intermolekulare Bindung zwischen Zielantigen und Antikörper auch in Lösung erfolgen kann und damit wesentlich effizienter ist. Die so gebildeten Immunkomplexe werden anschließend durch Nucleinsäurehybridisierung ortsspezifisch auf dem Mikroarray immobilisiert.^[55,92] Das DDI-Prinzip wurde auch im Bereich der funktionellen Proteomforschung angewendet, um Bindeereignisse zwischen einer Bibliothek niedermolekularer organischer Verbindungen und Proteinen zu detektieren.^[98–103] Dazu wurden die Moleküle mit PNA-Oligomeren konjugiert. Das Molekül kann in Abhängigkeit vom Reaktionsmechanismus an das Protein binden und so zwischen aktivem und inaktivem Protein unterscheiden. Anhand der Sequenz des PNA-Teils, die durch Hybridisierung an einen Oligonucleotid-Mikroarray ausgelesen werden kann, lässt sich das jeweils angehängte Molekül identifizieren. Die grundsätzliche Anwendbarkeit des Systems wurde mithilfe spezifischer Inhibitoren der Cathepsine^[98] und der Caspase^[99] getestet. Anschließend konnten auf diesem Wege neue proteolytische Aktivitäten in Extrakten aus Hausmilben identifiziert werden.^[101]

Die DDI-Methode hat auch im Bereich der In-vitro-Evolution von Proteinen Anwendungen gefunden. Zwei Forschungsgruppen haben dafür Nucleinsäuren *in situ* kovalent mit Proteinen gekuppelt, z.B. mit Einzelketten-Antikörperfragmenten.^[104,105] Das Prinzip beruht auf der In-vitro-Translation von mRNA, die an ihrem 3'-Ende kovalent mit Puromycin modifiziert ist. Durch das Peptidylakzeptor-Antibiotikum Puromycin wird die mRNA am Ribosom mit der Polypeptidkette verknüpft. Dadurch wird die genetische Information (mRNA) mit ihrem Produkt (Polypeptid) kovalent zu einem Hybridkonjugat verknüpft. Dieser Ansatz eignet sich sowohl für Hochdurchsatzanalysen von Peptid- und Proteinbibliotheken als auch für die Herstellung von Proteinmikroarrays.^[106] In einem ähnlichen Ansatz wurde auch das SNAP-Tag-System eingesetzt, um mithilfe einer kovalenten Genotyp-Phänotyp-Kupplung die Selektion von Proteinen, die von einer DNA-Bibliothek exprimiert wurden, zu ermöglichen.^[107]

Weitere aktuelle DDI-Anwendungen zur Herstellung von Bioarrays mit lebenden Zellen,^[62–64,108,109] sowie zahlreiche Studien, in denen Nichtprotein-komponenten immobilisiert wurden, belegen die vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten dieser Methode.^[110]

3.2. Nanofabrikation

3.2.1. Statistische Bildung von Streptavidin-Netzwerken

Einen einfachen Zugang zu funktionellen DNA-Protein-Nanostrukturen bietet die Selbstassemblierung von STV und doppelt biotinylierten dsDNA-Fragmenten.^[111] Diese zweibindigen dsDNA-Oligomere können vierbindige STV-Moleküle miteinander verknüpfen und so ein Netzwerk bilden. AFM zeigt, dass in solchen Netzwerken die STV-Moleküle hauptsächlich mit zwei dsDNA-Molekülen verknüpft sind (Abbildung 5a). Da drei- und vielfach verknüpfte STV-Moleküle wesentlich seltener vorkommen, haben diese Nanostrukturen noch eine große verbleibende Biotinbindefähigkeit, die eine weitere Funktionalisierung mit anderen bio-

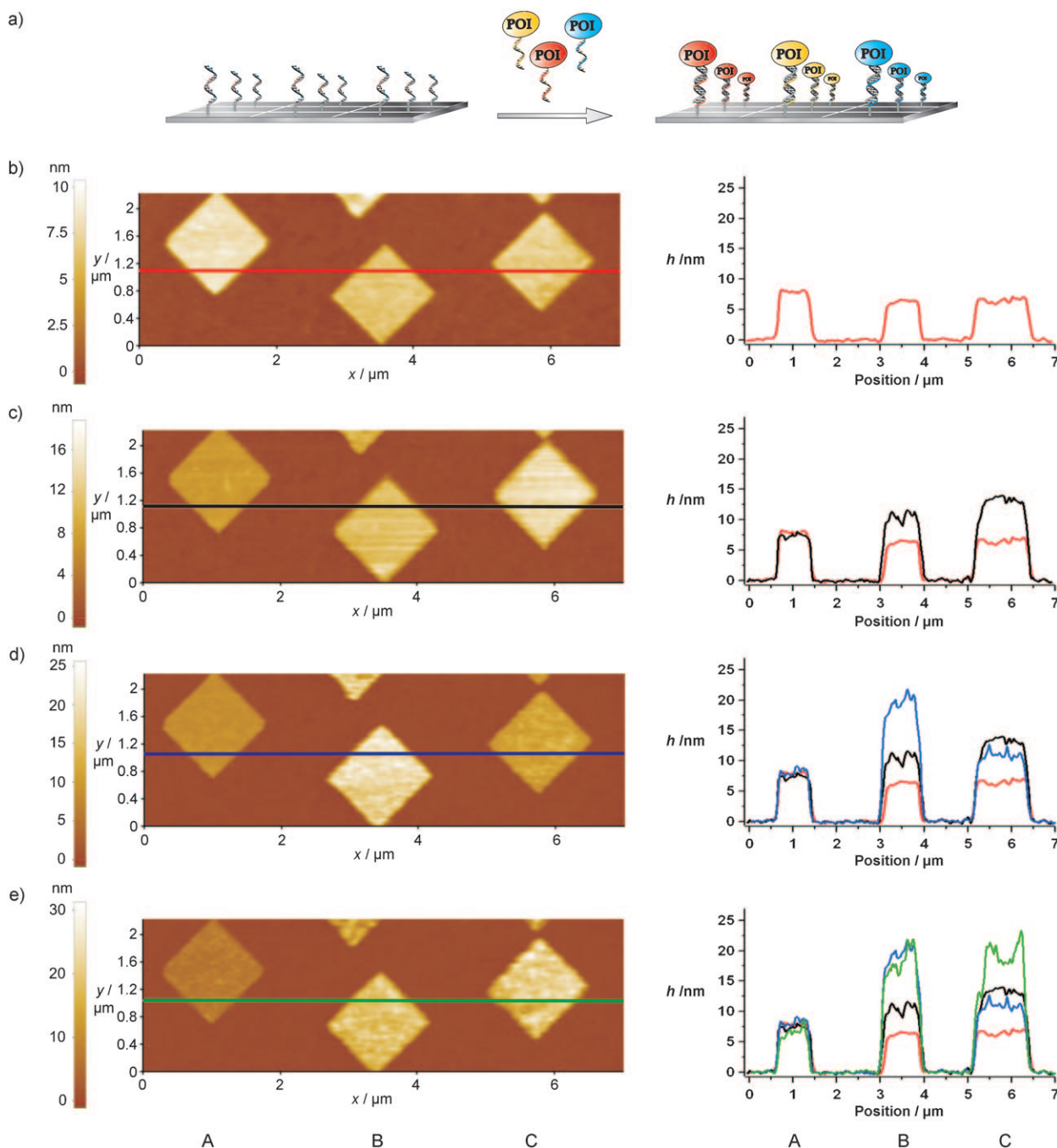


Abbildung 4. DDI von Proteinen auf Oberflächen. a) Schematische Darstellung und b)–e) Anwendung der DDI in der Serum-Immundiagnostik mithilfe einer Anordnung aus ssDNA-haltigen Feldern, die durch Nanopropfen hergestellt wurde.^[94] Die topografischen AFM-Aufnahmen und die zugehörigen Höhenprofile wurden erhalten von ssDNA-Feldern aus drei verschiedenen Oligonucleotiden (rote Linie in b), nach Inkubation mit einer Lösung von ssDNA-STV- (komplementär zu Feld B) und ssDNA-Gox-Konjugaten (komplementär zu Feld C; schwarze Linie in c) und anschließender Inkubation mit Humanserum, das Antikörper gegen STV (blaue Linie in d) und GOx (grüne Linie in e) enthält. Die Höhenzunahme zeigt die spezifische Immobilisierung der Komponenten in allen Bindungsschritten an. Wiedergabe aus Lit. [94] mit Genehmigung.

tinylierten Komponenten ermöglicht. So lassen sich z.B. durch die Zugabe von biotinylierten Antikörpern funktionelle Komplexe erzeugen, die sich sehr gut für IPCR-Anwendungen eignen.^[87,88,111] Da diese oligomeren Netzwerke in ihrer Größe, Konnektivität und Topographie DNA-verknüpften Netzwerken aus Nanopartikeln ähneln,^[112] eignen

sie sich auch als Modellsysteme für die Entwicklung grundlegender Techniken zur Immobilisierung und Charakterisierung solcher Partikel.^[113] Zum Beispiel lassen sich die DNA-Fragmente in diesen Netzwerken durch die Gegenwart von Ionen beeinflussen. Damit ließen sich schaltbare Aggregate aus Nanopartikeln entwickeln (Abbildung 5a),^[113] die als

