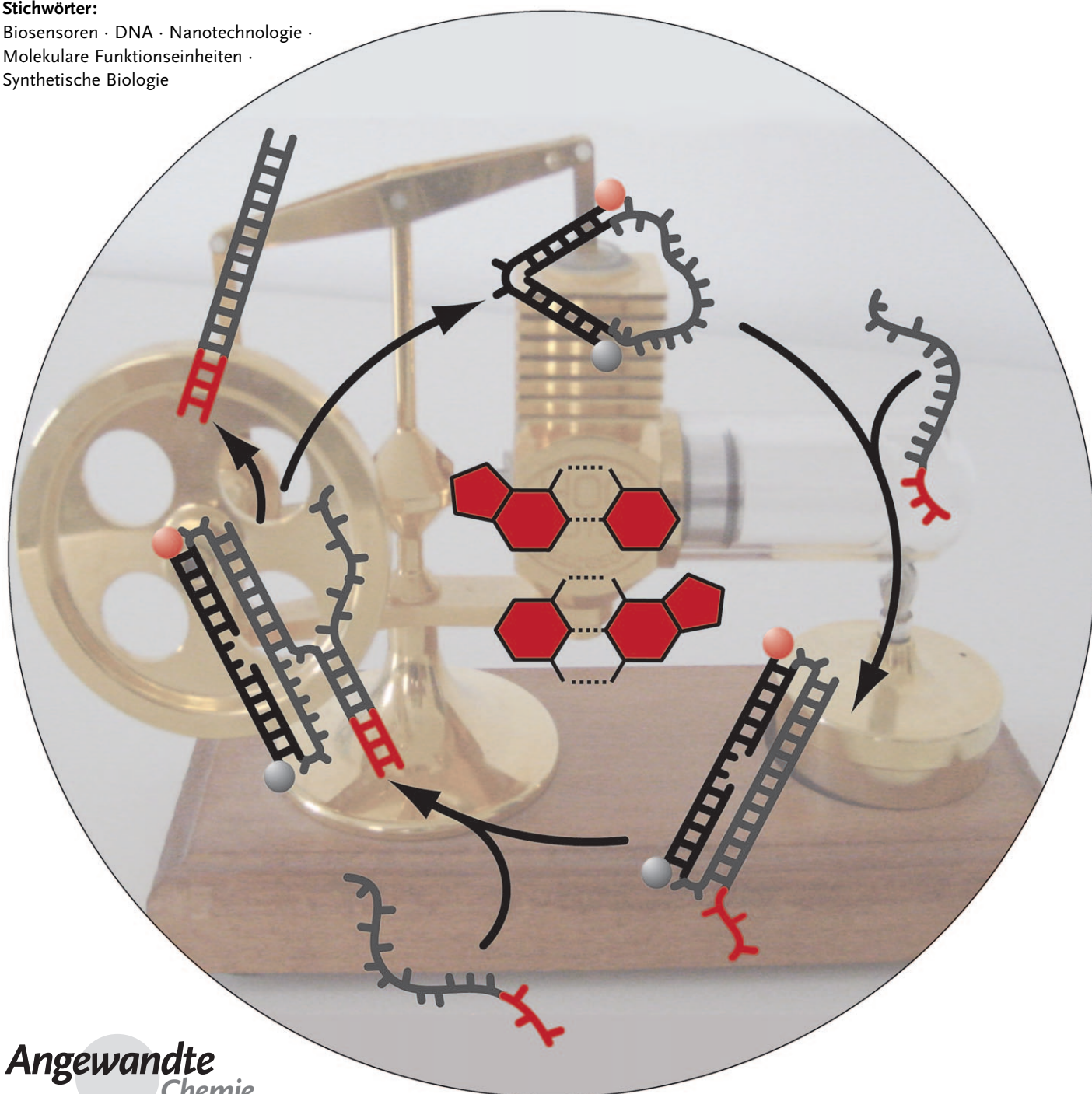


# Nukleinsäure-basierte molekulare Werkzeuge

Yamuna Krishnan und Friedrich C. Simmel\*

**Stichwörter:**

Biosensoren · DNA · Nanotechnologie ·  
Molekulare Funktionseinheiten ·  
Synthetische Biologie



*In der Biologie sind die Nukleinsäuren die Träger der molekularen Information: Die DNA-Basensequenz speichert und vermittelt genetische Anweisungen, während die RNA-Sequenz der Weitergabe der Information sowie der Regulation der Genexpression dient. Als Biopolymere haben Nukleinsäuren auch interessante physikochemische Eigenschaften, die sich darüber hinaus auf unzählige Weise über die Basensequenz rational verändern lassen. Es verwundert daher nicht, dass Nukleinsäuren in den letzten Jahren wichtige Bausteine für die Bottom-up-Nanotechnologie geworden sind: als Moleküle für die Selbstorganisation molekularer Nanostrukturen, aber auch als Material zum Aufbau maschinenähnlicher Nanobauteile. In diesem Aufsatz werden wir die wichtigsten Entwicklungen auf dem wachsenden Gebiet der Nukleinsäure-Nanobauteile zusammenfassen. Wir werden auch einen Überblick über die biochemischen und biophysikalischen Hintergründe des Gebiets sowie über die „historischen“ Einflüsse, von denen es geprägt wurde, geben. Besonderes Augenmerk wird molekularen DNA-Motoren, der molekularen Robotik, der molekularen Datenverarbeitung sowie Anwendungen von Nukleinsäure-Nanobauteilen in der Biologie gelten.*

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	3181
<b>2. Biophysikalische und biochemische Grundlagen</b>	3182
<b>3. Molekulare Schalter aus DNA</b>	3189
<b>4. Molekulare Motoren und Läufer</b>	3197
<b>5. Schaltbare Materialien und Hybridkomponenten</b>	3200
<b>6. DNA-Computing und molekulare Programmierung</b>	3202
<b>7. Molekulare Bauteile aus Nukleinsäuren in der Biologie</b>	3204
<b>8. Zusammenfassung und Ausblick</b>	3209

## 1. Einleitung

Die Idee, dass sich die einzigartigen Fähigkeiten von DNA-Molekülen zur molekularen Erkennung auch in einem völlig nichtbiologischen Zusammenhang nutzen ließen, stammt aus den frühen 1980er Jahren: Seeman schlug damals vor, die DNA zur Herstellung supramolekularer Kristalle zu verwenden<sup>[1]</sup> – ein Vorhaben, das erst vor Kurzem in Seemans Arbeitsgruppe durch die Synthese von millimetergroßen DNA-Kristallen realisiert wurde.<sup>[2]</sup> 1994 wurde mit dem DNA-Computing eine weitere artifizielle Anwendung für DNA beschrieben: Adleman veröffentlichte eine Nasslaborlösung (wet lab solution) für ein Computerproblem unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken – und DNA.<sup>[3]</sup> Vor etwa zehn Jahren wurde das Feld der DNA-Nanotechnologie durch erste experimentelle Demonstrationen von schaltbaren molekularen Strukturen aus DNA, die häufig als DNA-Nanomaschinen oder DNA-Nanobauteile (DNA nanomachines bzw. DNA nanodevices) bezeichnet werden, erweitert.<sup>[4,5]</sup>

Schon Anfang der 1990er Jahre etablierte sich eine eigenständige Forschungsrichtung, die sich mit der Entwicklung von funktionalen Nukleinsäuremolekülen wie Aptameren oder Ribozymen beschäftigt.<sup>[6]</sup> Diese werden dabei auch für molekulare Schalter verwendet, d.h. als allosterische Aptamere oder Aptazyme. Schließlich wurde 1996 das äußerst erfolgreiche biosensorische Konzept der Molecular Beacons (MBs) – zu deutsch etwa „molekulare Leuchtfeuer“ – eingeführt, die ebenfalls als einfache molekulare DNA-Nanoschalter angesehen werden können.<sup>[7,8]</sup>

Mit der – voneinander unabhängigen – Entwicklung funktionaler Nukleinsäuren und der MBs stehen wichtige Werkzeuge und Komponenten für das Feld der DNA-Nanobauteile zur Verfügung, und heutzutage gibt es mannigfaltige

Wechselbeziehungen zwischen allen Teilfeldern: Rechenfunktionen und das Schalten zwischen verschiedenen Konformationen erfolgen Hand in Hand, und häufig sind anspruchsvolle supramolekulare Strukturen die Basis von DNA-Nanobauteilen. Die Zeitleiste in Abbildung 1 gibt einen groben Überblick über wesentliche Entwicklungen in den unterschiedlichen Teilgebieten, wobei auch einige Querverbindungen angedeutet worden sind.

Wie aus den Arbeiten ersichtlich wird, die in diesem Aufsatz präsentiert werden, gibt es heutzutage eine breite Palette von molekularen DNA-Bauteilen verschiedenster Typen und Größen; einige Objekte bestehen lediglich aus einem einzelnen DNA-Strang, andere hingegen aus über 200! Das wesentliche Element, das alle diese Bauteile miteinander verbindet, ist wohl der Umstand, dass ihre Struktur vorher gewissermaßen am Reißbrett entworfen wurde und sie eine dadurch vorherbestimmte Funktion haben. Zumindest die komplexeren Bauteile kombinieren häufig verschiedene Funktionalitäten, um eine vorgegebene Aufgabe zu erfüllen. In den meisten Fällen wird dabei die Programmierbarkeit der Sequenz von DNA- oder RNA-Molekülen sowohl dazu genutzt, eine molekulare Struktur zu definieren – d.h., sie aus Einzelsträngen zusammenzusetzen – als auch dazu, diese

[\*] Dr. Y. Krishnan  
National Centre for Biological Sciences (NCBS)  
Tata Institute of Fundamental Research, GKVK  
Bellary Road, Bangalore, 560065 (Indien)  
Prof. Dr. F. C. Simmel  
Lehrstuhl für Bioelektronik E14, Physikdepartment  
Technische Universität München  
Am Coulombwall 4a, 85748 Garching (Deutschland)  
Fax: (+49) 89-289-11612  
E-Mail: simmel@ph.tum.de

Struktur zwischen verschiedenen Konformationen hin- und herzuschalten, die ihrerseits eine bestimmte Funktionalität aufweisen.

Wir werden in diesem Aufsatz versuchen, die wichtigsten Entwicklungen in diesem Feld während der letzten Jahre abzudecken und sie in Teilbereiche zu gliedern, die den Hauptrichtungen der Forschung entsprechen: Auf der Grundlagenebene – die Impulse hierzu kommen hauptsächlich aus der Nanotechnologie und Biophysik – würden die Forscher gerne mehr darüber lernen, wie sich künstliche „molekulare Maschinen“ konstruieren lassen.<sup>[9]</sup> Wegen ihrer vorhersagbaren Wechselwirkungen und einfachen Verfügbarkeit sind DNA-Moleküle ein hervorragendes Material für den Entwurf und die Synthese von Strukturen mit maschinenähnlichen Eigenschaften. Eine der schwierigsten Aufgaben ist hierbei die Erzeugung von Kraft und Bewegung – und so entwickelt eine Reihe von Forschern DNA-basierte molekulare Motoren und „Läufer“ (DNA walkers). Dieser eher grundlagenorientierten Thematik widmen sich die Abschnitte 3 und 4. Aus den Bereichen der Materialwissenschaften und der Nanotechnologie stammt der Versuch, schaltbare, „intelligente“ Materialien, Behältnisse und Transportvehikel zu synthetisieren. Abschnitt 5 deckt Arbeiten in dieser Richtung ab. Da eine starke Wechselbeziehung zwischen DNA-Computing und DNA-Maschinen besteht, sind die jüngsten Entwicklungen auf diesem Gebiet in Abschnitt 6 zusammengetragen. Abschnitt 7 schließlich widmet sich dem großen Feld aktueller und zukünftiger Anwendungen in der Biologie, von der Biosensorik über die In-vivo-Bildgebung bis hin zur Therapeutik. In diesem Bereich besteht unausweichlich eine gewisse Überschneidung mit vielen anderen Forschungsfeldern – die Unterscheidungsmerkmale zwischen einem DNA-Nanoschalter und einem DNA-basierten Biosensor sind hier bisweilen fließend. Sensorische Module werden in Zukunft sicherlich eine wichtige Rolle als Komponenten komplexerer molekularer Maschinen spielen, beispielsweise im Zusammenhang mit steuerbaren Transporteinheiten. Nukleinsäure-basierte Biosensoren sind – wie in den Abschnitten 4–6 ausgeführt – interessante Komponenten für molekulare Bauteile. Nicht jedes DNA-Nanobauteil ist aber einfach nur ein komplizierter Sensor oder hat überhaupt sensorische Eigenschaften.

Dem Leser sei eine Reihe von Übersichtsartikeln zu diesem Thema empfohlen, insbesondere diejenigen von

Seeman, Willner, Simmel und Turberfield,<sup>[10]</sup> die jeweils eine komplementäre Perspektive zu spezifischen Aspekten von Nukleinsäurearchitekturen und verwandten Objekten einnehmen. Anders als jene Arbeiten soll der vorliegende Aufsatz eine Gesamtübersicht über dieses neue Forschungsgebiet und über dessen weitreichenden Einfluss auf die molekularen Wissenschaften insgesamt bieten.