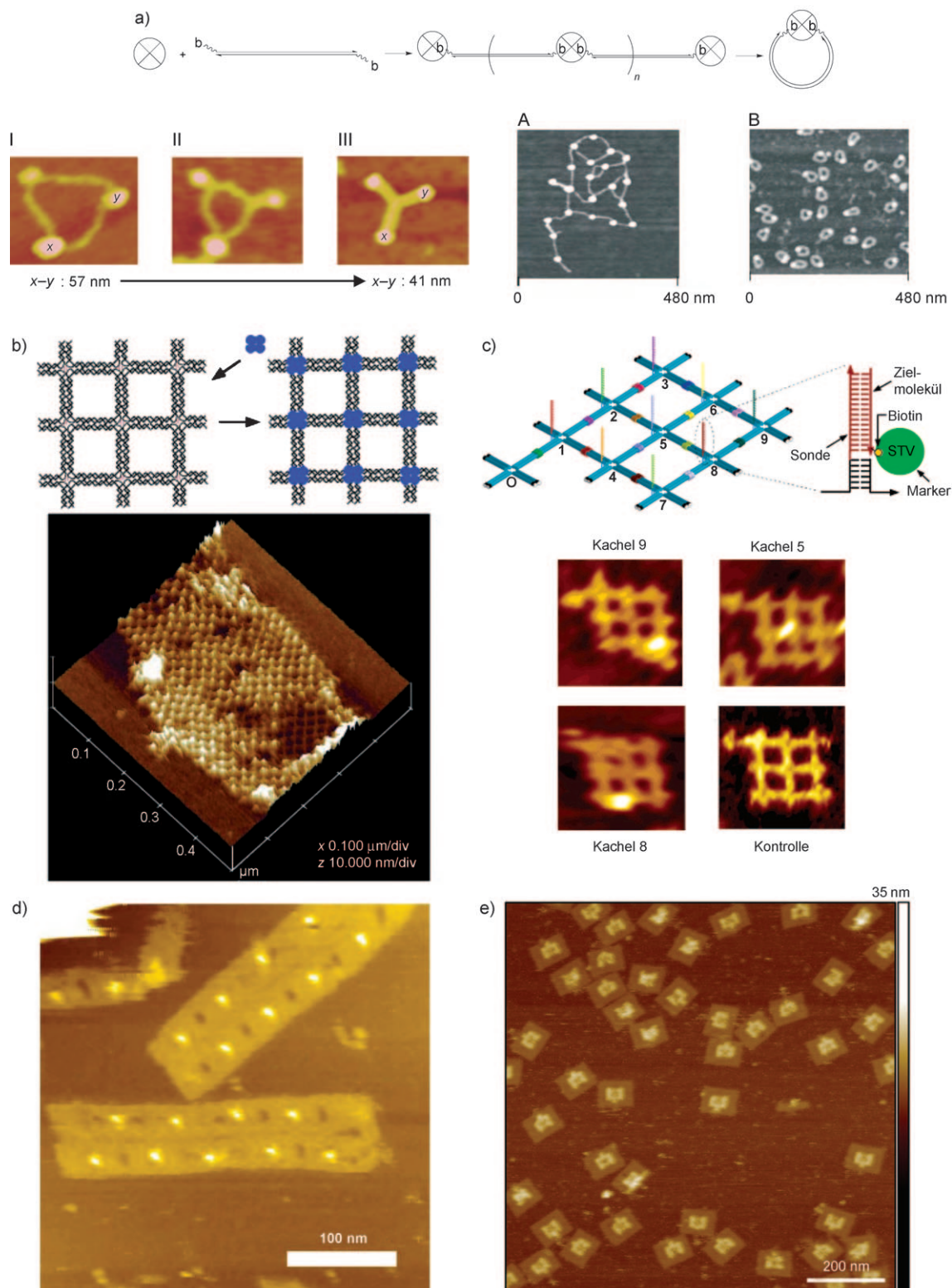


Abbildung 5. DNA-STV-Nanostrukturen. a) Statistische Bildung von dsDNA-STV-Konjugat-Netzwerken aus 5',5'-bisbiotinylierter DNA und STV; b = Biotin. Die Struktur ist vereinfacht dargestellt, da ein Teil der STV-Moleküle als drei- oder vierbindige Brücke zwischen benachbarten dsDNA-Fragmenten wirkt (siehe AFM-Aufnahme A). Die dsDNA-STV-Netzwerke können durch thermische Behandlung in dsDNA-STV-Nanoringe umgewandelt werden (siehe AFM-Aufnahme B).^[114] Die AFM-Aufnahmen links im Bild zeigen die Strukturveränderungen von DNA₃-STV₃-Elementen bei steigender Ionenstärke.^[113] Dabei verringert sich der relative Abstand der Proteinpartikel durch superhelicale Verdrehung der DNA-Brücken. Die Zustände I, II und III wurden bei niedriger, mittlerer bzw. hoher Salzkonzentration beobachtet. b) Zweidimensionales Nanoarray von oligomeren 4 × 4-DNA-Kacheln mit Biotineinheiten für die Bindung von STV (blaues Tetramer). c) Wiedergabe aus Lit. [120] mit Genehmigung. d) Bindung einzelner STV-Moleküle auf finiten Nanoarrays aus neun 4 × 4-Kacheln. Die AFM-Aufnahmen zeigen die spezifische Bindung der Proteine an die erwarteten Kacheln. In der Kontrollreaktion wurden die Arrays mit biotinylierten Zielmolekülen inkubiert, die zu keiner Kachel komplementär waren. Wiedergabe aus Lit. [123] mit Genehmigung. Weitere mithilfe der Origamitechnik aufgebaute, STV-modifizierte DNA-Überstrukturen sind in (d)^[131] und (e)^[133] gezeigt.

Modellsysteme für funktionelle Nanomaterialien mit kontrollierbaren Partikelabständen oder Zugangsmöglichkeiten für Enzyme dienen.

Diese auf zufällige Weise gebildeten dsDNA-STV-Netzwerke können außerdem problemlos durch Erhitzen und rasches Abkühlen in definierte supramolekulare DNA-STV-Nanoringe (Abbildung 5a) umgewandelt werden.^[114] Da diese Nanostrukturen einfach zu bilden sind und über eine definierte Stöchiometrie und Struktur verfügen, können sie nach der Funktionalisierung mit biotinylierten Haptene als Reagentien in der kompetitiven IPCR eingesetzt werden. Solche IPCR-Assays zeigen eine tausendmal niedrigere Nachweisgrenze als herkömmliche ELISA-Methoden.^[115] Darüber hinaus können STV-Moleküle mit kovalent gekuppelter ssDNA in diese Netzwerke integriert werden, wodurch sich weitere Funktionsmoleküle durch spezifische Hybridisierung einbauen lassen.^[12] dsDNA-STV-Nanostrukturen könnten auch als biomolekulare Metallisierungstemplate genutzt werden. Bei dieser von Braun und Mitarbeitern entwickelten Methode werden die elektrostatischen und topographischen Eigenschaften von supramolekularen DNA-Protein-Komplexen für das Wachstum metallischer Nanostrukturen genutzt.^[116,117] Weiterhin können dsDNA-STV-Nanostrukturen als Standards für die AFM-Untersuchung der Topographie weicher Materialien dienen,^[118] da die beiden Biopolymere DNA und Protein in sehr charakteristischer, definierter, supramolekularer Struktur vorliegen. Damit ist es z. B. möglich, die Deformationseigenschaften der Biopolymere in Abhängigkeit vom Detektionsmodus der AFM-Untersuchung zu bestimmen.^[118]

3.2.2. Rational entworfene DNA-Nanoarrays

Dank der bahnbrechenden Arbeiten Seemans^[5] ist der Aufbau von DNA-Überstrukturen mit definierten Struktureigenschaften im Nanometerbereich heutzutage gut etabliert.^[8–11] Um die Verwendungsmöglichkeiten und die Anwendbarkeit solcher DNA-Nanoarrays zu erweitern, wird intensiv daran gearbeitet, solche selbstorganisierten DNA-Überstrukturen durch die Einbindung von Proteinen mit zusätzlichen Funktionen auszustatten. Während der Aufbau linearer, eindimensionaler DNA-Protein-Konjugate bereits in den 1990er Jahren demonstriert wurde,^[47,119] gelang die Modifizierung zweidimensionaler Arrays mit Proteinen erst vor kurzem. In einer der ersten Untersuchungen zeigten Yan et al., dass sich ausgehend von so genannten 4 × 4-DNA-Kacheln ausgedehnte zweidimensionale biotinmodifizierte Gitter herstellen lassen, die in STV-Arrays überführt werden können (Abbildung 5b).^[120] Die Kupplung mithilfe von Biotin wurde auch in weiteren Arbeiten genutzt, um Arrays aus STV und STV-modifizierten Nanopartikeln^[121,122] oder sogar finite Nanoarrays herzustellen. Auf den letztgenannten können individuelle Proteine wie auf einer molekularen Stecktafel positioniert werden (Abbildung 5c).^[123,124] Da STV allerdings außer seiner hohen Affinität für Biotin keine weitere Funktion hat, dienen diese Arbeiten hauptsächlich der grundlegenden Untersuchung der Umsetzbarkeit rationaler Konstruktionskonzepte im Bereich der DNA-Nanotechnologie.