## 2. Biophysikalische und biochemische Grundlagen

In diesem Abschnitt beleuchten wir einige Schlüsselaspekte der DNA-Biophysik und -Biochemie, die die Grundlage für den Entwurf, die Konstruktion und den Betrieb von Nanomaschinen und -schaltern aus Nukleinsäuren bilden. Dies umfasst die Vorhersage von Sekundärstrukturen, Aspekte der mechanischen und thermischen Stabilität von Nukleinsäuren und die Struktur ungewöhnlicher DNA-Konformationen wie G(uanin)-Quadruplexen oder i-Motiven, die auf diesem Forschungsgebiet häufigen Einsatz finden. Dieser vergleichsweise ausführliche Überblick ist insbesondere für Leser ohne Vorkenntnisse in diesem Bereich gedacht; sachkundigere Leser können direkt zu Abschnitt 3 übergehen. Für eine ausführliche Behandlung von Nukleinsäurestrukturen sei z. B. Lit. [11] empfohlen.

### 2.1. Biophysik der Bildung von DNA-Doppelsträngen

Die meisten Nukleinsäure-basierten Nanostrukturen beruhen in der einen oder anderen Weise auf der Bildung von stabilen doppelsträngigen Komplexen aus komplementären (Einzel-)Strängen. Viele Bauteile bestehen sowohl aus einzelsträngigen als auch aus doppelsträngigen Bereichen, die als flexible bzw. steife molekulare Segmente verwendet werden. Die geschickte Kombination solcher Elemente überträgt deren spezifische mechanische und chemische Eigenschaften auf das resultierende Bauteil. Einzelstränge lassen sich dabei schlicht als flexible Gelenke verwenden – ebenso aber auch als adressierbare molekulare „Etiketten“, an die komplementäre Stränge anbinden können. Doppelsträngige Bereiche werden typischerweise als versteifende Bauelemente verwendet, können aber auch eine Bindestelle oder eine

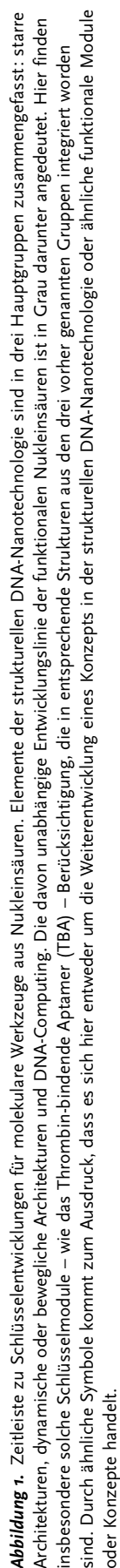


Yamuna Krishnan erhielt 1994 ihren BSc in Chemie von der Universität von Madras und promovierte 2002 am „Indian Institute of Science“ in Bangalore. Mit Shankar Balasubramanian arbeitete sie an der Chemiefakultät der University of Cambridge als „1851 research fellow“ und wechselte 2005 nach Indien an das Nationale Zentrum für biologische Wissenschaften (TFIR) in Bangalore. Sie ist Trägerin der Indian National Science Academy's Young Scientist Medal. Sie arbeitet an molekularen selbstorganisierten Bauteilen auf Nukleinsäurebasis für Sensorik- und Transportanwendungen in biologischen Systemen.



Friedrich Simmel promovierte 1999 in Experimentalphysik an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München bei Jörg Kottaus. Anschließend folgte ein Postdoktorat bei Bernard Yurke in den Bell-Laboratorien (Murray Hill, USA). Als Leiter einer Emmy-Noether-Nachwuchsgruppe im Umfeld der Bionanotechnologie kehrte er 2002 an die LMU zurück. Seit 2007 ist er Inhaber eines Lehrstuhls für Physik an der Technischen Universität München (TUM). Derzeit widmet er sich der Selbstorganisation von DNA, nanoporenbasierten Biosensoren, biomolekularen Nanomaschinen und synthetischen genregulatorischen Netzwerken.





Duplexbildung tritt einerseits während des Aufbaus von Strukturen aus ihren einzelsträngigen molekularen Komponenten auf, ist darüber hinaus aber auch für die mechanochemische Operation vieler Bauteile verantwortlich. Sowohl die Thermodynamik und Kinetik der Duplexbildung als auch die mechanischen Eigenschaften von einzel- und doppelsträngigen Nukleinsäuren sind daher für die Konstruktion wie auch die Funktion von Nukleinsäure-Nanoschaltern elementar.

Zwei DNA- oder RNA-Stränge mit vollständig komplementären Sequenzen können miteinander eine Bindung eingehen; sie bilden dann einen vollständig basengepaarten Doppelstrang. Die Stabilität dieser Struktur wird von Stapelwechselwirkungen zwischen benachbarten Basenpaaren bestimmt. Die freie Enthalpie eines vollständig basengepaarten Doppelstrangs lässt sich recht exakt mit dem Modell nächster Nachbarn (nearest neighbor model) berechnen, das von umfangreichen thermodynamischen Tabellen Gebrauch macht, die ihrerseits aus Experimenten mit Modellsequenzen stammen.<sup>[12]</sup> Heutzutage sind diverse Computerprogramme und Internetanwendungen verfügbar, die die Berechnung thermodynamischer Eigenschaften von DNA- oder RNA-Molekülen unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen – wie den Konzentrationen ein- und zweiwertiger Salze – ermöglichen, darunter der wohlbekannte mfold-Algorithmus,<sup>[13]</sup> das „Vienna Package“,<sup>[14]</sup> HYTHET<sup>[15]</sup> oder NUPACK.<sup>[16]</sup> Einige Programme unterstützen sogar schon fortgeschrittenere Designprobleme, die beim Zusammenfügen von DNA-Nanobauteilen von Interesse sind. Das Vienna Package beispielsweise enthält einen inversen Faltungsalgorithmus für einzelsträngige RNA-Strukturen, während NUPACK auch die Vorhersage der Faltung für Strukturen aus mehreren Einzelsträngen erlaubt.

Die Verfügbarkeit solch fortgeschrittener Rechenwerkzeuge, die eine präzise Vorhersage der Faltung und thermodynamischer Eigenschaften ermöglichen, ist ein wesentlicher Vorzug der DNA-Nanotechnologie – sie erleichtert ein rationales Design, als dies bei anderen heute verfügbaren Techniken oder chemischen Verfahren möglich ist. Dennoch bestehen einige Einschränkungen, und so muss in vielen Fällen eine semi-heuristische Strategie verfolgt werden. Beim Entwurf bistabiler molekularer Schalter aus Aptameren könnte man beispielsweise durch die Zugabe einer niedermolekularen Verbindung das Gleich-

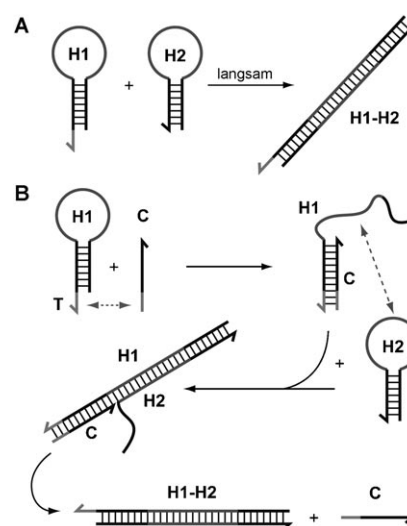
gewicht zwischen zwei Strukturen verschieben wollen. Der Einfluss dieser Verbindung muss im Allgemeinen durch einen Bindungs-Assay empirisch ausgewertet werden, und die Schalteigenschaften müssen durch eine manuelle Sequenzanpassung optimiert werden. Ähnliche Probleme treten auf, wenn mit modifizierten Nukleinsäuren gearbeitet wird, die nichtnatürliche Basen oder Interkalatoren enthalten. Hier muss der Schmelzvorgang der Doppelstränge experimentell untersucht werden, beispielsweise durch die Messung der Temperaturabhängigkeit des Absorptionsverhaltens.

Für In-vivo-Anwendungen ist die Stabilität und Kinetik von Nukleinsäure-Nanobauteilen in zellulärer Umgebung ein weiterer wichtiger Aspekt. In der dicht gedrängten zellulären Umgebung unterscheiden sich die effektiven Konzentrationen von denjenigen in Standardexperimenten in vitro, die in gut durchmischten Pufferlösungen durchgeführt werden. Dies führt zu Effekten wie Volumenausschluss (excluded volume) und osmotischem Druck, deren starker Einfluss auf Nukleinsäurestrukturen bekannt ist.<sup>[17]</sup> Beispielsweise lassen sich so genannte Dreiwegkreuzungen (three-way junctions)<sup>[18]</sup> oder G-Quadruplex-Strukturen in Telomeren<sup>[19]</sup> unter räumlicher Beengung (molecular crowding) stabilisieren.

### 2.1.2. Kinetik der Duplexbildung, Hybridisierungskatalysatoren und Strangverdrängung

Die Kinetik der Assoziation und Dissoziation von Strängen bestimmt das dynamische Verhalten von Nanobauteilen aus Nukleinsäuren. Bei hohen  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen oder in der Gegenwart von Magnesiumionen liegen typische Werte für die Hybridisierung komplementärer DNA-Sequenzen in der Größenordnung von etwa  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .<sup>[11]</sup> Folglich ist die Zeitskala der Bewegung von Nanobauteilen aus Nukleinsäuren, die durch Hybridisierungsreaktionen angetrieben wird – und typischerweise bei nano- (nm) oder mikromolaren Konzentrationen ( $\mu\text{M}$ ) stattfindet – im Bereich von Sekunden oder Minuten. In lebenden Zellen kann das Vorhandensein einer großen Zahl von Bindungspartnern die Kinetik beträchtlich verändern.<sup>[20]</sup>

Die Hybridisierungsgeschwindigkeit kann drastisch herabgesetzt sein, wenn Sekundärstrukturen auftreten. Haarnadelartige DNA-Moleküle mit komplementären Sequenzen etwa hybridisieren äußerst langsam, falls ihr doppelsträngiger Stamm genügend lang und die Haarnadelschleife genügend kurz ist. Tatsächlich ist die Steuerung der Hybridisierungsgeschwindigkeiten durch die Bildung und das Aufbrechen von Sekundärstrukturen wichtig für das Design von Reaktionsnetzwerken aus DNA, die im molekularen Computing und in der Robotik (Abschnitte 4 und 6) ihre Anwendung finden. Bei Anwendungen dieser Art wird die Hybridisierung zwischen zwei Strängen durch die Bildung einer Sekundärstruktur zunächst bewusst unterbunden. Während der Operation wird diese Struktur durch die Wahl geeigneter Hilfsstränge – so genannter Hybridisierungskatalysatoren (hybridization catalysts) – kontrolliert aufgebrochen.<sup>[21,22]</sup> Ein Beispiel für eine Hybridisierungskatalyse ist in Abbildung 2 gezeigt: Zwei DNA-Haarnadeln mit komplementären Sequenzen hybridisieren zuerst nur langsam miteinander. Ein DNA-Katalysator, der zum Stamm und einem Teil der



**Abbildung 2.** Das Prinzip der Hybridisierungskatalyse. A) Bis auf den einzelsträngigen Überhang von H1 sind die beiden Haarnadelmoleküle H1 und H2 von ihrer Sequenz her komplementär. Wegen sterischer Einschränkungen und der Stabilität der Stämme der Haarnadelschleifen hybridisieren H1 und H2 nur sehr langsam miteinander. B) Der Katalysestrang C, der zum Stamm von H1 komplementär ist, wird hinzugegeben. Er kann an den Fortsatz von H1 anbinden und die Haarnadel öffnen, wodurch die Schleifensequenz für eine Hybridisierung zugänglicher wird. H2 kann daher nun mit viel höherer Effizienz mit H1 hybridisieren und in einem letzten Schritt schließlich den Katalysator C wieder verdrängen.

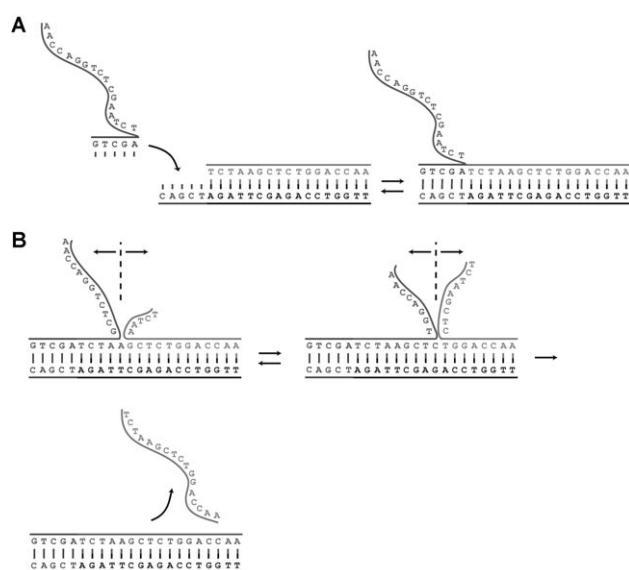
Haarnadelschleife komplementär ist, ermöglicht deren Öffnung. Dadurch werden die Nukleotide innerhalb der Schleife für die Hybridisierung mit der komplementären Haarnadel zugänglich. Bei letzterem Vorgang wird der Katalysatorstrang wieder von der Haarnadel verdrängt, wodurch er für einen weiteren Katalysezyklus verfügbar wird. Auf diese Weise lässt sich die Hybridisierungsgeschwindigkeit um mehrere Größenordnungen erhöhen.

Der Mechanismus der Hybridisierungskatalyse involviert verschiedene Strangverdrängungsreaktionen, bei denen zunächst der Katalysestrang in den Stamm einer Haarnadelschleife eindringt und später selbst durch einen komplementären Haarnadelstrang verdrängt wird. Strangverdrängungsreaktionen vollziehen sich über einen Prozess, der als Kreuzungspunktwanderung (branch migration) bezeichnet wird. Solche Reaktionen werden häufig für den Antrieb von Nukleinsäure-Nanoschaltern verwendet, wenn es notwendig ist, einen DNA- oder RNA-Strang wieder zu entfernen, der bereits an eine Nukleinsäurestruktur hybridisiert ist. Daher lässt sich die Strangverdrängung auch für Arbeitszyklen verwenden, die das mechanische Strecken und Entspannen – durch die Hybridisierung zweier Stränge bzw. durch das Entfernen eines Strangs aus einem Duplex – von Nanobauteilen umfasst.