Um die Anwendungsmöglichkeiten der Nanoarrays auf den Bereich der Biosensorik zu erweitern, verwendeten Yan und Mitarbeiter ähnliche Strategien zum Aufbau von Nanoarrays mit Aptamermotiven. Diese Arrays waren so in der Lage, selektiv Zielproteine zu binden.^[125–128] Durch diesen Ansatz wurde es auch möglich, Nanoarrays mit mehreren unterschiedlichen Proteinen, z. B. Thrombin und Wachstumsfaktoren, herzustellen.^[128] Durch die Einführung von niedermolekularen Erkennungsgruppen wie Haptene (siehe Abschnitt 2.1.3)^[25] oder Peptiden^[129] konnte auch die Bindung von Antikörpern an DNA-Nanostrukturen untersucht werden. Dieser Ansatz beruhte auf der ortsspezifischen Hybridisierung von DNA-Peptid-Konjugaten an definierte ssDNA-Bereiche innerhalb der Nanoarrays. Die entstandene Struktur konnte anschließend für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen genutzt werden.^[129]

DNA-Gerüste, die mit der so genannten DNA-Origamimethode von Rothemund^[130] aufgebaut werden, bieten weitere Möglichkeiten für die Herstellung von Protein-Nanoarrays. So nutzen Kuzuya et al. die Origamitechnik, um gelochte DNA-Nanofolien herzustellen, die definiert angeordnete Vertiefungen von 7 × 12 × 2 nm enthielten. Durch zwei Biotineinheiten innerhalb dieser Vertiefungen konnten dort einzelne STV-Moleküle immobilisiert werden (Abbildung 5d).^[131] Die Origamitechnik ermöglicht eine deutlich bessere Kontrolle über die Fixierung^[131] als frühere Methoden, bei denen STV in den Vertiefungen linearer Arrays aus so genannten Neun-Helix-DNA-Kacheln immobilisiert wurde.^[132] In weiteren aktuellen Beispielen wurden Origaminanostrukturen mit integrierten NTA-Gruppen genutzt, um Oligohistidin-markierte, fluoreszierende Proteine zu binden^[19] oder mehrere STV-Moleküle definiert an einem Origamielement anzuordnen, das 24 biotinylierte Stapelstränge enthielt (Abbildung 5e).^[133] Auch konnte gezeigt werden, dass sich biotinmodifizierte Polyamide sequenzspezifisch an DNA-Nanoarrays anlagern können und so zur Positionierung von STV-Molekülen an vorbestimmten Stellen des Arrays verwendet werden können.^[134,135] Diese Vorgehensweise sollte auch für DNA-Nanostrukturen anwendbar sein, die mithilfe der Origamitechnik aufgebaut wurden.

Es lassen sich aber nicht nur DNA-Nanostrukturen als Template für die Positionierung von Proteinen einsetzen – umgekehrt können auch Proteine genutzt werden, um gegebene DNA-Nanostrukturen zu modifizieren. Dieser Ansatz eröffnet faszinierende Möglichkeiten: Außer dem Schützen der DNA vor Metallabscheidung (siehe Abschnitt 3.2.1)^[117] lässt sich z. B. auch eine nanomechanische Einheit konstruieren, die auf die Gegenwart des Proteins *E. coli* integration host factor (IHF) als Stimulus reagiert, wie Seeman et al. zeigten. Der IHF beeinflusst die Topologie der DNA, und folglich ändert die entsprechende Nanostruktur in der Gegenwart von IHF ihre Form.^[136] Eine weitere eindrucksvolle Arbeit stammt von Turberfield et al., die das Protein RuvA nutzten, um bestimmte Konformationsisomere in DNA-Nanoarrays zu induzieren und zu stabilisieren.^[137] RuvA ist ein Protein, das die viersträngigen DNA-Strukturen der so genannten Holliday-Strukturen (Holliday junctions) bindet. Die Holliday-Struktur ist ein wichtiges Intermediat der genetischen Rekombination. Turberfield und Mitarbeiter konnten

durch Transmissionselektronenmikroskopie zeigen, dass die Zugabe von RuvA während der Selbstorganisation von zweidimensionalen Nanokristallen sowohl deren Gittersymmetrie als auch die Verknüpfung der Elemente deutlich beeinflusst.

3.2.3. Adressierung und Kaskadierung von Enzymen

DNA-Nanoarchitekturen fanden auch Verwendung zur Modulierung der Proteinfunktion und der Zugänglichkeit von Proteinen. So konstruierten Turberfield und Mitarbeiter einen stabilen tetraedrischen DNA-Käfig, der ein einzelnes Cytochrom-*c*-Molekül enthält.^[138] Zu diesem Zweck wurde das Protein kovalent mit einem der vier Oligonucleotide verknüpft, aus denen der DNA-Käfig aufgebaut ist. Die Autoren konnten zeigen, dass der Erfolg der Einkapselung des Proteins von seinem Verknüpfungspunkt entlang einer Tetraederkante abhängt (Abbildung 6). Dieses Phänomen konnte durch die Analyse der elektrophoretischen Mobilität eindeutig demonstriert werden und deckt sich mit der erwarteten, helical veränderten Position der Anbindung des Proteins an die Tetraederkante. Nach Meinung der Autoren könnten DNA-Käfige, deren Seiten sich ausdehnen oder definiert geöffnet werden können, genutzt werden, um die

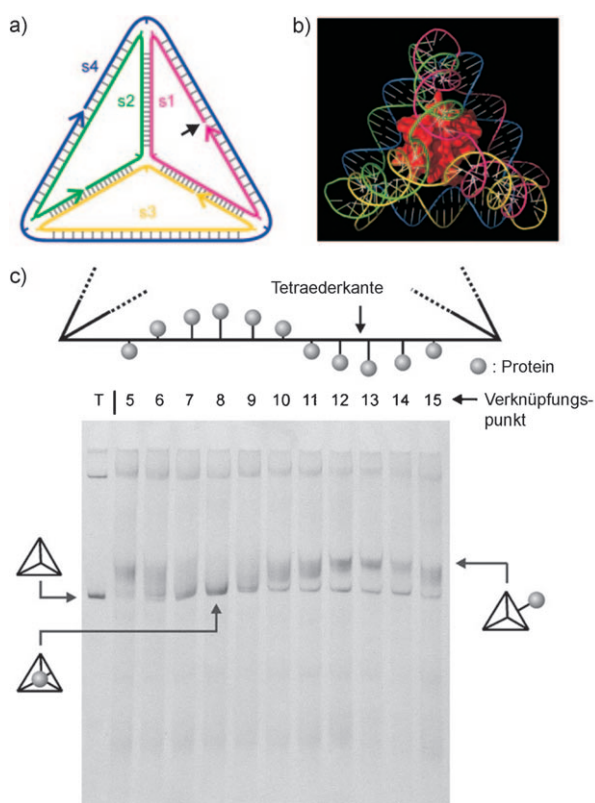


Abbildung 6. Einkapselung eines einzelnen-Cytochrom-*c*-Proteins in einen tetraedrischen DNA-Käfig. a) Vier Oligonucleotide wurden für den Aufbau des Tetraeders genutzt; b) das Molekülmodell zeigt, dass im Tetraeder genügend Platz für ein Cytochrom-*c*-Protein ist; c) gelelektrophoretische Analyse der Einkapselungseffizienz. Das im Käfig liegende Protein bewirkt eine höhere elektrophoretische Mobilität. Wiedergabe aus Lit. [138] mit Genehmigung.

Funktion des eingeschlossenen Proteins zu steuern. So ließen sich möglicherweise apoptotische Proteasekaskaden initiieren.^[138]

Am Beispiel von DNA-Protein-Konjugaten, die durch Kofaktor-Rekonstitution hergestellt wurden, zeigt sich deutlich, wie die Enzymfunktion durch die Kupplung mit DNA verändert werden kann (siehe Abschnitt 2.1.5). Solche Hybridmoleküle, die aus Myoglobin (Mb)^[32] oder Meerrettichperoxidase (HRP)^[33] hergestellt wurden, zeigen eine deutlich veränderte katalytische Aktivität gegenüber jener der nativen Proteine. Im Fall von Mb erhöht das recht sperrige und stark geladene Oligonucleotid in direkter Nachbarschaft zum aktiven Zentrum die katalytischen Eigenschaften des Proteins deutlich.^[33] Interessanterweise hängt dieser Effekt stark von der Sequenz des verwendeten Oligonucleotids ab, wodurch ein genaues Einstellen der Enzymeigenschaften eines solchen Hybridmoleküls möglich wird.^[139] Erst kürzlich wurde Mb außerdem mit einem synthetischen Hämderivat rekonstituiert, das ein Oligonucleotid und ein photoaktivierbares Ru³⁺-Fragment enthält.^[140] Das entstandene Hybridenzym zeigte eine lichtabhängige Peroxidaseaktivität und spezifische Nucleinsäurehybridisierung. Somit war es möglich, den Katalysator durch selektive Hybridisierung an einer festen Phase zu immobilisieren und damit aus der Reaktionslösung wiederzugewinnen.

Die DNA-vermittelte Organisation von Enzymen kann außerdem verwendet werden, um artifizielle Multienzymkonstrukte mit einem hohen Maß an Kontrolle über die räumliche Anordnung der Einzelkomponenten herzustellen. In biologischen Systemen wurde für Multienzymkomplexe ein mechanistischer Vorteil bei über mehrere Stufen verlaufenden katalytischen Transformationen gefunden, der aus der Tatsache herrührt, dass Reaktionen, bei denen die Substratdiffusion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, durch die direkte Nachbarschaft der katalytischen Zentren beschleunigt werden. Außerdem verhindert das so genannte Substrat-Channeling von Intermediaten das Auftreten von unerwünschten Nebenreaktionen. In einer frühen Arbeit zu Multienzymkomplexen wurden Oligonucleotid-modifizierte Hybride verwendet, deren Proteinteil aus einer Luciferase und einer Oxidoreduktase besteht.^[141] Die Oxidoreduktase katalysierte die Reduktion von Flavinmononucleotid, das von der Luciferase genutzt wird, um ein optisch auslesbares Signal zu produzieren. Die Konjugate wurden mithilfe von komplementärer DNA zu einem Dienzymsystem vereint (Abbildung 7a). Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Gesamtzymaktivität von der absoluten wie auch der relativen räumlichen Orientierung der beiden Enzyme abhängt. Vor kurzem wurden Oligonucleotidkonjugate der Glucose-Oxidase (GOx) und von HRP verwendet, um Dienzymkomplexe mit verschiedenen räumlichen Anordnungen der Proteine zu realisieren.^[142] Kinetische Analysen der gekoppelten Reaktion von Glucoseoxidation und Peroxidation des fluorogenen Farbstoffs Amplex Red zeigten einen signifikanten Anstieg der Reaktivität der Komplexe, in denen GOx und HRP in direkter Nachbarschaft auf einem Träger-DNA-Oligonucleotid immobilisiert wurden.

Willner und Mitarbeiter untersuchten ebenfalls den Effekt der DNA-Organisation auf das Dienzymsystem aus

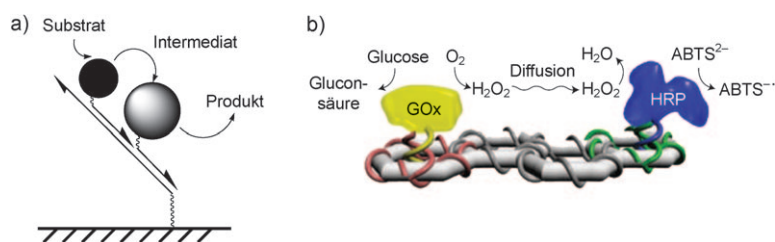


Abbildung 7. Aufeinander folgende Enzymkatalyseschritte bei einem DNA-Protein-Komplex. a) Oberflächenimmobilisiertes Zwei-Enzym-System, wie mit Oxidoreduktase/Luciferase^[141] oder GOx/HRP^[142] untersucht; b) die direkte Organisation des GOx/HRP-Systems auf zweidimensionalen, hexagonalen DNA-Überstrukturen^[143] zeigt deutlich höhere Effekte durch die Nachbarschaft der Enzyme als in (a). Wiedergabe aus Lit. [145] mit Genehmigung.

GOx und HRP.^[143,144] In einer dieser Studien waren die Enzyme auf einer linearen Träger-DNA immobilisiert, die durch Rolling-Circle-Amplifikation (RCA) hergestellt worden war. Dabei war keine Aktivierung der Enzymkaskade bei Fehlen des nötigen DNA-Templats oder in Gegenwart einer fremden DNA möglich.^[144] In einer anderen Studie wurden die Enzyme an die Gelenkregionen eines zweidimensionalen DNA-Gerüsts gekuppelt, das aus DNA-Streifen mit zwei oder vier Sechseckstrukturen bestand (Abbildung 7b).^[143] Die Enzymkaskade lief nur in Gegenwart des DNA-Templats effektiv ab. In diffusionskontrollierter, homogener Lösung derselben Komponenten konnte keine Kaskadenreaktion detektiert werden, ebenso wenn nicht-komplementäre DNA aus Kalbs-Thymusgewebe zugegeben wurde. Schon länger ist akzeptiert, dass Untersuchungen von Enzymkaskaden nicht nur für die Erforschung von Abstandseffekten auf biochemische Reaktionen wichtig sind, sondern auch die Entwicklung neuer Katalysatoren für die enzymbasierte Prozesstechnologie ermöglichen könnten.^[12] Die jüngsten Entwicklungen lassen hoffen, dass die Verknüpfung der Adressierbarkeit von DNA-Strukturen mit der Funktionsvielfalt von Proteinbibliotheken zur Entwicklung von dynamischen und funktionellen biomolekularen Netzwerken führen wird, die auf Selbstorganisation beruhen.^[145]

3.2.4. Funktionalisierung von Nanopartikeln

Im Zusammenhang mit synthetischen Nanosystemen und den Materialwissenschaften haben die Fortschritte bei der DNA-vermittelten Organisation von Halbleiter- und Metallnanopartikeln^[3,112,146–148] dazu geführt, dass DNA-Protein-Konjugate zunehmend für die Modifizierung und Einführung von funktionellen Gruppierungen auf Partikeloberflächen angewendet werden. So wurden z. B. ssDNA-STV-Konjugate an biotinylierte Goldcluster gebunden, wodurch diese hierarchisch in supramolekulare, bio-metallische Nanostrukturen organisiert werden konnten (Abbildung 8a).^[119] Dank des modularen Aufbaus dieser Systeme können funktionelle Proteine, wie Immunglobuline, einfach in diese Nanostrukturen integriert werden. So können dann wiederum die komplementären Antigene gebunden werden.^[119] Mithilfe der DNA-vermittelten Immobilisierung von ssDNA-markierten Antikörpern auf DNA-modifizierten Goldnanopartikeln (DNA-AuNPs) konnten auf diese Weise auch Rea-

gentien für Immunassays hergestellt werden.^[149,150] In solchen Hybridpartikeln (Abbildung 8b) sind die Proteine durch eine stark hydratisierte Schicht aus dsDNA von der Metalloberfläche getrennt. Dies minimiert die Gefahr der (teilweisen) Proteindenaturierung, die besonders im direkten Kontakt mit Oberflächen zu beobachten ist. Darüber hinaus ermöglicht es der modulare, nichtkovalente Aufbau solcher Partikel, ssDNA-STV-Konjugate als universelle Adapter für beliebige biotinylierte Proteine zu integrieren. Bindungsereignisse lassen sich einfach visualisieren, da das Goldpartikel eine reduktive

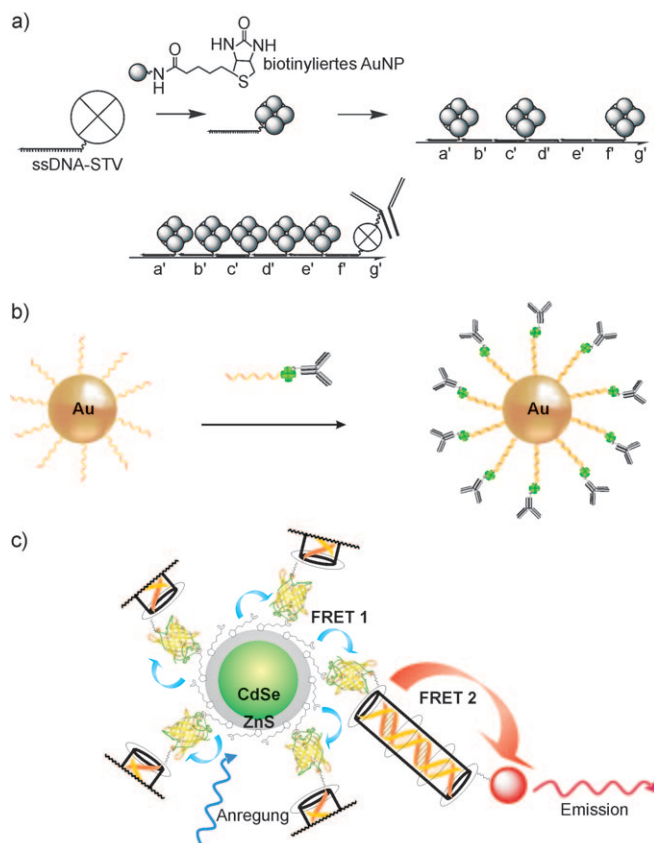


Abbildung 8. Funktionalisierung von Nanopartikeln mit DNA-Protein-Konjugaten: a) Hierarchischer Aufbau von bio-metallischen Nanostrukturen aus biotinylierten 1.4-nm-Goldnanopartikeln (AuNPs). AuNPs wurden mit kovalenten ssDNA-STV-Konjugaten gekuppelt und diese AuNP-beladenen Proteine zu den endgültigen Nanostrukturen organisiert.^[119] Das darunter abgebildete Konstrukt enthält einen biotinylierten Antikörper, der die spezifische Bindung an ein Antigen ermöglicht. b) DNA-vermittelte Immobilisierung von ssDNA-Antikörper-Konjugaten auf kolloidalen DNA-modifizierten Goldnanopartikeln (DNA-AuNPs).^[149] Die ssDNA-STV-Konjugate ermöglichen in diesem Beispiel eine maximale Flexibilität im modularen Aufbau der Reagentien für Immunassays.^[95] c) Ein auf DNA-Protein-Konjugaten basierendes FRET-System mit drei Chromophoren. Nach der Bindung des ssDNA-EYFP-Konjugats an Halbleiterkolloide durch elektrostatische Wechselwirkungen wurde ein Farbstoff-modifiziertes, komplementäres Oligonucleotid durch DNA-Hybridisierung immobilisiert.^[157] Der Einfachheit halber ist lediglich ein DNA-Fragment als Zylinder abgebildet. Dieser illustriert, dass der Donor-Akzeptor-Abstand durch die Helizität der DNA gesteuert werden kann.