Strangverdrängung durch Kreuzungspunktwanderung kann zwischen einer einzelsträngigen (ss)DNA und einer doppelsträngigen (ds)DNA im Prinzip jederzeit stattfinden, wenn der Einzelstrang eine Basenabfolge aufweist, die homolog zu einem der beiden Stränge aus dem Duplex ist: Thermische Fluktuationen bedingen, dass eine DNA-Doppelhelix an ihren Enden teilweise geöffnet sein kann – ein

Prozess, der als Fraying (etwa „Ausfransen“) bezeichnet wird. Ein freier, homologer Strang in der Lösung kann dieses Fraying nutzen, um an die komplementäre Sequenz innerhalb der Doppelhelix anzubinden. Das Resultat ist eine Struktur aus drei Strängen, in der zwei Stränge um die Anbindung an ihr Komplement konkurrieren. Der Verzweigungspunkt (branch point) – also der Ort, an dem sich die beiden homologen Stränge treffen – vollführt dann entlang der gesamten Länge des komplementären Strangs eine thermische Zufallsbewegung (random walk), bis einer der beiden konkurrierenden Stränge freigesetzt wird.<sup>[23]</sup>

Durch einen Trick von Yurke und Mills lässt sich der Vorgang der Strangverdrängung beträchtlich beschleunigen (Abbildung 3).<sup>[5,24]</sup> Wird einer der beiden Stränge eines



**Abbildung 3.** Strangverdrängung durch Kreuzungspunktwanderung. A) Um einen Strangverdrängungsprozess zu beschleunigen, lässt sich ein DNA-Doppelstrang um einen kurzen einzelsträngigen Überhang verlängern. Der von links hinzukommende DNA-Strang kann an diesen Fortsatz anbinden und damit eine Kreuzungspunktwanderung initiieren. B) Während der Kreuzungspunktwanderung konkurrieren die beiden DNA-Stränge mit der – vom Fortsatz abgesehen – identischen Sequenz um die Anbindung an den komplementären Strang. Durch den Fortsatz und das Anbinden des linken Strangs läuft die Kreuzungspunktwanderung gerichtet ab, sodass insgesamt eine Verdrängung des rechten Strangs begünstigt wird.

Doppelstrangs um eine kurze Sequenz verlängert, kann dieser einzelsträngige Überhang (toehold) als Nukleationskeim für die Anbindung eines komplementären Stranges dienen. Dabei entsteht eine verzweigte Struktur aus drei Einzelsträngen, sodass eine Kreuzungspunktwanderung stattfinden kann. In diesem Fall läuft dieser Prozess gerichtet ab, denn der lange Strang kann den kürzeren vollständig verdrängen; umgekehrt ist das hingegen nicht möglich, da der lange Strang durch seinen Überhang stets angebunden bleibt. Eine Strangverdrängung, die durch einen solchen Überhang beschleunigt wird (toehold-initiated strand displacement), funktioniert besonders gut, wenn die Dissoziationsrate von Überhang und Komplement viel kleiner ist als die der

Strangverdrängung. In der Praxis werden Überhangslängen von fünf bis sieben Basen verwendet.

Es muss darauf hingewiesen werden, dass eine Kreuzungspunktwanderung in dreiarmligen Strukturen sehr viel schneller abläuft als in viersträngigen Holliday-Strukturen.<sup>[25]</sup> Eine Kreuzungspunktwanderung in Holliday-Kreuzungen wird außerdem stark von der Magnesiumkonzentration beeinflusst, da  $Mg^{2+}$  die Stapelkonformation dieser Strukturen stabilisiert, in der die Kreuzungspunktwanderung nicht effizient abläuft.<sup>[26]</sup> Die Geschwindigkeit von Strangverdrängungsreaktionen wird darüber hinaus von der Gegenwart bestimmter kationischer Polymere beeinflusst, was bereits für den Betrieb von DNA-Nanomaschinen genutzt wurde (siehe Abschnitt 3.3).<sup>[27]</sup>

### 2.1.3. Mechanische Eigenschaften von Einzel- und Doppelsträngen

In ihrer B-Form ist doppelsträngige DNA ein helikales Molekül mit einem Durchmesser von 2 nm bei einem Abstand zweier benachbarter Basen von 0.34 nm. Die Ganghöhe der Helix beträgt etwa 10.5 Basen. Sowohl aus DNA-Cyclisierungsreaktionen<sup>[28]</sup> wie auch aus direkten mechanischen Messungen in magnetischen<sup>[29]</sup> bzw. optischen Fallen (magnetic traps bzw. optical tweezers)<sup>[30]</sup> oder durch hydrodynamisches Strecken<sup>[31]</sup> wurde die Persistenzlänge  $L_p$  von doppelsträngiger DNA zu 50 nm (150 Basenpaaren) bestimmt. Die Persistenzlänge ist ein Polymerparameter, der angibt, wie schnell ein Polymer seine tangentielle Orientierung ändert, wenn man seiner Kontur folgt.  $L_p$  ist direkt abhängig von der Biegesteifigkeit des Polymers. Auf der Nanometerskala unterhalb von  $L_p$  kann doppelsträngige DNA daher häufig einfach als steifes, stabartiges Molekül angesehen werden. Da DNA-Nanomaschinen typischerweise aus Strängen mit einer computergenerierten Zufallssequenz bestehen, ist die Annahme eines steifen Stabs typischerweise ebenfalls zutreffend. Dabei muss man allerdings beachten, dass sich die mechanischen Eigenschaften von dsDNA bei speziellen Sequenzen, wie den so genannten A-Tracts, drastisch ändern können. Wenn bei niedrigen Salzkonzentrationen die elektrostatische Abschirmlänge die Größenordnung der Abstände der Ladungen auf dem DNA-Rückgrat erreicht, wird ferner die Steifigkeit der DNA wegen der gegenseitigen Abstoßung der Ladungen zusätzlich erhöht.<sup>[32,33]</sup> Andererseits sind mehrwertige Ionen dazu in der Lage, die Persistenzlänge zu verkürzen.<sup>[33]</sup>

Die Persistenzlänge doppelsträngiger RNA wurde bisher weniger eingehend untersucht, aber neuere Experimente mit magnetischen Fallen und unter dem Rasterkraftmikroskop (AFM) lassen auf eine etwas größere Persistenzlänge von etwa 60 nm schließen.<sup>[34]</sup> Doppelsträngige RNA sowie DNA-RNA-Hybride nehmen die A-Form einer Doppelhelix ein, die mit 2.6 nm einen etwas größeren Durchmesser hat als die B-Form – bei einer Steighöhe von lediglich 0.24 nm pro Basenpaar. Die unterschiedlichen Abmessungen und mechanischen Eigenschaften müssen beispielsweise dann beachtet werden, wenn Hybridbauteile – also solche, die sowohl aus DNA als auch aus RNA bestehen – konstruiert werden sollen.

Einzelsträngige DNA ist bedeutend flexibler als doppelsträngige; allerdings werden die mechanischen Eigenschaften der ersteren in sehr viel stärkerem Maße von den Umgebungsbedingungen und der Sequenz beeinflusst. Für die Persistenzlänge werden Werte von 0.75 nm bei hohen Ionenstärken bis hin zu zehn Nanometern bei niedrigen Salzkonzentrationen berichtet.<sup>[35]</sup> Einige Sequenzen – beispielsweise poly(dA) – neigen wegen ihrer stärkeren Einzelstrang-Stapelwechselwirkungen zu einer höheren Steifigkeit als andere.

Bei den Pufferverhältnissen, unter denen Nukleinsäure-Nanoschalter üblicherweise betrieben werden, lässt sich jedoch in der Regel annehmen, dass einzelsträngige Moleküle recht flexibel sind, während doppelsträngige Moleküle eher steif sind. Dementsprechend werden flexible Verbindungen und „Gelenke“ aus einzelsträngiger RNA oder DNA, steife „Arme“ und Fortsätze hingegen aus doppelsträngiger DNA konstruiert.

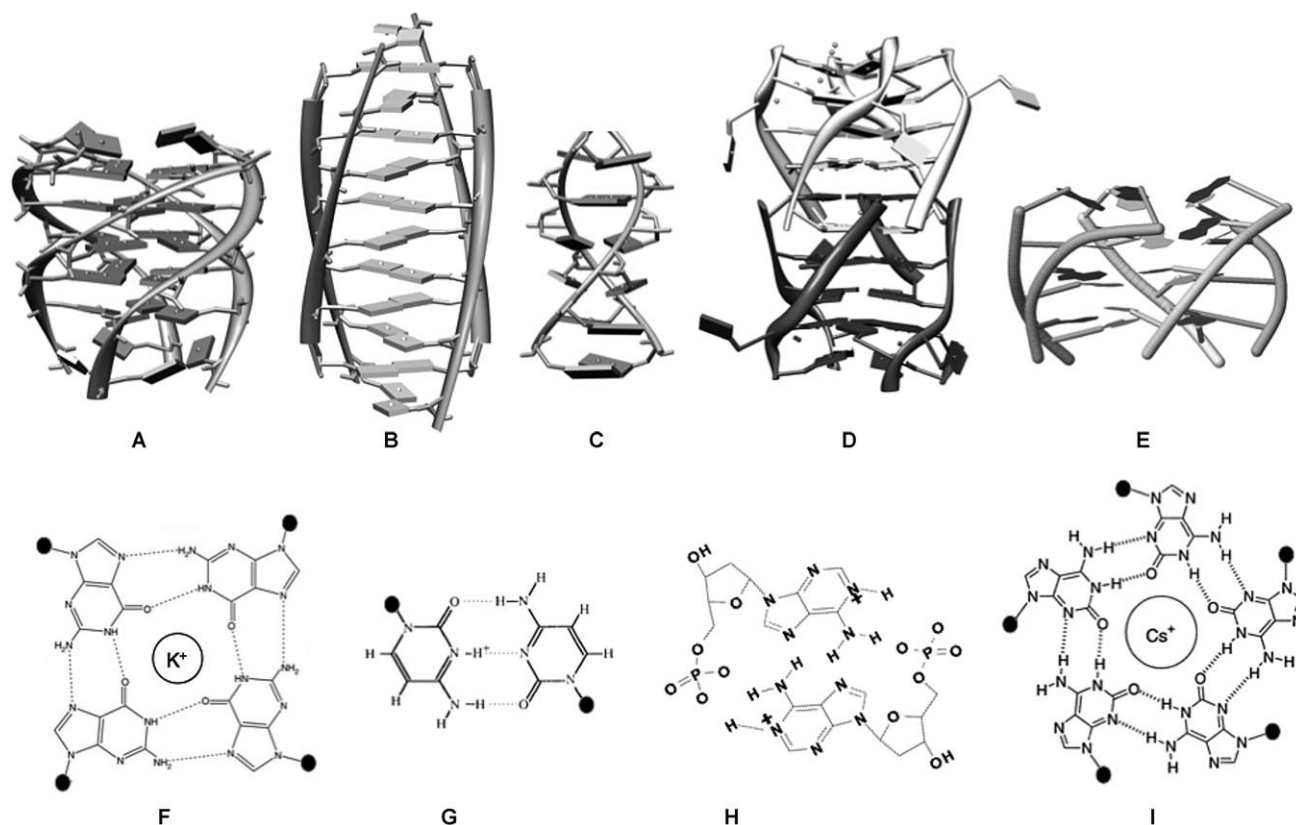
## 2.2. Ungewöhnliche Nukleinsäuremotive

### 2.2.1. DNA-Strukturen

Bei den ersten Untersuchungen zum Verständnis der Struktur, der Basenpaarungen und der Stapelwechselwirkungen bei DNA oder RNA wurden synthetische DNA- bzw.

RNA-Homopolymere verwendet, da diese als vereinfachte Modellsysteme angesehen wurden. Mit der Zeit offenbarte sich allerdings, dass diese synthetischen Homopolymere andersartige, ungewöhnliche Konformationen bilden, in denen auch Nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen vorkommen können. So konnte gezeigt werden, dass adeninreiche RNA und DNA parallele Duplexe ergibt, die als A-Motiv bezeichnet werden (Abbildung 4C);<sup>[36,37]</sup> C-reiche RNA- und DNA-Sequenzen bilden sog. i-Tetraplexe – i-Motive – (Abbildung 4B),<sup>[38]</sup> G-reiche RNA-<sup>[39]</sup> und DNA-Sequenzen hingegen G-Quadruplexe (Abbildung 4A; ein hervorragender Übersichtsartikel zu diesem Thema ist Lit. [40]). G-Quadruplexe werden von vielen Forschern als Zielstrukturen für Tumortheraeutika angesehen<sup>[41]</sup> und haben sich daher als eines der interessantesten Targets für niedermolekulare Molekülbinder<sup>[42]</sup> oder für das Protein-Engineering erwiesen.<sup>[43]</sup> Quadruplexe und i-Motive werden auch von Nukleinsäure-Analoga<sup>[44]</sup> und von entsprechenden DNA-RNA-Hybriden gebildet.<sup>[45]</sup> Einige ungewöhnliche Strukturen, die von diesen Vierstrangmotiven inspiriert wurden und deren Potenzial als strukturdirektierende Elemente und für das funktionelle „molekulare Display“ bislang ungenutzt blieb, sind in Abbildung 4 zu sehen.