Silberabscheidung katalysiert.^[149,150] Damit lassen sich sehr geringe Mengen immobilisierter Antikörper auf Chipoberflächen ortsaufgelöst detektieren.^[95]

Für eine reversible Immobilisierung von DNA-Protein-Konjugaten auf DNA-AuNPs^[151] wurde die oben beschriebene Strategie für die Oberflächenmodifizierung der Partikel mit dem Konzept der Strangverdrängung kombiniert, das ursprünglich zur Herstellung von nanomechanischen DNA-Anordnungen entwickelt worden war.^[152,153] Um die DNA-vermittelte Bindung und das Ablösen der Konjugate von der Partikeloberfläche zu detektieren, wurden Konjugate aus ssDNA und dem fluoreszierenden Protein EYFP verwendet.^[151] Beide Prozesse können problemlos über die Fluoreszenzemission von EYFP verfolgt werden, da diese bei der Bindung an die Goldnanopartikel gelöscht wird. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass DNA-Konjugate von fluoreszierenden Proteinen (FPs) als Bausteine zur Herstellung von lichtadressierbaren Funktionseinheiten in Betracht kommen. Solche Modellsysteme eignen sich möglicherweise sogar zur Nachbildung und Untersuchung grundlegender Bestandteile der Photosynthesemaschinerie lebender Zellen. Dank der raschen Fortschritte in der Molekular- und Zellbiologie ist heute eine breite Palette an FPs verfügbar, deren spektroskopische Eigenschaften das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts abdecken.^[154] Konjugate der FPs mit DNA-Oligonucleotiden können daher auch als Bausteine für den rationalen Aufbau supramolekularer Komplexe mit mehreren (biologischen) Chromophoren dienen. Die DNA-vermittelte Organisation dieser Chromophore ermöglicht deren räumlich präzise Ausrichtung, sodass Systeme entstehen, in denen ein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) möglich ist. Dieser kann durch zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie und Einzelmolekülspektroskopie analysiert werden.^[150,155] Weiterhin wurden FPs eingesetzt, um lumineszierende Halbleiternanopartikel zu funktionalisieren. So entstanden aus den oft auch als Quantenpunkte (quantum dots, QDs) bezeichneten Partikeln FRET-Systeme, die als photonische Komplexe oder bei der Erforschung grundlegender spektroskopischer Phänomene Verwendung finden.^[156,157] Ein Beispiel für die Nutzung von DNA-Protein-Konjugaten bei der Untersuchung von QD-FP-FRET-Systemen ist in Abbildung 8c dargestellt. In diesem Fall wurde das ssDNA-EYFP-Konjugat durch elektrostatische Wechselwirkungen an CdSe/ZnS-QDs immobilisiert.^[157] Durch Hybridisierung eines mit einem organischen Farbstoff modifizierten komplementären Oligonucleotids entstand ein FRET-System aus drei Chromophoren, in dem der Donor-Akzeptor-Abstand durch die helicale Form der DNA präzise definiert ist. Damit war es möglich, die FRET-Prozesse im Detail durch stationäre und zeitaufgelöste Photolumineszenzmessungen zu untersuchen. Hierbei wurde festgestellt, dass die supramolekularen FP-QD-Komplexe einen sehr guten Donor darstellen, der die Vorteile von QDs (hohe Absorption über einen breiten Wellenlängenbereich) und von EYFP (hohe Quantenausbeute) in sich vereint; so werden auch FRET-Prozesse über eine Distanz von bis zu 13 nm möglich.^[157] Die hier erwähnten Systeme mit DNA-modifizierten FPs können daher als erste Beispiele für photonische Komplexe betrachtet werden.

3.2.5. Sonstiges

In den Nanowissenschaften gibt es weitere Anwendungen für DNA-Protein-Konjugate über die bisher beschriebenen Bereiche hinaus. Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 erwähnt, können DNA-Oligonucleotide als funktionelle Bausteine in einer Protein-Nanopore verwendet werden, um eine nanoskalige Funktionseinheit für die DNA-Analytik zu generieren (Abbildung 9).^[44,45] Dieses Biokonjugat kann in Lipid-Dop-

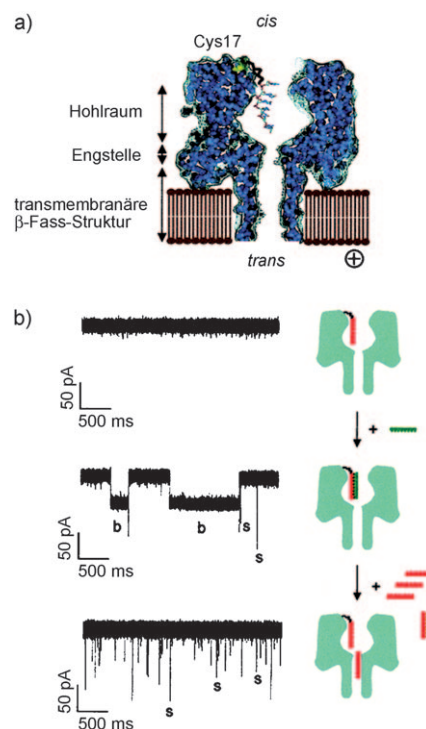


Abbildung 9. Die in (a) dargestellte DNA-modifizierte α -Hämolysin-Nanopore kann zur Detektion von Nucleinsäurehybridisierungen genutzt werden (b). Ein positives Spannungspotential treibt negativ geladene Moleküle von der *cis*- auf die *trans*-Seite der Lipid-Doppelschicht. Negative Abweichungen in der Stromstärke (b) weisen auf eine Bindung an das komplementäre Oligonucleotid (grün) hin, während die lediglich kurzen, negativen Spitzen auf die Translokation eines nicht-komplementären Oligonucleotids (rot) hinweisen. Wiedergabe aus Lit. [45] mit Genehmigung.

pelschichtmembranen eingebaut werden, wodurch die Identifizierung von individuellen Basen auf einzelnen DNA-Strängen mithilfe der Patch-Clamp-Technik möglich wird.^[45] Reagentien im Nanometermaßstab für die Detektion von Proteinen wurden durch die Erzeugung von DNA-modifizierten niedermolekularen Verbindungen in einem kombinatorischen Screening realisiert.^[158,159] Dieses Vorgehen führte zur Identifizierung von Liganden für Proteine, die aufgrund von polyvalenten Wechselwirkungen eine sehr hohe Affinität zeigten. Zusammen mit den Anwendungen der DNA-Antikörper-Konjugate (3.1.1) unterstreicht dieses Beispiel noch einmal einen entscheidenden Vorteil solcher supramolekularen Konstrukte, deren DNA-Gerüst die räumliche Anordnung von Bindungsstellen ermöglicht: So kann

eine spezifische Erkennung der Zieltopologie gewährleistet werden, auch wenn die individuellen Epitope nicht in räumlicher Nähe liegen oder die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung nur schwach ist. Ein weiterer großer Vorteil nanoskaliger DNA-Rezeptor-Konstrukte besteht darin, dass das Gerüst selbst enzymatisch modifiziert und detektiert werden kann. Durch den äußerst empfindlichen Nachweis mithilfe der PCR-Methode sind die supramolekularen Konstrukte auch noch bei sehr geringen Konzentrationen und in relativ komplexen Umgebungen eindeutig detektierbar.^[88]

DNA-Protein-Konjugate wurden außerdem verwendet, um neue Strategien für die Molekülbewegung auf festen Oberflächen umzusetzen. Stojanovic und Mitarbeiter beschrieben z.B. polykatalytische „Spinnenmoleküle“, die aus STV und biotinylierten, katalytisch aktiven Nucleinsäureoligomeren bestehen.^[160] Die darin enthaltenen Desoxyribozyme zeigen eine Phosphodiesteraseaktivität. Mithilfe der Oberflächenplasmonenresonanz konnte die Gruppe zeigen, dass diese Konjugate durch eine Hydrogelmatrix diffundieren können, die Oligonucleotidsubstrate enthält. Dabei werden die Substrate mit ähnlicher Reaktionsgeschwindigkeit wie in Lösung gespalten. Der Verlust an Spinnenmolekülen durch Diffusion aus dem Gel heraus ist vernachlässigbar gering. Da die laterale Diffusionsgeschwindigkeit durch Variation der Erkennungseinheiten und der Zahl der katalytischen „Beine“ gesteuert werden kann, nehmen die Autoren an, dass diese Strategie für die gezielte Wirkstoff-Freisetzung genutzt werden könnte.^[160] Hiyama et al. veröffentlichten kürzlich eine Arbeit, in der DNA-Oligomere an Mikrotubuli(MT)-Proteine gekuppelt wurden. Diese können auf dem Motorprotein Kinesin gleiten, das wiederum auf einer Glasoberfläche immobilisiert ist (Abbildung 10).^[161] Wenn die MTs eine Beladungsstelle erreichen, nehmen sie die DNA-modifizierte Ladung auf und geben sie in entsprechenden Entladestellen durch Strangverdrängung wieder ab. Dieses interessante Konzept wird allerdings durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen der Ladung (Avidin-modifizierte Po-