Eine GU-reiche Sequenz bildet eine oktamere Struktur, bei der G- und U-Tetraden auf eine Weise interkalieren, die dem i-Motiv ähnlich ist, wodurch sich jeweils acht „Us“ in



**Abbildung 4.** Ungewöhnliche Strukturen – inspiriert von viersträngigen DNA-Motiven: A) tetramolekularer G-Quadruplex;<sup>[46]</sup> B) i-Motiv;<sup>[38]</sup> C) bimolekulares A-Motiv;<sup>[37]</sup> D) ein Oktaplex aus r(UGUGGU), der interkalierte G- oder U-Tetraden enthält, bei dem sich acht „Us“ in einer geordneten räumlichen Orientierung zeigen;<sup>[41]</sup> E) ein Pentaplex aus Strängen, die Isoguanine enthalten;<sup>[42]</sup> F)–I) zugehörige Basenpaarungs-Schemata: F) G-Tetraden, G) C-C<sup>+</sup>-Basenpaar, H) AH<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>A-Basenpaar, I) iG-Pentade.

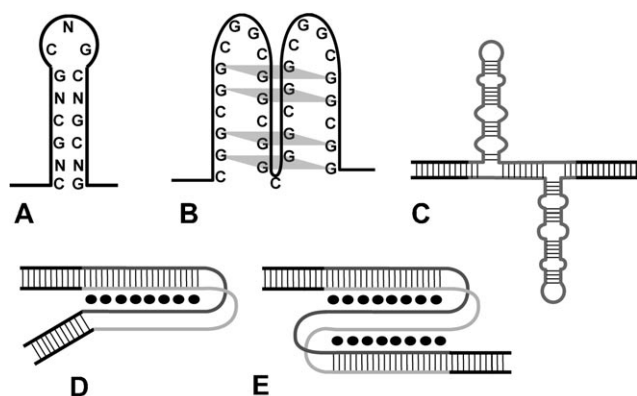


einer geordneten räumlichen Orientierung zeigen (Abbildung 4D).<sup>[41]</sup> Verwendet man Isoguanin (iG) und verkleinert man den Winkel, unter dem sich die Watson-Crick- und Hoogsteen-Wasserstoffbrücken-Bindungsstellen zeigen, lassen sich auch iG-basierte Pentaplexe konstruieren (Abbildung 4E).<sup>[47]</sup> Triplexe sind dreisträngige Nukleinsäure-Strukturen, die von Felsenfeld et al. entdeckt wurden<sup>[48]</sup> und bei denen der dritte DNA- oder RNA-Strang über eine Wasserstoffbrücke mit der Hoogsteen-Seite der Nukleobase in der großen Furche der DNA, RNA oder des RNA-DNA-Duplexes untergebracht ist.<sup>[49]</sup> Ausgezeichnete Übersichtsartikel über Triplexstrukturen finden sich in Lit. [50].

Natürlich vorkommende DNA-Sequenzen bieten einen Fundus ungewöhnlicher Strukturen. Viele Genome, die ausgedehnte, repetitive Sequenzen aufweisen, bilden eine Vielzahl ungewöhnlicher Motive (Abbildung 5) – so wie die unvollständige Haarnadel, die aus  $(\text{CNG})_n$ -Wiederholungen besteht (Abbildung 5A), G-Quartette aus  $(\text{CGG})_n$ -Wiederholungen (Abbildung 5B), sog. „slip-stranded DNA“<sup>[51]</sup> (Abbildung 5C) und verschiedene Triplexe aus  $(\text{GAA})_n$ -Wiederholungen (Abbildung 5D,E). In der Zelle sind Triplexe in Form des ungewöhnlichen H-DNA-Motivs vorhanden, deren Bildung wahrscheinlich das sog. „DNA supercoiling“ moduliert oder selbst davon moduliert wird<sup>[52]</sup> – möglicherweise sogar in Form des DNA-Knoten-Motivs (nodule DNA motif).

### 2.2.2. Ungewöhnliche RNA-Strukturen

Die Kristallstrukturen von tRNA-Molekülen haben unsere Wahrnehmung der RNA-Struktur grundlegend verändert: Plötzlich schien RNA nicht nur zu Watson-Crick-Basenpaarungen und damit zur Bildung einer A-Helix fähig zu sein, sondern ebenso zu nichtkanonischen Basenpaarungen, tertiären Wechselwirkungen, Interkalation, koaxialen Stapeln, Basentripeln und Metallionenbindung. Die Kristallstrukturen vieler großer RNA-Moleküle<sup>[53]</sup> erweiterten die



**Abbildung 5.** Auch repetitive DNA-Sequenzen in Genomen können ungewöhnliche Motive bilden, z. B. A) fehlgepaarte Haarnadeln, B) G-Quartett-basierte Strukturen, C) „verrutschte“ DNA (slip-stranded DNA), D) H-DNA (mit Triplex) – hier deuten die hell- bzw. dunkelgrauen Bereiche Purin- oder Pyrimidin-reiche Sequenzen an –, E) DNA-Knoten, bei dem ein Einzelstrang, der wie in (D) über einen Triplex hinausragt, zum dritten Strang eines benachbarten Triplex wird und umgekehrt.

strukturellen Basismotive und zeigen auf, wie diese ungewöhnlichen Arten von Nukleobasenassoziation für die dreidimensionale Gesamtarchitektur eines RNA-Strangs verantwortlich sind. Die Sekundärstruktur von RNA lässt sich vereinfacht als eine Kombination aus Doppelhelices und verschiedenen Schleifentopologien beschreiben. Letztere führen zu Haarnadeln (hairpins), internen Schleifen (internal loops) und Kreuzungsschleifen (junction loops).<sup>[54,55]</sup> Wiederkehrende Sekundärstrukturelemente wurden in der „Structural Classifications of RNA (SCOR) Database“ klassifiziert.<sup>[56]</sup> Sequenzvergleiche zwischen rRNA-Molekülen enthüllten drei Klassen von überproportional häufig vertretenen Schleifenendmotiven, die aus vier Nukleotiden oder „Tetraloops“ bestehen – die UNCG-, GNRA- und CUYG-Klassen.<sup>[57]</sup> Interne Schleifenmotive schließen sog. Cross-Strand-Purinastapel, ausbeulende G-Motive (bulged G motifs), A-Ebenen (A platforms), Bulge-Helix-Bulge-Motive und Metallbindungsmotive ein.

### 2.2.3. Tertiäre RNA-Struktur motive

Proteinketten, gefaltet zu  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern, neigen dazu, globulär zu falten, wogegen RNA-Ketten, zu Helices gewunden, aufgrund von tertiären Wechselwirkungen bevorzugt flache, pfannkuchenartige Strukturen bilden.<sup>[54]</sup> Zwei wesentliche Struktur motive, die hierzu beitragen, sind das koaxiale Stapeln<sup>[58]</sup> und die Bildung von Pseudoknoten (beschrieben von Burkhard, Turner und Tinoco in Lit. [59]). Tertiäre Wechselwirkungen mit ungewöhnlichen Basenpaarungen werden üblicherweise über Wechselwirkungen zwischen RNA-Schleifen (loop-loop interactions) vermittelt. Externe Schleifen oder Haarnadelschleifen sind oft an tertiären Wechselwirkungen wie den GNRA-Tetraloop-Rezeptor,<sup>[60]</sup> „kissing hairpins“,<sup>[61]</sup> D-T-Schleifen (D-loop-T-loop)<sup>[62]</sup> und Einzelpaar-Dreierschleifen (lonpair triloop) beteiligt.<sup>[63]</sup> Viele interne Schleifenmotive stören effektiv die Orientierung der Helix, in die sie eingebettet sind, durch helikales Entwinden (helical unwinding) oder durch die Erzeugung eines Winkels zwischen den Helixachsen. Beispiele schließen hier geknickte Windungen (kink turns),<sup>[64]</sup> Hakenwenden (hook turns),<sup>[65]</sup> und Adenosinebenen (adenosine platforms) ein.<sup>[66]</sup> Weitere Beispiele tertiärer Wechselwirkungen sind das Ribosereißverschluss- (ribose zipper),<sup>[67]</sup> das A-Minor<sup>[68]</sup> und das G-Ribo-Motiv.<sup>[69]</sup> Der Mangel an RNA-Kristallstrukturen hat bislang die Identifizierung und Klassifizierung von ungewöhnlichen Motiven erschwert – dies aber ist zur Formulierung generalisierter RNA-Architekturprinzipien und zur Identifizierung allgemein verbreiteter Faltungselemente von entscheidender Bedeutung.

## 2.3. Funktionale Nukleinsäuren

### 2.3.1. Aptamere

Ein Aptamer ist eine Nukleinsäuresequenz (RNA oder DNA) einer Länge von typischerweise 15–40 Nukleotiden oder mehr, die spezifisch an ein gegebenes molekulares Zielobjekt anbindet.<sup>[6,70]</sup> In Lösung faltet sich die Nukleinsäuresequenz in eine spezifische molekulare Gestalt. Diese



Gestalt ermöglicht es dem Aptamer, eine entsprechend spezifische Bindungsstelle für das Zielmolekül zu bilden. Bei manchen Varianten ist das Aptamer *allein* lediglich vorgefaltet – erst das Zielmolekül induziert die Bildung der korrekten Aptamerstruktur. Nukleinsäureaptamere für ein molekulares Zielobjekt werden „selektiert“ und sind schon nach einigen Runden der Auswahl *in vitro* identifizierbar. Die *In-vitro*-Selektion ermöglicht die Identifizierung dieser seltenen, funktionalen RNA- oder DNA-Moleküle aus einem Pool von zunächst typischerweise  $10^{15}$  verschiedenen Sequenzen. Im Anschluss an den Selektionsprozess wird ein gegebener Pool von Nukleinsäuren durch die molekularbiologischen Verfahren der reversen Transkription und der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) vervielfältigt. Das molekulare Zielobjekt wird auf einem festen Substrat immobilisiert, und der Pool von  $10^{15}$  Sequenzen wird daran vorbeigeführt. Die zurückbleibende RNA wird eluiert, revers transkribiert und durch PCR vervielfältigt; dieser Vorgang wird im Anschluss mit fortschreitend höherer Stringenz wiederholt. Er wird als SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential amplification) bezeichnet – zu deutsch „systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Vervielfältigung“<sup>[71]</sup> – und ermöglicht die Identifizierung von denjenigen Sequenzen, die eine hohe Bindungsaffinität zeigen.

Durch die enorme Zahl von möglichen Permutationen an Sequenzen ist das Nukleinsäuregerüst zur Bildung außerordentlich vielfältiger molekularer Gestalten fähig. Daher sind Aptamere bereits für eine Myriade von Zielmolekülen gewonnen worden – darunter fallen niedermolekulare Verbindungen, Toxine, Reaktionsintermediate, buchstäblich jede Art von Proteinen und sogar ganze Zellen. Zusätzlich zu ihrer überragenden Spezifität binden Aptamere im Allgemeinen überdies mit sehr hoher Affinität an ihre Zielobjekte; die Mehrheit weist Dissoziationskonstanten  $K_d$  auf, die für Proteine in der nanomolaren und für niedermolekulare Verbindungen in der mikromolaren Größenordnung sind. Da Aptamere aus kurzen Nukleinsäuresequenzen bestehen, haben sie gegenüber Antikörpern – also großen Proteinen – zahlreiche Vorzüge: Im Unterschied zu letzteren sind Aptamere der *In-vitro*-Synthese zugänglich; dies führt zu einer geringen Variabilität zwischen verschiedenen Zubereitungen. Aptamere lassen sich einfach markieren, ohne damit die Affinität zum Zielobjekt zu beeinflussen,<sup>[72]</sup> sind widerstandsfähiger gegen die Temperatur und nichtideale Umgebungsbedingungen und haben daher insgesamt eine längere Lebensdauer. Es gibt viele Verfahren, um ungewünschte Nebenreaktionen zu reduzieren oder sogar vollständig zu unterdrücken – und Aptamere können sogar unter nichtphysiologischen Bedingungen selektiert werden. Aus diesem Grunde ersetzen Aptamere in einer Reihe von biologischen Nachweistests zunehmend Antikörper (siehe Abschnitt 7.1).

Das niedrige Molekulargewicht von Aptameren stattet sie mit exzellenten pharmakologischen Eigenschaften wie kurzen Zirkulationszeiten, einer besseren Zieladressierbarkeit und einem raschen Abtransport aus. Daher wächst ihre Bedeutung in der molekularen Therapeutik, wo sie ebenfalls Protein-Antikörper nach und nach ablösen (siehe Abschnitt 7.3). Trotz eines zehnfach niedrigeren Molekularge-

wichts binden Aptamer-Antikörper ihr Zielobjekt mit vergleichbaren Affinitäten und Spezifitäten, wobei ihre immunogene Aktivität wesentlich geringer als die echter Antikörper ist. Wegen ihrer Zugänglichkeit für die chemische Synthese und ihrer uniformen Qualität eignen sich Aptamere auch besser für die kommerzielle Produktion. Das Aufkommen chemischer Nukleinsäureanaloge und die Anwendbarkeit von Verfahren der Festphasensynthese stellen sicher, dass Aptamere diverse chemische Modifikationen erhalten können, mit denen eine Feinabstimmung ihrer Stabilität und ihrer Zirkulationszeiten möglich ist; ein Überblick hierzu wurde von Pestourie et al. gegeben.<sup>[73]</sup>

### 2.3.2. Ribozyme und DNAzyme

Die Entwicklung von Aptameren für Metallionen bleibt eine schwierige Aufgabe, hauptsächlich wegen des Mangels an geeigneten Werkzeugen zur Immobilisierung. Die katalytische Aktivität einiger Nukleinsäure-basierter Enzyme jedoch zeigt eine Abhängigkeit von bestimmten Metallionen. Solche katalytischen RNA-Moleküle kommen entweder natürlicherweise vor (eine exzellente Übersicht bietet Lit. [74]) oder werden mit SELEX-artigen Ansätzen<sup>[6]</sup> evolviert. Pendants aus DNA werden als DNAzyme<sup>[75]</sup> bezeichnet und sind bisher ausschließlich künstlich erzeugt worden. Da besonders RNA sich zu komplexen dreidimensionalen Strukturen falten kann, bietet sie ein formbares Grundgerüst zur Entwicklung von katalytischen Zentren und Bindungstaschen. Eine große Zahl von neuartigen RNA- und DNAzymen katalysiert Phosphoester-Transferreaktionen und wurde unlängst ausführlich besprochen.<sup>[6]</sup> Die Substrate der meisten natürlich hervorgegangenen Ribozyme sind ihrerseits ebenfalls RNA-Stränge. Im Unterschied dazu zeigen die künstlich entwickelten DNA- und RNAzyme die Fähigkeit, eine Vielzahl von Reaktionsarten<sup>[76]</sup> (wie Diels-Alder-Reaktionen,<sup>[77]</sup> Aldolreaktionen,<sup>[78]</sup> Michael-Additionen,<sup>[79]</sup> die Bildung von N-glycosidischen Bindungen<sup>[80]</sup> und Acetylierungen<sup>[81]</sup>) zu katalysieren. Viele RNA- und DNAzyme ahmen auch die katalytische Funktion von echten Enzymen nach, darunter die der Cholesterol-Esterase,<sup>[82]</sup> der N-Glycosylase,<sup>[83]</sup> des sog. „AMP-Cappings“<sup>[84]</sup> oder der Guanylyl-Transferase.<sup>[85]</sup> Funktionale Nukleinsäuren finden außerdem zunehmend Anwendung in der Sensorik,<sup>[86,87]</sup> dem molekularen Rechnen (molecular computing),<sup>[88]</sup> dem zielgerichteten Wirkstoff-Transport (targeted delivery) und der Therapeutik.<sup>[89]</sup>

Es gibt viele Beispiele, bei denen funktionale Einheiten von Aptameren und Ribozymen zu allosterischen Aptameren oder „Aptazymen“ kombiniert werden (siehe Abschnitt 7.1). Bei Proteinen wird allosterisches Verhalten durch die Kommunikation räumlich getrennter Bindungsstellen vermittelt, bei denen eine Konformationsänderung durch das Binden eines Effektormoleküls an einer der Bindungsstellen ausgelöst wird. Das gleiche Prinzip lässt sich auf die Konstruktion von allosterischen Ribo- und Aptazymen übertragen. Solche Strukturen sind im Zusammenhang mit molekularer Informationsverarbeitung, der Signalübertragung und auch in der Biosensorik von beträchtlichem Interesse (Abschnitte 6 und 7).<sup>[90,91]</sup>

## 2.4. Sequenzdesign von DNA

Für den Entwurf artifizierlicher Strukturen aus Nukleinsäuren ist eine Vielzahl von Strategien entwickelt worden.<sup>[92]</sup> Nach Dirks et al.<sup>[93]</sup> lassen sich „positive“ und „negative“ Designansätze unterscheiden. Dem positiven Ansatz folgend wird versucht, die Affinität einer Nukleinsäuresequenz derart zu optimieren, dass sie in eine vorgegebene Zielstruktur faltet. Beim negativen Ansatz ist das Ziel, ungewollte Strukturen zu vermeiden, d.h. die Spezifität für das Zielmolekül zu optimieren. Der zweite Ansatz wird häufig bei heuristischen Methoden verwendet, wie der Minimierung der Sequenzsymmetrie, bei der die Wiederholung von Subsequenzen gewisser Länge ausgeschlossen wird. Beide Methoden haben jedoch auch Nachteile: Beispielsweise kann eine Sequenz, die nach der positiven Entwurfstrategie ausgewählt worden ist, die höchste Affinität zum Zielmolekül aufweisen; es ist aber nicht ausgeschlossen, dass sie eine alternative Struktur mit einer noch niedrigeren freien Enthalpie hat. Gestützt durch ausführliche kinetische Faltungssimulationen kamen Dirks et al. zum Ergebnis, dass die negative Entwurfstrategie im Allgemeinen bessere Ergebnisse liefert als die positive – die beste Variante ist freilich die Ergänzung eines negativen Ansatzes um eine positive Komponente. Dies gelingt z.B., wenn die Sequenzwahl auf Grundlage der thermodynamischen Zustandssumme einer Nukleinsäuresequenz geschieht, um die Wahrscheinlichkeit zu maximieren, mit der die Sequenz in die gewünschte Struktur faltet. Für RNA-Nanostrukturen wurde von Jaeger und Mitarbeitern eine heuristische Strategie entwickelt,<sup>[94]</sup> die die Strukturdaten natürlich vorkommender RNA-Moleküle für den Entwurf von künstlichen Konstrukten nutzt.

## 2.5. DNA-Synthese

Molekulare Schalter und Maschinen wurden bereits aus den verschiedensten Arten organischer und anorganischer Moleküle – oder aus deren supramolekularen Komplexen – konstruiert.<sup>[9]</sup> Einer der größten Vorzüge von Nukleinsäurebasierten Bauteilen gegenüber allen anderen Ansätzen ist ihre einfache Verfügbarkeit. Angetrieben durch den wachsenden Bedarf an künstlichen Oligonukleotiden in den Lebenswissenschaften wurde die Synthese von DNA und RNA in den zurückliegenden Jahrzehnten vollständig automatisiert, mit der Folge kontinuierlich zurückgehender Synthesekosten. Die DNA-Nanotechnologie ist hier ein klarer Nutznießer: Eine günstige und automatisierte Synthese ermöglicht auch Forschern ohne eigene Synthesemöglichkeiten, Forschung im Bereich der DNA-Nanotechnologie zu betreiben. Daher ist die Entwicklung neuartiger Strukturen und Nanomaschinen bereits jetzt eher eine Design- als eine Synthesaufgabe. Im Prinzip ist heutzutage eine vollständige Automatisierung des Herstellungsprozesses vorstellbar – Nanostrukturen und -bauteile, am Rechner entwickelt und validiert, lassen sich direkt in DNA-Sequenzen übersetzen, die sich ihrerseits vollautomatisch synthetisieren und zusammensetzen lassen.

## 3. Molekulare Schalter aus DNA

Molekulare Schalter auf DNA-Basis sind Anordnungen aus DNA, die sich gezielt reversibel zwischen zwei oder mehr Zuständen hin- und herschalten lassen. Externe Stimuli für den Übergang von einem Zustand in den anderen können z.B. Photonen, Temperatur, Druck, magnetische oder elektrische Felder, aber auch Veränderungen in der chemischen Umgebung sein. Demgemäß werden DNA-Anordnungen dazu gebracht, ihren Zustand als Antwort auf eine Temperaturänderung,<sup>[95]</sup> Photoisomerisierung,<sup>[96–98]</sup> die Gegenwart verschiedener Ionen<sup>[99]</sup> – oder deren Verschwinden – und das Binden an Proteine zu verändern.<sup>[100,101]</sup> Eine besondere Rolle spielen hierbei Konformationsänderungen, die von sequenzspezifischen Hybridisierungsreaktionen bewirkt werden – diese sind hochspezifisch und ermöglichen die präzise Adressierung eines bestimmten Zustands oder Schalters unter anderen. In vielen Fällen schlägt sich die Multistabilität in veränderten Eigenschaften der Anordnung nieder – wie der Fluoreszenz, einem Elektronentransfer, einer Isomerisierung, mechanischen Eigenschaften oder der chemischen Reaktivität, was sich für verschiedene Anwendungen nutzen lässt, wie in Abschnitt 4.7 diskutiert werden wird.

### 3.1. Molecular Beacons

Molecular Beacons (MBs) gehören zu den ersten und einfachsten, aber dennoch erfolgreichsten molekularen DNA-Bauteilen, die bisher konstruiert wurden.<sup>[7,8]</sup> Bei MBs handelt es sich um Strukturen aus einer einzelsträngigen Haarnadelschleife in Verbindung mit einem sich daran anschließenden, doppelsträngigen Stamm, dessen Enden jeweils mit einem Fluorophor und einem Quencher-Molekül (Löschermolekül) modifiziert sind. In der Haarnadelkonformation befinden sich Fluorophor und Quencher in unmittelbarer Nähe, die Fluoreszenzemission des MB ist gering. In Gegenwart von DNA- oder RNA-Strängen, die komplementär zur Schleifensequenz sind, wird die Haarnadel jedoch entfaltet und bildet zusammen mit dem Komplement einen Doppelstrang. In dieser Konformation sind Fluorophor und Quencher räumlich getrennt, was zu einem starken Anstieg der Fluoreszenz führt. Die Stabilität von MBs lässt sich hinsichtlich der Empfindlichkeit und eines raschen Antwortverhaltens durch die Wahl einer geeigneten Schleifengröße und Stammlänge optimieren. Diese einfache sensorische Strategie hat eine Vielzahl von Anwendungen gefunden und wird für eine große Zahl von Aufgaben eingesetzt. Diesbezüglich sei auf den hervorragenden Übersichtsartikel von Tan und Mitarbeitern verwiesen<sup>[8]</sup> (siehe außerdem Abschnitt 7.1). Einige Aspekte von MBs sind im Zusammenhang mit Nukleinsäuremaschinen bedeutsam: Zunächst einmal werden entsprechende fluoreszenzbasierte sensorische Strategien zur Charakterisierung vieler der nachfolgend diskutierten Bauteile genutzt. Darüber hinaus sind Haarnadeln ein wichtiges minimales Strukturelement vieler DNA-Maschinen. Schließlich ist die präzise Steuerung von Stabilität und Schaltkinetik von Haarnadelschleifen – wie in Abschnitt 2.1 bereits diskutiert –

die Grundlage für die Funktion vieler DNA- oder RNA-basierter Schalter, Maschinen und Motoren.

### 3.2. Pufferabhängige molekulare Schalter

Das erste Beispiel eines künstlich konstruierten nanomechanischen Schalters – auch wenn er zu seiner Zeit nicht als solcher bezeichnet wurde – veröffentlichten Seeman und Mitarbeiter 1998.<sup>[102]</sup> Hier wurde die Position einer DNA-Viererkreuzung (four-way junction), die innerhalb eines zirkulären DNA-Moleküls eingebettet war, durch die Veränderung des Grades an „Supercoiling“ der zirkulären DNA bewegt. Bereits in dieser Arbeit wurde vorgeschlagen, die Bewegung der Kreuzung durch einen Übergang von der B- in die Z-Struktur zu steuern. Die linkshändige Z-Form doppelsträngiger DNA wird in Gegenwart bestimmter kationischer Komplexe wie Hexammincobalt(III),  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ , von Sequenzen eingenommen, in denen Purine und Pyrimidine alternieren. Der Konformationswechsel von einer rechts- zu einer linkshändigen DNA lässt sich zur Erzeugung eines Drehmoments oder einer Drehbewegung nutzen. 1999 demonstrieren Mao, Seeman et al. das erste nanomechanische Bauteil, das auf diesem Übergang beruht.<sup>[4]</sup> In dieser „B-Z-Nanomaschine“ sind zwei DNA-Doppelkreuzungsstrukturen (double-crossover DNA structures) durch einen Doppelstrang der Sequenz  $(\text{CG})_{10}$  verbunden, die C5-methyliertes Cytosin enthält und die für den B-Z-Übergang besonders anfällig ist.<sup>[103]</sup> Der Übergang wird durch die Änderung der  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Konzentration von 0 auf 0,25 mM ausgelöst. Durch den B-Z-Übergang des  $d(\text{CG})_{10}$ -Abschnitts wird eine Doppelkreuzungs(DX)-Einheit bezüglich der jeweils anderen um 3,5 Helixwindungen gedreht. Die hierdurch bedingte Abstandsänderung zwischen den verschiedenen Einzelelementen wird durch FRET-Experimente beobachtet<sup>[104]</sup> – seit langem eine analytische Standardtechnik in diesem Feld. FRET (resonanter Fluoreszenzenergietransfer) ist der strahlungslose Transfer von Anregungsenergie eines Fluorophors auf einen anderen – oder zu einem nichtfluoreszierenden Quencher, so wie er in MBs Anwendung findet –, der über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen vermittelt wird. Ein solcher Energietransfer führt zu einer reduzierten Fluoreszenzintensität des Donor-Fluorophors und einer erhöhten Intensität des Akzeptors. Als Funktion des Abstands  $R$  zwischen Donor und Akzeptor fällt die Transfereffizienz mit  $1/(1+(R/R_0)^6)$ , wobei der charakteristische Abstand  $R_0$  – der Förster-Radius – sich typischerweise im Bereich weniger Nanometer bewegt. In FRET-Experimenten werden die Donor- und Akzeptormoleküle an diejenigen Teilen des untersuchten Moleküls angebracht, deren (erwartete) nanoskalige Distanzänderung beobachtet werden soll. In jüngeren Arbeiten wurde der B-Z-DNA-Strukturschalter verwendet, um die Fluoreszenzeigenschaften von Pyren-funktionalisierten Nukleobasen zu modulieren.<sup>[105]</sup>

#### 3.2.1. Schalten mit Magnesium

Eine einfache Form der nanoskaligen Bewegung erreichten Niemeyer und Mitarbeiter durch magnesiumindu-

ziertes DNA-Supercoiling.<sup>[106]</sup> Zu diesem Zweck wurden Netzwerke aus dsDNA synthetisiert, die über Biotin-Streptavidin-Linker verbunden waren. In Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$  können in diesen Netzwerken zwei benachbarte DNA-Doppelstränge in eine Supercoil-Struktur kondensieren. Die resultierende Änderung in der Netzwerkstruktur lässt sich unter dem Rasterkraftmikroskop (AFM) beobachten.