lystyrolträger mit 1 μm Durchmesser), den MTs und der Glasoberfläche beeinträchtigt. Außerdem erfolgt die Bewegung der biologischen Motorproteine auf der Oberfläche statistisch, weshalb noch kein gerichteter Transport möglich ist. Dennoch ist dieses Konzept faszinierend, da es zeigt, wie die individuellen Eigenschaften von Nucleinsäuren und Proteinen synergistisch kombiniert werden können, um völlig neuartige, autonome Nanosysteme zu schaffen.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Dieser Aufsatz fasst Arbeiten zusammen, deren gemeinsames Thema die artifizielle Kombination von Mitgliedern zweier großer Familien der Biopolymere – der Nucleinsäuren und der Proteine – ist. Die Chemie ist die Schlüsseldisziplin bei der Entwicklung von Techniken zur kovalenten wie auch nichtkovalenten Biokonjugation. Es ist absehbar, dass die fortschreitende Weiter- und Neuentwicklung von Methoden zur Kupplung von synthetischer DNA und POIs in Zukunft immer besser auf die Bedürfnisse einzelner POIs zugeschnitten sein wird. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf einer präzisen Steuerung der Stöchiometrie und der Regioselektivität der Kupplung. Dank der Funktionsvielfalt der Einzelkomponenten, besonders der evolutionär optimierten Proteine, sind die Anwendungsmöglichkeiten von Nucleinsäure-Protein-Hybriden äußerst breit. Diese Vielfalt macht es aber auch zu einer anspruchsvollen Aufgabe, eine gewünschte Funktion zu identifizieren, das entsprechende native Protein mithilfe moderner Methoden der Molekularbiologie und der Enzymprozesstechnik bereitzustellen und chemisch zu kupplern und das Konjugat anschließend einzusetzen, ohne dass die intrinsische Aktivität verloren geht. Eine weitere Hürde besteht in der Herstellung und Verwendung von DNA-Protein-Konjugaten in lebenden Systemen. DNA-Protein-Konjugate können im Bereich der Sensorik, der Fabrikation von Funktionseinheiten und der Nanokonstruktion Anwendung finden. Dank der Herstellung immer komplexerer DNA-Gebilde (z.B. dreidimensionaler und/oder dynamischer DNA-Gerüste) sowie der Implementierung DNA-modifizierter Nanopartikel mit ihren größenabhängigen Materialeigenschaften wird sich das Anwendungsspektrum derartiger Konjugate immer weiter verbreitern. Die Zukunft dieser Klasse von Hybridmolekülen ist daher vielversprechend und sicher nicht auf die Herstellung artifizieller Multienzyme, synthetischer Antennen und Lichtsammelkomplexe oder oligospezifischer Rezeptorkonstrukte beschränkt. Vielmehr ist zu erwarten, dass das Potenzial dieses Forschungsgebiets lediglich durch die Kreativität und das Vorstellungsvermögen der Forscher begrenzt wird, die auf diesem Grenzgebiet zwischen Chemie, Biologie und Materialwissenschaften tätig sind.

Ich danke meinen Mitarbeitern für ihre enthusiastischen Beiträge zur Forschung. Unsere Arbeit wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, der Alexander von Humboldt-Stiftung, der Europäischen Union und der Max-Planck-Gesellschaft durch ein Fellowship am Max-Planck-Institut für molekulare Phy-

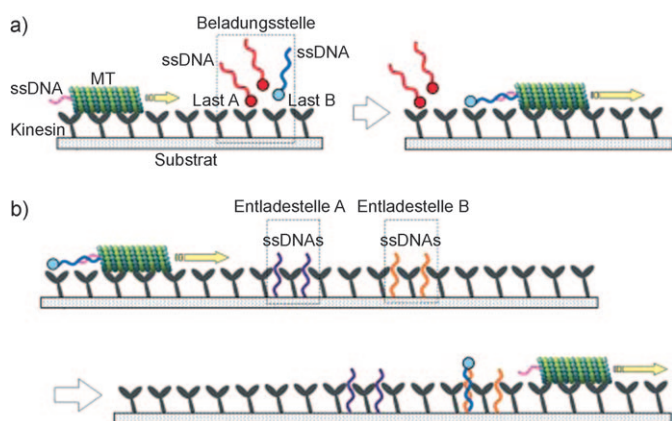


Abbildung 10. DNA-vermittelter, autonomes Beladen (a,b), Transportieren (c) und Entladen (d) von molekularen Lasten auf/von ssDNA-modifizierten Mikrotubuli-Proteinen (MT), die sich auf Kinesin-beschichteten Glasoberflächen bewegen. Die Lasten A (blau) und B (rot) enthalten ssDNA, die komplementär bzw. nichtkomplementär zur MT-gebundenen ssDNA ist. Wiedergabe aus Lit. [161] mit Genehmigung.

siologie (Dortmund) unterstützt. Ich danke Petra Alhorn und Kersten Rabe für die Hilfe beim Erstellen der Grafiken.

Eingegangen am 2. September 2009

Online veröffentlicht am 20. Januar 2010

- [1] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 5. Aufl., W. H. Freeman, New York, **2002**.
- [2] D. M. J. Lilley, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 31–35.
- [3] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254–4287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128–4158.
- [4] K. E. Drexler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 5275–5278.
- [5] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237–247.
- [6] C. M. Niemeyer, C. A. Mirkin, *NanoBiotechnology: Concepts, Methods and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [7] C. A. Mirkin, C. M. Niemeyer, *NanoBiotechnology II: More Concepts and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [8] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427–431.
- [9] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1888–1910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1856–1876.
- [10] C. Lin, Y. Liu, S. Rinker, H. Yan, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 1641–1647.
- [11] C. Lin, Y. Liu, H. Yan, *Biochemistry* **2009**, *48*, 1663–1674.
- [12] C. M. Niemeyer, *Nano Today* **2007**, *2*, 42–52.
- [13] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 14–45.
- [14] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 51–67.
- [15] In-vivo-Biotinylierung ist ein seltener und spezifischer Prozess. Dabei werden bestimmte, kurze Polypeptidsequenzen von Biotin-Protein-Ligase (wie BirA) erkannt und modifiziert. Eine Übersicht über diesen Themenkomplex bietet: A. Chapman-Smith, J. E. Cronan, Jr., *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 119–125. Das BirA-System wird häufig genutzt, um monobiotinylierte, rekombinante Proteine zu erzeugen. Beispiele: D. J. Min, J. D. Andrade, R. J. Stewart, *Anal. Biochem.* **1999**, *270*, 133–139; I. Chen, M. Howarth, W. Lin, A. Y. Ting, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 99–104.
- [16] G. D. Meredith, H. Y. Wu, N. L. Allbritton, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 969–982.
- [17] J. Shimada, T. Maruyama, T. Hosogi, J. Tominaga, N. Kamiya, M. Goto, *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 2001–2006.
- [18] R. P. Goodman, C. M. Erben, J. Malo, W. M. Ho, M. L. McKee, A. N. Kapanidis, A. J. Turberfield, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1551–1557.
- [19] W. Shen, H. Zhong, D. Neff, M. L. Norton, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6660–6661.
- [20] E. Hochuli, H. Dobeli, A. Schacher, *J. Chromatogr.* **1987**, *411*, 177–184.
- [21] E. Hochuli, *J. Chromatogr.* **1988**, *444*, 293–302.
- [22] A. N. Kapanidis, Y. W. Ebright, R. H. Ebright, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12123–12125.
- [23] E. W. Voss, *Fluorescein Hapten: An Immunological Probe*, CRC, Boca Raton, **1984**.
- [24] S. S. Kadkol, W. R. Gage, G. R. Pasternack, *Mol. Diagn.* **1999**, *4*, 169–183.
- [25] Y. He, Y. Tian, A. E. Ribbe, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12664–12665.
- [26] J. R. Crowther, *ELISA: Theory and Practice*, Humana Press Inc., Totowa, **1995**; *Principle and Practice of Immunoassays* (Hrsg.: C. P. Price, D. J. Newman), Macmillan, London, **1997**; O. N. Chappey, P. Sandouk, J. M. Scherrmann, *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 1375–1379.
- [27] A. Knappik, A. Plueckthun, *Biotechniques* **1994**, *17*, 745–761.
- [28] M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715–3743.
- [29] G. Mayer, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2710–2727; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2672–2689.
- [30] Die Suche mithilfe von Pubmed liefert aktuell mehr als 250 Einträge von beschriebenen Anwendungen des anti-Thrombin-Aptamers; erste Beschreibung: L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564–566.
- [31] L. Fruk, C.-H. Kuo, E. Torres, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1578–1603; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1550–1574.
- [32] L. Fruk, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2659–2662; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2603–2606.
- [33] L. Fruk, J. Müller, C. M. Niemeyer, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7448–7457.
- [34] L. Fruk, J. Müller, G. Weber, A. Narváez, E. Domínguez, C. M. Niemeyer, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 5223–5231.
- [35] L. Fruk, J. Kuhlmann, C. M. Niemeyer, *Chem. Commun.* **2009**, 230–232.
- [36] P. Simon, C. Dueymes, M. Fontecave, J.-L. Decout, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2824; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2764–2767.
- [37] A. Saghatelian, K. M. Guckian, D. A. Thayer, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 344–345.
- [38] N. C. Gianneschi, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4029–4032; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3955–3958.
- [39] M. Renz, C. Kurz, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 3435–3444.
- [40] J. Czichos, M. Kohler, B. Reckmann, M. Renz, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 1563–1572.
- [41] D. R. Corey, P. G. Schultz, *Science* **1987**, *238*, 1401–1403.
- [42] D. R. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9373–9374.
- [43] S. V. Smulevitch, C. G. Simmons, J. C. Norton, T. W. Wise, D. R. Corey, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1700–1704.
- [44] S. Howorka, S. Cheley, H. Bayley, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 636–639.
- [45] S. Howorka, L. Movileanu, O. Braha, H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12996–13001.
- [46] R. B. Fong, Z. Ding, C. J. Long, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 720–725.
- [47] C. M. Niemeyer, T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5530–5539.
- [48] R. D. Joerger, T. M. Truby, E. R. Hendrickson, R. M. Young, R. C. Ebersole, *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 1371–1377.
- [49] Eine detaillierte Vorschrift für die Maleinsäureimid-basierte Kupplung von Oligonucleotiden und Proteinen findet sich in: F. Kukulka, M. Lovrinovic, R. Wacker, C. M. Niemeyer in *Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods* (Hrsg.: C. M. Niemeyer), Humana, Totowa, **2004**, S. 181–196.
- [50] F. Kukulka, C. M. Niemeyer, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2203–2206.
- [51] R. M. Hofmann, T. W. Muir, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 297–303.
- [52] R. S. Goody, K. Alexandrov, M. Engelhard, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 399–403.
- [53] M. Lovrinovic, R. Seidel, R. Wacker, H. Schroeder, O. Seitz, M. Engelhard, R. Goody, C. M. Niemeyer, *Chem. Commun.* **2003**, 822–823.
- [54] Beispiele: M. Lovrinovic, M. Spengler, C. Deutsch, C. M. Niemeyer, *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 64–69; S. Takeda, S. Tsukiji, T. Nagamune, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2407–2410; M. Lovrinovic, C. M. Niemeyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *335*, 943–948; I. Burbulis, K. Yamaguchi, A. Gordon, R. Carlson, R. Brent, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 31–37; M. Lovrinovic, C. M. Niemeyer, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 61–67; M. Lovrinovic, L. Fruk, C. M. Niemeyer, *Chem. Commun.* **2007**, 353–355; S. Takeda, S. Tsukiji, H. Ueda, T. Nagamune, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2187–2194.
- [55] C. F. W. Becker, R. Wacker, W. Bouschen, R. Seidel, B. Kolaric, P. Lang, H. Schroeder, O. Müller, C. M. Niemeyer, B. Spengler, R. S. Goody, M. Engelhard, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7808–7812; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7635–7639.