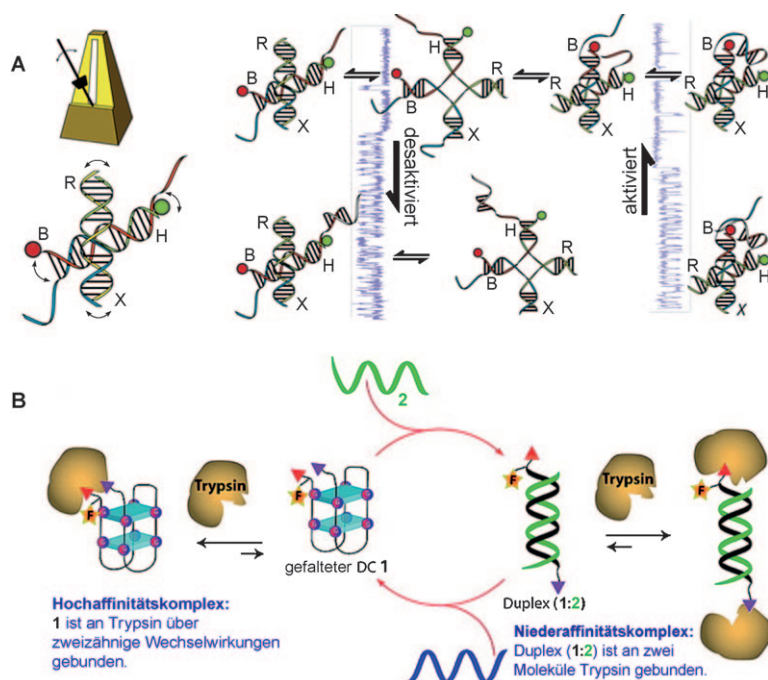
Ein etwas aktuelleres Beispiel eines Schalterdesigns, das das Motiv der Holliday-Kreuzung miteinbezieht, moduliert diese in der Weise eines nanoskaligen Metronoms.<sup>[107]</sup> In Gegenwart zweiwertiger Metallionen wie  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\geq 100 \mu\text{M}$ )<sup>[108]</sup> faltet sich die Holliday-Kreuzung in eine kompakte Konformation, die als gestapelte X-Struktur bezeichnet wird. Es gibt jedoch zwei alternative Konformationen, und die Holliday-Kreuzung kann zwischen beiden hin- und herkippen, was entfernt an die Bewegung eines Metronoms erinnert (Abbildung 6A). Das Ticken des Metronoms kann von einem Aktivator- oder Desaktivatorstrang, der an die Anordnung hybridisieren kann, beeinflusst werden, wobei sich der Rhythmus durch die Veränderung der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration steuern lässt. Da die Übergänge des Tickens zufällig geschehen, musste die Dynamik des Metronoms statt durch Ensemblemessungen mit Einzelmolekül-FRET-Messungen charakterisiert werden.

Magnesiumionen sind auch entscheidend für das korrekte Falten von großen, strukturierten RNA-Molekülen. Diese Eigenschaft wurde z.B. genutzt, um die  $\text{Mg}^{2+}$ -gesteuerte Faltung und Entfaltung des Ribozyms von *Tetrahymena* zu steuern, das wiederum die Bildung und Dissoziation einer kurzen DNA-Doppelhelix beeinflussen konnte.<sup>[99]</sup> Auch andere zweiwertige Metallionen, wie etwa  $\text{Zn}^{2+}$ , können verwendet werden, um ternäre DNA-Anordnungen zwischen der M- und B-DNA-Form hin- und herzuschalten.<sup>[109]</sup>

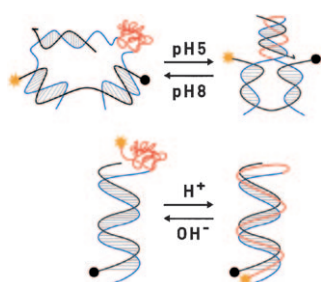
#### 3.2.2. Schalten von Triplexen

Es wurden auch Strukturen konstruiert, die pH-gesteuert von einer Duplex- in eine Triplexformation und umgekehrt übergehen können. Mao et al. entwarfen einen ternären Komplex mit einem GC-reichen Duplex und einer unstrukturierten C-reichen Domäne (Abbildung 7, Darstellung in Rot).<sup>[111]</sup> Vor dem Umschlag ins Saure liegt die C-reiche Domäne protoniert vor und wird von der großen Furche der GC-reichen Duplexdomäne aufgenommen. Die Bildung eines  $\text{C}^+\text{G-C}$ -Triplexes bewirkt ein Zusammenziehen der Struktur, wobei zwei Fluorophore in räumliche Nähe gebracht werden, so wie es Abbildung 7A zeigt. Eine ähnliche Strategie wurde von der Gruppe um Samorì verwendet, um ein einfaches Duplexsystem mit einem C-reichen Überhang zu erhalten, das bei niedrigem pH-Wert wieder in die große Furche der Helix zurückfaltet (Abbildung 7B).<sup>[112]</sup> Der Rückfaltungsmechanismus eines C-reichen Überhangs wurde auch zur Steuerung von chemischen Reaktionen zwischen reaktiven Gruppen auf solchen DNA-Schaltern verwendet (siehe Abschnitt 5.4).<sup>[113]</sup> Der pH-induzierte Übergang eines Duplexes in einen Triplex wurde zur reversiblen Anordnung von Goldnanopartikeln in Clustern genutzt.<sup>[114]</sup> Ein neueres Beispiel einer Struktur, die von einer Einzelhelix in eine doppelhelikale parallele Duplexanordnung – ebenfalls pH-





**Abbildung 6.** A) Die Manipulation der Konformation einer Holliday-Kreuzung durch Zugabe von  $Mg^{2+}$ -Ionen und einem Aktivatorstrang ergibt ein Bauteil, das wie ein nanoskaliges Metronom funktioniert (linke obere Ecke).<sup>[107]</sup> B) Ein Oligonukleotid in Form eines G-Quadruplexes positioniert Liganden in einer zweizähligen Weise, wodurch kooperatives Binden an das Zielprotein erreicht wird. DC = DNA-small molecule chimera.<sup>[110]</sup> Wiedergabe mit Genehmigung der American Chemical Society.



**Abbildung 7.** Zwei Beispiele für molekulare Schalter, die die Fähigkeit C-reicher Sequenzen zur Triplexbildung nutzen (rot); unter sauren Bedingungen werden diese Sequenzen protoniert und bilden einen CG-C<sup>+</sup>-Triplexstrang.<sup>[111,113]</sup> Die Konformationsänderungen werden mithilfe eines FRET-Vorgangs zwischen einem Fluorophor (gelber Stern) und einem Quencher-Molekül (schwarz) beobachtet.

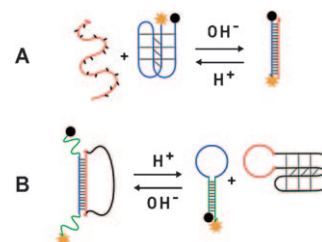
gesteuert – schalten kann, beruht auf dem Falten kurzer polyd(A)-Segmente in A-Motive; dieser Vorgang läuft bemerkenswert schnell ab.<sup>[37]</sup>

### 3.2.3. i-Motiv-Schalter

Ein wichtiges Ergebnis des Jahres 2002 war die Konzeption und Validierung des Übergangs von B-DNA in einen G-Quadruplex als Nanoschalter, was unabhängig voneinander in den Gruppen um Mergny und Tan geschah.<sup>[115]</sup> Eine B-DNA mit einem G-reichen Strang, der zur Bildung von G-Quadruplexen neigt, verfügt notwendigerweise auch über

einen C-reichen Strang, der das i-Motiv bilden kann.<sup>[116]</sup> Entsprechend konnte die Gruppe um Balasubramanian kurz darauf einen Schalter entwickeln, bei dem eine Sequenz, die bei pH 5 ein i-Motiv bildet, bei pH  $\approx$  8 in einer Duplexkonformation gefangen werden konnte (Abbildung 8 A).<sup>[117]</sup> Hier bildet der C-reiche Strang in einem Zustand mit dem i-Motiv eine gestauchte Duplexkonformation, einer molekularen Raupe ähnlich. Wichtig an dieser Arbeit ist, dass sie die Vorzüge Protonen- oder Hydroxyionen-basierter „Kippschalter“ in Bezug auf Reaktionszeiten und die Wiederholungsrate eines DNA-Schalters demonstriert: Ein Arbeitszyklus, bei dem als Nebenprodukte lediglich Wasser und Salz entstehen, ist für das System ungiftig und führt zu einer effizienten Schaltbarkeit von i-Motiv-Bauteilen. Darüber hinaus stellt die hohe Geschwindigkeit der Protonierung/Deprotonierung in wässrigem Medium sicher, dass es sich beim geschwindigkeitsbestimmenden Schritt um die Konformationsänderung des DNA-Strangs handelt.

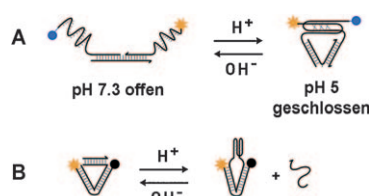
i-Motiv-bildende DNA-Sequenzen lassen sich lichtgesteuert zwischen ihrem einzelsträngigen und ihrem i-Motiv-Zustand schalten.<sup>[118]</sup> UV-Einstrahlung in eine saure Lösung der Malachitgrün-Carbinolbase verursacht eine Erhöhung des pH-



**Abbildung 8.** A) Der erste i-Motiv-basierte Nanoschalter ist ein pH-„Kippschalter“. Bei niedrigem pH-Wert bildet der C-reiche Strang (blau) ein i-Motiv, bei physiologischem pH-Wert ist der blaue Strang in einem Duplex gefangen.<sup>[117]</sup> B) Überführung der molekularen Bewegung eines i-Schalters in das Öffnen oder Schließen eines Molecular Beacon.<sup>[120]</sup>

Werts des Mediums, wodurch das i-Motiv entfaltet wird. Im Dunkeln relaxiert das System durch die Rekombination der Malachitgrünkationen mit Hydroxidionen wieder unter Rückbildung des niedrigen pH-Werts und eines gefalteten i-Motivs. i-Motive können auch durch elektrochemische Stimuli effizient zwischen ihrem gefalteten und entfaltenen Zustand hin- und hergeschaltet werden.<sup>[119]</sup>

Unlängst wurden neuere Ausführungen i-Motiv-basierter Schalter konstruiert, bei denen die Strangbewegung auf zwei koaxial gestapelte DNA-Duplexe übertragen wird, was zu einer nanoskaligen Hebelbewegung zweiter Ordnung führt (Abbildung 9).<sup>[121,122]</sup> Eine Schlüsselentwicklung ist die erste Demonstration einer i-Motiv-Faltung und -Entfaltung als



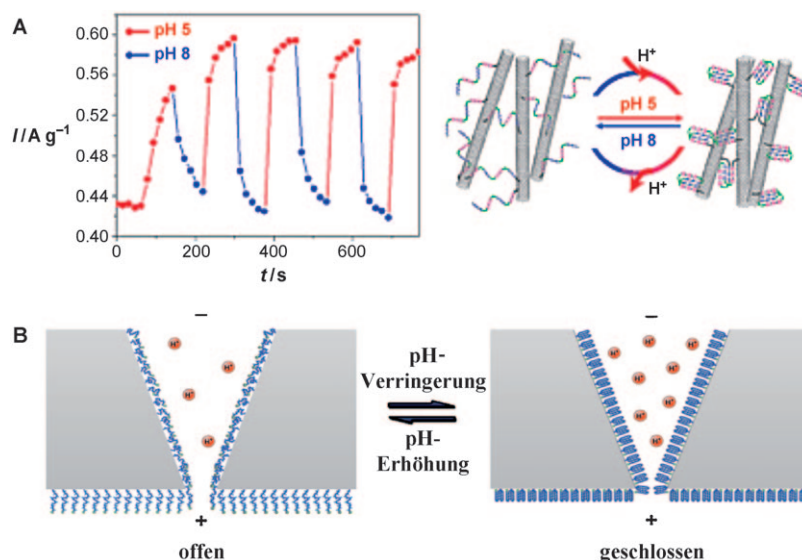
**Abbildung 9.** i-Motiv-Schalter, die als „Nanohebel“ zweiter Ordnung wirken.<sup>[121,122]</sup>

Antwort auf pH-Oszillationen, die in situ durch eine sich selbst erhaltende chemische Reaktion erzeugt werden.<sup>[123]</sup> Durch eine Variante der oszillatorischen Landolt-Reaktion lässt sich der Umgebungs-pH-Wert zwischen pH 5 und 7 variieren. Der i-Motiv-Schalter reagiert auf pH-Oszillationen sogar dann mit großer Reversibilität, wenn er auf einer Oberfläche immobilisiert wird.<sup>[124]</sup> Diese beiden Studien waren wichtige Vorstufen für die Entwicklung eines i-Motiv-DNA-Schalters, der reversibel auf den pH-Wert der Umgebung innerhalb einer lebenden Zelle reagiert, wenn er auf einer biologischen Oberfläche – nämlich an der Innenseite einer endosomalen Membran – angelagert ist (siehe Abschnitt 7).<sup>[121]</sup>