- [56] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [57] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3168–3178; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106–3116.
- [58] J. F. Lutz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1036–1043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018–1025.
- [59] T. Kurpiers, H. D. Mootz, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2317–2325.
- [60] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.
- [61] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9762–9792; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9618–9647.
- [62] R. A. Chandra, E. S. Douglas, R. A. Mathies, C. R. Bertozzi, M. B. Francis, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 910–915; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 896–901.
- [63] E. S. Douglas, R. A. Chandra, C. R. Bertozzi, R. A. Mathies, M. B. Francis, *Lab Chip* **2007**, *7*, 1442–1448.
- [64] S. C. Hsiao, A. K. Crow, W. A. Lam, C. R. Bertozzi, D. A. Fletcher, M. B. Francis, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8601–8605; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8473–8477.
- [65] S. C. Hsiao, B. J. Shum, H. Onoe, E. S. Douglas, Z. J. Gartner, R. A. Mathies, C. R. Bertozzi, M. B. Francis, *Langmuir* **2009**, *25*, 6985–6991.
- [66] E. S. Douglas, S. C. Hsiao, H. Onoe, C. R. Bertozzi, M. B. Francis, R. A. Mathies, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2010–2015.
- [67] Z. J. Gartner, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 4606–4610.
- [68] P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8478–8487; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350–8358.
- [69] K. Gutmiedl, C. T. Wirges, V. Ehmke, T. Carell, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2405–2408.
- [70] B. P. Duckworth, Y. Chen, J. W. Wollack, Y. Sham, J. D. Mueller, T. A. Taton, M. D. Distefano, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8975–8978; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8819–8822.
- [71] L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 34–68; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34–66.
- [72] Beispiele für den ortsspezifischen Einbau von Alkin- oder Azidogruppen in rekombinante Proteine mithilfe nichtnatürlicher Aminosäuren: Z. Zhang, L. Wang, A. Brock, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2964–2966; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2840–2842; A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11782–11783; T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, T. Kobayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1187–1197; P. R. Chen, D. Groff, J. Guo, W. Ou, S. Cellitti, B. H. Geierstanger, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4112–4115; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4052–4055; E. Kaya, K. Gutmiedl, M. Vrabel, M. Müller, P. Thumbs, T. Carell, *ChemBioChem*, im Druck.
- [73] H. S. Lee, R. D. Dimla, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5222–5224.
- [74] J. Tominaga, Y. Kemori, Y. Tanaka, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto, *Chem. Commun.* **2007**, 401–403.
- [75] S. S. Smith, L. M. Niu, D. J. Baker, J. A. Wendel, S. E. Kane, D. S. Joy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2162–2167.
- [76] E. M. Singer, S. S. Smith, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1184–1189.
- [77] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86–89.
- [78] N. Johnsson, K. Johnsson, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 31–38.
- [79] M. A. Jongsma, R. H. Litjens, *Proteomics* **2006**, *6*, 2650–2655.
- [80] E. Jablonski, E. W. Moomaw, R. H. Tullis, J. L. Ruth, *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 6115–6128.
- [81] M. S. Urdea, B. D. Warner, J. A. Running, M. Stempien, J. Clyne, T. Horn, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4937–4956.
- [82] S. S. Ghosh, P. M. Kao, A. W. McCue, H. L. Chappelle, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 71–76.
- [83] E. Kynclova, A. Hartig, T. Schalkhammer, *J. Mol. Recognit.* **1995**, *8*, 139–145.
- [84] Y. Wang, M. Stanzel, W. Gumbrecht, M. Humenik, M. Sprinzl, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1798–1806.
- [85] T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Science* **1992**, *258*, 120–122.
- [86] Beispiele: J. Ren, Z. Chen, S. J. Juan, X. Y. Yong, B. R. Pan, D. M. Fan, *Cancer* **2000**, *88*, 280–285; S. Wiltshire, S. O'Malley, J. Lambert, K. Kukanskis, D. Edgar, S. F. Kingsmore, B. Schweitzer, *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1990–1993; H. Liang, S. E. Cordova, T. L. Kieft, S. Rogelj, *J. Immunol. Methods* **2003**, *279*, 101–110; M. Adler, R. Wacker, E. Boeltink, B. Manz, C. M. Niemeyer, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 147–149; M. Spengler, M. Adler, A. Jonas, C. M. Niemeyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *387*, 278–282.
- [87] C. M. Niemeyer, M. Adler, R. Wacker, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1918–1930.
- [88] Aktueller Übersichtsartikel zur IPCR und verwandten Techniken: M. Adler, R. Wacker, C. M. Niemeyer, *Analyst* **2008**, *133*, 702–718.
- [89] Beispiele: S. Fredriksson, M. Gullberg, J. Jarvius, C. Olsson, K. Pietras, S. M. Gustafsdottir, A. Ostman, U. Landegren, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 473–477; M. Gullberg, S. M. Gustafsdottir, E. Schallmeiner, J. Jarvius, M. Bjarnegard, C. Betsholtz, U. Landegren, S. Fredriksson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8420–8424; S. M. Gustafsdottir, A. Nordengrahn, S. Fredriksson, P. Wallgren, E. Rivera, E. Schallmeiner, M. Merza, U. Landegren, *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 1152–1160; O. Söderberg, M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstrale, K. J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydbring, F. Bahram, L. G. Larsson, U. Landegren, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 995–1000; S. M. Gustafsdottir, J. Schlingemann, A. Rada-Iglesias, E. Schallmeiner, M. Kamali-Moghaddam, C. Wadelius, U. Landegren, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3067–3072; E. Schallmeiner, E. Oksanen, O. Ericsson, L. Spangberg, S. Eriksson, U. H. Stenman, K. Pettersson, U. Landegren, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 135–137; O. Ericsson, J. Jarvius, E. Schallmeiner, M. Howell, R. Y. Nong, H. Reuter, M. Hahn, J. Stenberg, M. Nilsson, U. Landegren, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, e45; L. Zhu, H. Koistinen, U. Landegren, U. H. Stenman, *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 1665–1671.
- [90] M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1326–1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1276–1289.
- [91] U. R. Mueller, D. V. Nicolau, *Microarray Technology and Its Applications*, Springer, Berlin, **2005**.
- [92] C. M. Niemeyer, R. Wacker, M. Adler, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 90e.
- [93] Aktuelle Beispiele: R. Wacker, C. M. Niemeyer, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 453–459; C. Boozer, J. Ladd, S. Chen, S. Jiang, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1515–1519; J. K. Ng, P. K. Ajikumar, Y. C. Tang, J. Y. Lee, G. Stephanopoulos, H. P. Too, *Electrophoresis* **2007**, *28*, 4638–4644; Y. Jung, J. M. Lee, H. Jung, B. H. Chung, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6534–6541; N. Tort, J.-P. Salvador, R. Eritja, M. Poch, E. Martínez, J. Samitier, M. P. Marco, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 718–728.
- [94] F. Bano, L. Fruk, B. Sanavio, M. Glettenberg, L. Casalis, C. M. Niemeyer, G. Scoles, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2614–2618.
- [95] H. Schroeder, M. Adler, K. Gerigk, B. Müller-Chorus, F. Götz, C. M. Niemeyer, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1275–1279.
- [96] C. M. Niemeyer, L. Boldt, B. Ceyhan, D. Blohm, *Anal. Biochem.* **1999**, *268*, 54–63.
- [97] H. Schröder, L. Hoffmann, J. Müller, P. Alhorn, M. Flegler, A. Neyer, C. M. Niemeyer, *Small* **2009**, *5*, 1547–1552.
- [98] N. Winssinger, J. L. Harris, B. J. Backes, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3254–3258; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3152–3155.
- [99] N. Winssinger, S. Ficarro, P. G. Schultz, J. L. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11139–11144.

- [100] N. Winssinger, R. Damoiseaux, D. C. Tully, B. H. Geierstanger, K. Burdick, J. L. Harris, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1351–1360.
- [101] J. Harris, D. E. Mason, J. Li, K. W. Burdick, B. J. Backes, T. Chen, A. Shipway, G. Van Heeke, L. Gough, A. Ghaemmaghami, F. Shakib, F. Debaene, N. Winssinger, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1361–1372.
- [102] J. J. Diaz-Mochon, L. Bialy, L. Keinicke, M. Bradley, *Chem. Commun.* **2005**, 1384–1386.
- [103] F. Debaene, N. Winssinger, *Methods Mol. Med.* **2009**, *570*, 299–307.
- [104] N. Nemoto, E. Miyamoto-Sato, Y. Husimi, H. Yanagawa, *FEBS Lett.* **1997**, *414*, 405–408.
- [105] R. W. Roberts, J. W. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12297–12302.
- [106] M. Kurz, K. Gu, A. Al-Gawari, P. A. Lohse, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 666–672.
- [107] V. Stein, I. Sielaff, K. Johnsson, F. Hollfelder, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2191–2194.
- [108] H. Schroeder, B. Ellinger, C. F. W. Becker, H. Waldmann, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4258–4261; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4180–4183.
- [109] R. C. Bailey, G. A. Kwong, C. G. Radu, O. N. Witte, J. R. Heath, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1959–1967.
- [110] Ausgewählte Beispiele für DDI mit DNA-modifizierten Kohlenhydraten (Y. Chevolot, C. Bouillon, S. Vidal, F. Morvan, A. Meyer, J. P. Cloarec, A. Jochum, J. P. Praly, J. J. Vasseur, E. Souteyrand, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2450–2454; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2398–2402; J. Zhang, G. Pourceau, A. Meyer, S. Vidal, J. P. Praly, E. Souteyrand, J. J. Vasseur, F. Morvan, Y. Chevolot, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2515–2521), anorganischen Nanopartikeln (T. A. Taton, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6305–6306; D. Gerion, W. J. Parak, S. C. Williamson, D. Zanchet, C. M. Micheel, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7070–7074; C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, P. Hazarika, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5944–5948; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5766–5770; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5944–5948; B. Zou, B. Ceyhan, U. Simon, C. M. Niemeyer, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1643–1647; Z. Zhang, Q. Cheng, P. Feng, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 124–128; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 118–122) oder Lipidvesikeln (C. Yoshina-Ishii, S. G. Boxer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3696–3697; S. Svedhem, I. Pfeiffer, C. Larsson, C. Wingren, C. Borrebaeck, F. Hook, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 339–343; I. Pfeiffer, F. Hook, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10224–10225).
- [111] C. M. Niemeyer, M. Adler, B. Pignataro, S. Lenhart, S. Gao, L. F. Chi, H. Fuchs, D. Blohm, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4553–4561.
- [112] N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547–1562.
- [113] C. M. Niemeyer, M. Adler, S. Lenhart, S. Gao, H. Fuchs, L. F. Chi, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 260–265.
- [114] C. M. Niemeyer, M. Adler, S. Gao, L. F. Chi, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3183–3187; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3055–3059.
- [115] C. M. Niemeyer, R. Wacker, M. Adler, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3262–3265; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3169–3172.
- [116] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, *391*, 775–778.
- [117] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, *Science* **2002**, *297*, 72–75.
- [118] B. Pignataro, L. F. Chi, S. Gao, B. Anczykowski, C. M. Niemeyer, M. Adler, H. Fuchs, *Appl. Phys. A* **2002**, *74*, 447–452.
- [119] C. M. Niemeyer, W. Bürger, J. Peplies, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2391–2395; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2265–2268.
- [120] H. Yan, S. H. Park, G. Finkelstein, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Science* **2003**, *301*, 1882–1884.
- [121] H. Li, S. H. Park, J. H. Reif, T. H. LaBean, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 418–419.
- [122] J. Sharma, Y. Ke, C. Lin, R. Chhabra, Q. Wang, J. Nangreave, Y. Liu, H. Yan, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5235–5237; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5157–5159.
- [123] K. Lund, Y. Liu, S. Lindsay, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17606–17607.
- [124] Y. Liu, Y. Ke, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17140–17141.
- [125] Y. Liu, C. Lin, H. Li, H. Yan, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4407–4412.
- [126] C. Lin, E. Katilius, Y. Liu, J. Zhang, H. Yan, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5422–5427; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5296–5301.
- [127] C. Lin, Y. Liu, H. Yan, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 507–512.
- [128] R. Chhabra, J. Sharma, Y. Ke, Y. Liu, S. Rinker, S. Lindsay, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10304–10305.
- [129] B. A. R. Williams, K. Lund, Y. Liu, H. Yan, J. C. Chaput, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3111–3114; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3051–3054.
- [130] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302.
- [131] A. Kuzuya, M. Kimura, K. Numajiri, N. Koshi, T. Ohnishi, F. Okada, M. Komiyama, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1811–1815.
- [132] A. Kuzuya, K. Numajiri, M. Komiyama, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3448–3450; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3400–3402.
- [133] A. Kuzyk, K. T. Laitinen, P. Torma, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 235305.
- [134] J. D. Cohen, J. P. Sadowski, P. B. Dervan, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8102–8105; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7956–7959.
- [135] J. D. Cohen, J. P. Sadowski, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 402–403.
- [136] W. Shen, M. F. Bruist, S. D. Goodman, N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4854–4856; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4750–4752.
- [137] J. Malo, J. C. Mitchell, C. Vénien-Bryan, J. R. Harris, H. Wille, D. J. Sherratt, A. J. Turberfield, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3117–3121; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3057–3061.
- [138] C. M. Erben, R. P. Goodman, A. J. Turberfield, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7574–7577; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7414–7417.
- [139] M. Glettenberg, C. M. Niemeyer, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 969–975.
- [140] C.-H. Kuo, L. Fruk, C. M. Niemeyer, *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 1064–1069.
- [141] C. M. Niemeyer, J. Koehler, C. Wuerdemann, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 242–245.
- [142] J. Müller, C. M. Niemeyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *377*, 62–67.
- [143] O. I. Wilner, Y. Weizmann, R. Gill, O. Lioubashevski, R. Freeman, I. Willner, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 249–254.
- [144] O. I. Wilner, S. Shimron, Y. Weizmann, Z. G. Wang, I. Willner, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2040–2043.
- [145] C. Lin, H. Yan, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 211–212.
- [146] J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1849–1862.
- [147] M. C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.
- [148] E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6166–6235; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042–6108.
- [149] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3798–3801; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3685–3688.
- [150] P. Hazarika, B. Ceyhan, C. M. Niemeyer, *Small* **2005**, *1*, 844–848.
- [151] P. Hazarika, F. Kukolka, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6981–6984; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6827–6830.
- [152] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills Jr., F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature* **2000**, *406*, 605–608.
- [153] F. C. Simmel, W. U. Dittmer, *Small* **2005**, *1*, 284–299.

- [154] R. Y. Tsien, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5721–5736; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5612–5626.
- [155] F. Kukulka, B. K. Mueller, S. Paternoster, A. Arndt, C. M. Niemeyer, C. Braeuchle, D. C. Lamb, *Small* **2006**, *2*, 1083–1089; F. Kukulka, O. Schoeps, U. Woggon, C. M. Niemeyer, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 621–627; G. Heiss, V. Lapiene, F. Kukulka, C. M. Niemeyer, C. Braeuchle, D. C. Lamb, *Small* **2009**, *5*, 1169–1175.
- [156] Beispiele: V. R. Hering, G. Gibson, R. I. Schumacher, A. Faljoni-Alario, M. J. Politi, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1705–1708; A. M. Dennis, G. Bao, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 1439–1445; J. Irrgang, J. Ksienczyk, V. Lapiene, C. M. Niemeyer, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 1483–1491; V. R. Hering, T. E. Faulin, E. R. Triboni, S. D. Rodriguez, D. L. Bernik, R. I. Schumacher, V. P. Mammanna, A. Faljoni-Alario, D. S. Abdalla, G. Gibson, M. J. Politi, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1237–1241; K. Boeneman, B. C. Mei, A. M. Dennis, G. Bao, J. R. Deschamps, H. Mattoussi, I. L. Medintz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3828–3829; eine aktuelle Übersicht zu FRET-Systemen auf QD-Basis: I. L. Medintz, H. Mattoussi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 17–45.
- [157] H. Lu, O. Schoeps, U. Woggon, C. M. Niemeyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4815–4827.
- [158] S. Melkko, J. Scheuermann, C. E. Dumelin, D. Neri, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 568–574.
- [159] K. Gorska, K. T. Huang, O. Chaloin, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7831–7836; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7695–7700.
- [160] R. Pei, S. K. Taylor, D. Stefanovic, S. Rudchenko, T. E. Mitchell, M. N. Stojanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12693–12699.
- [161] S. Hiyama, T. Inoue, T. Shima, Y. Moritani, T. Suda, K. Sutoh, *Small* **2008**, *4*, 410–415.