Verschiedene i-Motiv-Schalter überführen die chemische Änderung des pH-Werts in andere messbare Änderungen der Eigenschaften der betrachteten Anordnung. So kann die Bildung von i-Motiven verwendet werden, um DNA-funktionalisierte Goldnanopartikel reversibel zusammenzulagern.<sup>[125]</sup> Dies verändert die optischen Eigenschaften der Goldnanopartikel, was für einen effizienten kolorimetrischen pH-Test in vitro mit einer beeindruckenden Genauigkeit von 0.04 pH-Einheiten genutzt werden konnte.<sup>[126]</sup> Eine faszinierende Anwendung des Schaltens mit dem i-Motiv ist die Umwandlung der Strukturänderung des i-Motivs in eine Strukturänderung eines weiteren DNA-Bauteils, namentlich das Öffnen und Schließen von Molecular Beacons (Abbildung 8B).<sup>[120]</sup> Die nanomechanische Bewegung des Faltens und Entfaltens des i-Motivs lässt sich auch in die Bewegung eines Fluorophors zwischen zwei Positionen in unterschiedlicher Entfernung zu einer Goldoberfläche umwandeln.<sup>[127]</sup> Ebenso ist es möglich, eine mechanische Bewegung eines von i-Motiv-Sequenzen überzogenen Federhebels herbeizuführen, die von einer Änderung der mechanischen Spannung durch die Faltung der i-Motive induziert wird.<sup>[128]</sup> Diese Experimente mit Mikrofederhebeln bieten den ersten direkten experimentellen Nachweis, dass DNA-basierte Nanobauteile tatsächlich dazu verwendet werden können, Kräfte zu erzeugen! Die Änderung von Oberflächeneigenschaften, die sich durch die Aufreihung von i-Motiv-bildenden Sequenzen herbeiführen lassen, konnten die Gruppen von Liu und Jiang dazu nutzen, die modifizierten Oberflächen zwischen einem superhydrophilen

und einem superhydrophoben Zustand hin- und herzuschalten.<sup>[129]</sup>

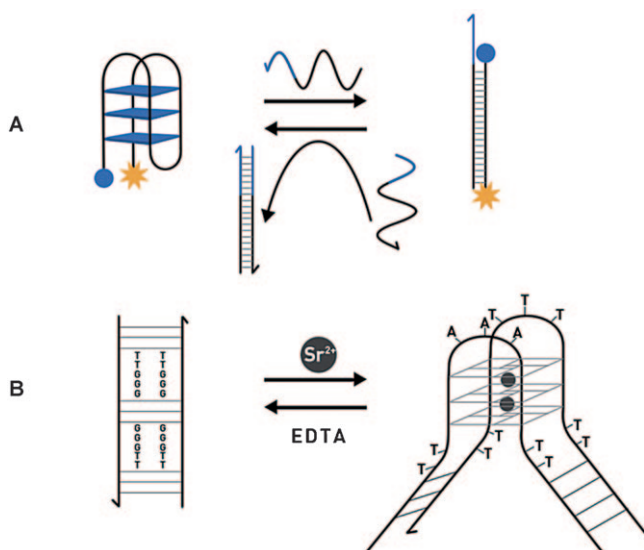
Die Faltung und Entfaltung von i-Motiven kann zur reversiblen Ausrichtung einer Ansammlung von mit i-Motiven funktionalisierten Kohlenstoffnanoröhren (CNTs) eingesetzt werden, deren elektrochemische Eigenschaften so durch den Wechsel zwischen einer ausgerichteten und einer monomeren Form umgeschaltet werden können (Abbildung 10A).<sup>[130]</sup> Eine interessante Entwicklung ist ein Nanoporencip mit einer konischen Öffnung, die durch i-Motiv-bildende Sequenzen oberflächenfunktionalisiert ist und die das Öffnen und Schließen eines Ionenkanals imitieren kann (Abbildung 10B). Bei pH  $\approx$  8 liegen die DNA-Stränge unstrukturiert vor; die Nanopore bleibt geöffnet, und ein Ionenstrom kann durch sie hindurchfließen. Bei niedrigem pH-Wert wird die Nanopore blockiert, und zwar durch die Bildung der i-Motive in diesen Sequenzen, was sich in einem reduzierten Stromfluss niederschlägt.<sup>[131]</sup>



**Abbildung 10.** A) i-Motive in Verwendung zur Ausrichtung funktionalisierter Kohlenstoffnanoröhren und zur Modulation der elektrochemischen Aktivität einer CNT-modifizierten Elektrode.<sup>[130]</sup> B) Durch i-Motive funktionalisierte Poren werden mithilfe einer pH-Änderung geöffnet bzw. geschlossen, was sich in einer verbesserten bzw. reduzierten ionalen Leitfähigkeit der Pore niederschlägt; rote Kugeln:  $H^+$ .<sup>[131]</sup> Wiedergabe mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry (A) und American Chemical Society (B).

### 3.2.4. G-Quadruplex-Schalter

Um klären zu können, ob der Duplex-Quadruplex-Übergang als Grundlage für einen Nanoschalter verwendet werden kann, wurde in Lit. [115] ein doppelt markiertes, zur Bildung von G-Quadruplexen fähiges Oligonukleotid (GFO) verwendet. In Gegenwart eines komplementären, C-reichen Stranges mit einem Überhang wird die G-Quadruplex-Konformation des GFO geöffnet und in die Form eines basen-gepaarten Watson-Crick-Doppelstrangs gebracht. Dabei ragt der Überhang des C-reichen Strangs einzelsträngig über die Helix hinaus (Abbildung 11A). Im Umkehrungsschritt ver-



**Abbildung 11.** G-Quadruplex-Bauteile: A) Strecken eines G-Quadruplexes in einen Doppelstrang mit einem Treibstoffstrang (fuel strand) und die Umkehrung des Vorgangs mithilfe eines komplementären Antitreibstoffstrangs.<sup>[115]</sup> B) „Zusammengezwickter Duplex“ (duplex pinching) bei Sequenzen mit G-Quadruplexen, der sich unter Zugabe von zweiwertigen Ionen durch Rückfaltung bildet.<sup>[133]</sup>

drängt ein unmarkierter G-reicher Strang den doppelt markierten GFO aus dem Duplex. Ein Abfallduplex entsteht, und der GFO kehrt in seine gefaltete Quadruplexgestalt zurück.<sup>[115]</sup> Die entsprechenden Konformationsübergänge wurden auch hier durch den FRET zwischen zwei Farbstoffmarkern beobachtet.

Anders als bei i-Motiv-Schaltern sorgen die Erzeugung eines doppelsträngigen Abfallstrangs und die komplexere Natur des Treibstoffstrangs (fuel strand) für eine geringere Zahl an Operationszyklen und eine langsamere Dynamik. Die geschwindigkeitsbestimmende Barriere dieses Bauteils ist die Tendenz des G-reichen Rückstellstrangs – oder Antitreibstoffstrangs – (reset strand oder antifuel strand) selbst auch in einen Quadruplex zu falten, was im geöffneten Zustand eine effektive Stranginversion erschwert. Verwendet man jedoch einen katalytischen Strang, der die Faltung des G-reichen Treibstoffstrangs verhindert, beschleunigt dies die Wiederherstellungsreaktion.<sup>[132]</sup> Kurz darauf demonstrierte die Gruppe von Sen, dass sich ein Duplex mit zwischengeschalteten G-reichen Domänen im Zentrum in G-Quadruplexe falten kann, was die Gesamtstruktur des Duplexes in einen geschlossenen oder „zusammengezwickten“ Zustand (pinched state) bringt (Abbildung 11 B).<sup>[133]</sup> Das Zusammenzwicken des Duplexes wird durch die Zugabe von  $\text{Sr}^{2+}$  ausgelöst, das ein starker positiver Regulator der Quadruplexbildung ist, und lässt sich durch die Bindung des zweiwertigen Metallions durch einen effektiven Chelatbildner, wie Ethylendiamintetraacetat (EDTA), wieder rückgängig machen. Eine genaue Kontrolle über die Quadruplexstruktur wurde unlängst von Balasubramanian et al. demonstriert, die zeigten, dass ein G-reiches Oligonukleotid zwischen seinen parallelen und antiparallelen Quadruplextopologien hin- und hergeschaltet werden kann – abhängig von der Art des in der

Lösung vorhandenen Chelatbildners. In diesen Lösungen wird wegen der „Vergiftung“ des Systems durch Additive nur eine geringe Zahl von Zyklen beobachtet.<sup>[134]</sup> Dennoch bleiben diese Ansätze zumindest für oberflächenimmobilisierte Anwendungen vielversprechend, bei denen ein Lösungsaustausch möglich ist.

Die Strukturänderung beim Duplex-Quadruplex-Übergang wurde bereits in eine Vielzahl von Ausgabesignalen überführt. So können Quadruplexe wie Molecular Beacons funktionieren, bei denen der Duplexstamm durch G-reiche Oligonukleotidsegmente ersetzt wird.<sup>[135]</sup> Anstelle von Farbstoffen lässt sich das G-Quadruplex-Gerüst auch zur Positionierung zweier funktioneller Gruppen am 5'- oder 3'-Terminus eines GFO verwenden, sodass sich diese in unmittelbarer Nähe befinden, wenn die G-Quadruplex-Struktur gefaltet vorliegt. So funktionalisierten Harris et al. die entsprechenden Enden eines GFO mit Liganden, die über zwei verschiedene Bindungsstellen an Trypsin binden können. Liegt nun das GFO in seiner geöffneten (Duplex-)Form vor, wird Trypsin über eine einzelne Bindungsstelle gebunden. Wenn das GFO jedoch in seine G-Quadruplex-Form übergeht, zeigt sich wegen der Kooperativität der beiden Bindungsstellen ein entsprechend verbessertes Bindungsverhalten (siehe Abbildung 6 B).<sup>[110]</sup> Das GFO lässt sich mit Standardtreibstoffsträngen und Antitreibstoffsträngen reversibel zwischen dem Duplex- und dem Quadruplexzustand hin- und herschalten.

Verschiedene G-Quadruplex-Schalter nutzen die Reversibilität, die von der durch zweiwertige Metallionen herbeigeführten Konformationsänderung und deren Umkehrung durch Chelatoren herrührt. Die Chelatkomplexierung von  $\text{Ni}^{2+}$  durch eine mit einem G-reichen DNA-Segment verbundenen 2,2'-Bipyridylgruppe führt zu einem eindimensionalen „G-Draht“ (G-wire), der sich unter der Bindung der  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen durch EDTA in reversibler Weise in eine ungeordnete Struktur zerlegen lässt.<sup>[136]</sup> Ein ungewöhnliches Beispiel ist die Bindung mit dem Liganden 360 A – einem G-Quadruplex-spezifischen Liganden –, die in Gegenwart von  $\text{Cu}^{2+}$  gelöst werden kann und sich wiederherstellen lässt, wenn das System mit EDTA zurückgesetzt wird.<sup>[137]</sup> Da die Bildung von G-Quadruplexen stark von der Gegenwart von  $\text{K}^+$  erleichtert wird, können oberflächenimmobilisierte GFOs auch zur Positionierung von Ferrocengruppen verwendet werden, die sich in Gegenwart von  $\text{K}^+$  näher an eine Oberfläche bewegen lassen. Dies ist z. B. die Grundlage für eine Reagens-lose elektrochemische Detektionsplattform für  $\text{K}^+$ -Ionen.<sup>[138]</sup> In anderen Studien wurde FRET – entweder zwischen zwei Farbstoffen<sup>[139]</sup> oder zwischen einer Oberfläche, die mit einem kationisch geladenen Polymer funktionalisiert ist, und einem fluoreszenzmarkierten GFO – zum Nachweis von  $\text{K}^+$  genutzt.<sup>[140]</sup>

Auch viele Aptamere enthalten G-Quadruplexe; eines der bekanntesten Beispiele ist das Thrombin-bindende Aptamer (TBA).<sup>[141]</sup> Ferrocen-markiertes TBA lässt sich zur elektrochemischen Detektion von Thrombin heranziehen, ähnlich dem zuvor vorgestellten  $\text{K}^+$ -Sensor.<sup>[142]</sup>

In einem anderen Zusammenhang erwies sich das TBA als leistungsfähiges Modellsystem, bei dem der G-Quadruplex-Duplex- oder der G-Quadruplex-Einzelstrang-Über-



gang über das Binden und Freisetzen von Thrombin in Reaktionskaskaden umgesetzt werden konnten. Eine wegbereitende Arbeit diesbezüglich war das wiederholte Binden und Freisetzen von Thrombin durch ein TBA mit einem Sequenzüberhang, bei dem das Thrombin durch Versetzen mit einem Freigabestrand R (release strand) freigesetzt wurde, der seinerseits komplementär zum Überhang von TBA war und mit einem Teil der TBA-Sequenz überlappte. Durch die Zugabe des vollständigen Komplements zu R, des Anti-Freigabestrangs, konnte das System zurückgesetzt werden.<sup>[143]</sup>

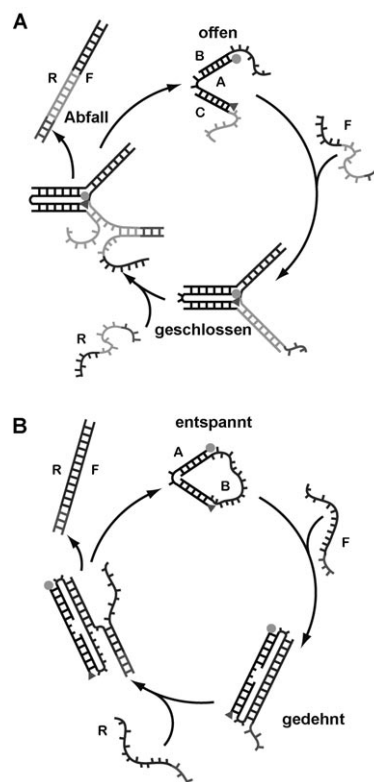
Bei Verwendung eines TBA-Konjugats, das mit Thrombin über einen DNA-Linker verknüpft ist, führt die Zugabe eines komplementären DNA-Strangs zu einer Versteifung des Linkers, wodurch das TBA aus seiner Bindungsstelle am Thrombin herausgezogen wird. Diese enzymatisch aktive Stelle ist daraufhin für die Katalyse einer biochemischen Reaktion verfügbar, die wiederum in ein Fluoreszenzsignal übersetzt werden kann. Eine solche Reaktionskaskade konnte dazu genutzt werden, eine DNA-Sequenz mit einer Konzentration von 10 nM nachzuweisen.<sup>[144]</sup>

Sowohl der Sense- als auch der Antisense-Strang telomerer DNA kann in einer Tetraplexform vorliegen. Der G-reiche Strang kann durch Metallionen induziert in eine Quadruplex-Konformation umschalten, während der C-reiche Strang in der Gegenwart von Wasserstoffionen in das i-Motiv umschalten kann. Die Gruppe um Sugimoto hat dieses System dazu verwendet, Logikgatter zu bauen, die das Potenzial beider Stränge zur Bildung von Quadruplexen und i-Motiven nutzen. Variiert man die Umgebungsbedingungen, d.h. den pH-Wert und die Konzentration der Metallionen, existiert das System in vier unterscheidbaren Zuständen.<sup>[145]</sup>

### 3.3. Hybridisierungsgetriebene Schalter und Maschinen

Bei den Schaltern des vorigen Abschnitts wurde reversible Bewegung auf der Nanoskala durch eine wiederholte Änderung der Pufferbedingungen herbeigeführt. Einer der wesentlichen Nachteile puffergesteuerter Bauteile ist der Mangel an Spezifität des „Effektorsignals“. Veränderungen der Pufferzusammensetzung beeinflussen alle vorhandenen molekularen Spezies und ermöglichen in der Regel keine Adressierung einer speziellen Komponente. Pufferbasierte Systeme nutzen daher lediglich die strukturellen und mechanischen Eigenschaften von DNA, schöpfen aber die Möglichkeiten der Programmierbarkeit von DNA-Molekülen nicht voll aus. Eine höhere Spezifität geht allerdings mit einer langsameren Reaktion einher.

Das früheste Beispiel eines nanomechanischen Bauteils, das nicht nur aus DNA-Molekülen besteht, sondern auch von ihnen angetrieben wird, sind die DNA-Pinzetten (DNA tweezers) von Yurke et al. aus dem Jahr 2000.<sup>[5]</sup> Ihr Operationsprinzip ist in Abbildung 12 A dargestellt. Die Original-DNA-Pinzetten bestehen aus drei DNA-Einzelsträngen. Ein zentraler, 40 Basen langer Strang und zwei periphere Stränge von 42 Basen Länge bilden zusammen eine Struktur, in der zwei doppelsträngige Arme von 18 Basen Länge über ein einzelsträngiges Gelenk aus vier Basen verbunden sind. Im geöffneten Zustand der Pinzette liegen 24 Basen der beiden



**Abbildung 12.** Zwei Prototypen für DNA-Nanomaschinen, die Strangverdrängung (strand exchange) durch Kreuzungspunktwanderung vollziehen. A) Eine DNA-Pinzette<sup>[5]</sup> in geöffnetem Zustand wird von drei DNA-Strängen A–C gebildet. Hybridisierung mit einem Treibstoffstrang F bringt die Pinzette in eine geschlossene Konformation. Strang F lässt sich über einen Prozess der Kreuzungspunktwanderung von einer geschlossenen Pinzette wieder ablösen. Dies bringt die Pinzette in ihre geöffnete Konformation zurück, wobei ein R-F-Abfallduplex produziert wird. B) Ein DNA-Aktuator besteht in seinem entspannten Zustand aus zwei Strängen, die zwei steife Arme und einen einzelsträngigen Ring bilden.<sup>[146,147]</sup> Die Hybridisierung mit einem Treibstoffstrang F streckt die Struktur. Wird der Strang F durch den Strang R entfernt, geht die Struktur wieder in ihre entspannte Konformation über.

peripheren Stränge ungepaart vor. Die Pinzette lässt sich durch Hybridisierung mit einem 56 Basen langen Treibstoffstrang oder Stellstrang (set strand) in eine geschlossene Konformation bringen. Von diesen 56 Basen sind 48 komplementär zu den einzelsträngigen Fortsätzen der Pinzettenarme. Die verbleibenden acht Basen werden als (einzelsträngiger) Überhang für die Anbindung eines Rückstellstrangs (reset strand) benötigt, der zum ursprünglichen Stellstrang vollständig komplementär ist. Der Rückstellstrang kann an den Fortsatz anbinden und so einen Prozess der Kreuzungspunktwanderung einleiten, bei dem der Stellstrang von der Pinzette abgelöst und diese daher wieder geöffnet wird (vgl. Abschnitt 2.1). Die abwechselnde Zugabe von Stell- und Rückstellsträngen ermöglicht die zyklische Abfolge von geöffneten und geschlossenen Zuständen der Pinzette. Die Bewegung eines solchen Nanobauteils lässt sich durch FRET zwischen zwei Fluoreszenzmarkern beobachten oder anhand eines gelelektrophoretischen Nachweises der verschiedenen Zustände verifizieren.

Zwar hat die ursprüngliche DNA-Pinzette keinerlei spezifische Funktion, jedoch sind einige konzeptionelle Aspekte, die mit diesem Bauteil demonstriert wurden, von Bedeutung: Zunächst wird die Struktur in einer sequenzspezifischen Weise betrieben – nur Stellstränge mit der korrekten Sequenz können die DNA-Pinzette ansteuern, was bedeutet, dass das Bauteil adressierbar ist. Auch wenn es schon zuvor Beispiele von hybridisierungsgetriebenem Konformationsschalten gab – etwa bei den MBs –, ermöglichte es die Verwendung des Prozesses der Kreuzungspunktwanderung erstmals, ein solches Konstrukt auch wieder zurückzuschalten – d.h., ein doppelsträngiger Bereich konnte ohne thermische Denaturierung wieder in einen einzelsträngigen übergeführt werden. Darüber hinaus kann das Pinzettensystem im Prinzip – im Unterschied zu vielen anderen molekularen Schaltern – Arbeit verrichten; das Schließen und Öffnen der Pinzette geschieht entlang thermodynamisch unterschiedlicher Pfade, und während jedes Betriebszyklus wird ein Abfallduplex produziert. Die freie Enthalpie eines Abfallduplexes repräsentiert das Maximum an chemischer Energie, das dem System während eines Zyklus zur Verfügung steht – im Falle eines Doppelstrangs aus 56 Basen sind dies etwa  $300 \text{ kJ mol}^{-1}$ !

An diese Arbeit anschließend wurden viele Varianten des Pinzettensystems entwickelt: Durch die Verknüpfung der Pinzetenarme über eine einzelsträngige Schleife wurde ein Aktuatorbauteil (actuator device) realisiert, das sich je nach verwendeter Art des Stellstrangs strecken<sup>[146]</sup> und zusammenziehen kann.<sup>[148]</sup> Die Kontraktion des Aktuators erfolgt analog zum Schließen der Pinzette (Abbildung 12 A), seine Streckbewegung ist in Abbildung 12 B dargestellt. Eine Variante dieses Bauteils enthält in ihrer Schleifenregion ein Desoxyribozym (oder DNAzym, vgl. Abschnitt 2.3), das RNA schneidet. Die Anbindung eines Hybridtreibstoffmoleküls, das eine einzelne RNA-Base innerhalb seiner Sequenz enthält, an die Substratbinderegion des DNAzyms führt zunächst zu einer Streckbewegung des DNA-Bauteils. Der Treibstoffstrang wird dann durch das DNAzym in zwei kleinere Fragmente aufgespalten, die wegen ihrer niedrigeren thermodynamischen Stabilität vom Bauteil dissoziieren.<sup>[149]</sup> Dieser Operationszyklus lässt sich durch den kontrollierten Abbau des RNA-Treibstoffstrangs durch RNase H verbessern.<sup>[150]</sup>

Wie in Abschnitt 2 erwähnt, wird die Bewegung von hybridisierungsgetriebenen Bauteilen durch den vergleichsweise langsamen Fortschritt der Hybridisierungs- und Strangverdrängungsreaktionen begrenzt. Verschiedene Versuche wurden bereits unternommen, um die Kinetik solcher Bauteile zu beschleunigen. Ein einfacher Ansatz ist es, die DNA-Bauteile bei höheren Temperaturen oder Konzentrationen zu betreiben.<sup>[151]</sup> Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung spezieller Pufferbedingungen oder Zusätze. Beispielsweise verwendeten Choi et al. ein kationisches Polymer (Poly(L-lysine-graft-dextran)), von dem sich zuvor erwiesen hatte, dass es Hybridisierungs- und Strangverdrängungsreaktionen beschleunigt.<sup>[152]</sup> Unter Verwendung von Poly(L-lysine-graft-dextran) konnten sie das Antwortverhalten und die Leistung der DNA-Pinzette, aber auch anderer Nukleinsäurebauteile verbessern.<sup>[27]</sup>

Ein interessanter Ansatz zur Steuerung der Bewegung von DNA-Nanobauteilen besteht in der Verwendung von DNA-Basen, die von Asanuma et al.<sup>[96]</sup> sowie Ogura et al.<sup>[98]</sup> mit dem photoschaltbaren Molekül Azobenzol modifiziert wurden. Azobenzol lässt sich aus seiner *trans*- in seine *cis*-Konfiguration schalten, wenn man es mit Licht der Wellenlänge 330–350 nm bestrahlt, wogegen Wellenlängen von 440–460 nm das Molekül wieder in seine *trans*-Form zurück-schalten. Nur in seiner *trans*-Form interkaliert Azobenzol effizient in eine DNA-Doppelhelix. *cis*-Azobenzol hingegen destabilisiert einen DNA-Duplex, was sich in einer beträchtlich reduzierten Schmelztemperatur niederschlägt.<sup>[96,153]</sup> Asanuma und Mitarbeiter synthetisierten Treibstoffstränge für DNA-Pinzetten, die mit Azobenzol modifiziert wurden und die die Pinzetten ausschließlich in der *trans*-Form schließen konnten.<sup>[96]</sup> Ogura et al.<sup>[98]</sup> verwendeten einen Treibstoffstrang, der nur auf einer Hälfte mit Azobenzol modifiziert ist. Das unmodifizierte Segment bleibt dauerhaft an die Pinzetenarme angebunden, wogegen das modifizierte Segment sich photoschalten lässt, was ein wiederholtes Öffnen und Schließen der Pinzette bewirkt. Die intramolekularen Wechselwirkungen bei diesem Ansatz ergeben eine sehr viel schnellere Schließkinetik als bei den herkömmlichen DNA-Pinzetten. Die Nutzbarmachung von photoschaltbarer DNA-Hybridisierung könnte von größtem Interesse für viele andere Anwendungen in der DNA-Nanotechnologie sein. Das Photoschalten könnte zur Steuerung der Aktivität DNA-bindender Proteine mit Licht oder zum Auslösen DNA-basierter Reaktionskaskaden genutzt werden.

Ein Problem im Zusammenhang mit dem Modellsystem der DNA-Pinzetten ist deren Tendenz zur Dimerbildung. Anstatt eine einzelne DNA-Pinzette zu schließen, können Treibstoffstränge auch zwei oder mehrere Pinzetenstrukturen miteinander vernetzen, was zu einem heterogenen geschlossenen Zustand führt. Dies kann z.B. durch Gelelektrophorese-Experimente beobachtet werden. In vielen der bisherigen Studien zu DNA-Nanomaschinen wurde eine genaue Charakterisierung der tatsächlich entstehenden Strukturen leider unterlassen. Der zyklische Betrieb eines Nanobauteils wurde oftmals einfach mit FRET-Studien demonstriert; jedoch haben diese Experimente nur eine bedingte Aussagekraft, wenn eine Mischung aus Monomeren und Multimeren vorliegt. Ihre quantitative Signifikanz wird weiter dadurch verringert, dass der Anteil tatsächlich farbstoffmarkierter Moleküle in der Regel nicht bekannt ist.

Diese Probleme lassen sich zumindest teilweise durch Fluoreszenzstudien an Einzelmolekülen umgehen, die auch die Erkennung unvollständig markierter DNA-Strukturen und die Ermittlung der Stöchiometrie bezüglich ihrer Markierung ermöglichen. Studien mit Einzelpaar-FRET (single-pair FRET, spFRET) an DNA-Pinzetten haben gezeigt, dass eine geschlossene Pinzette verschiedene Subpopulationen von unterschiedlicher FRET-Effizienz enthält. Verwendet man lediglich die FRET-Werte für vollständig geöffnete und geschlossene Pinzetten, ermöglicht dies eine sehr viel genauere Bestimmung der Abstände innerhalb des DNA-Bauteils als bei Ensemble-Experimenten. Es ist zu erwarten, dass Einzelmolekültechniken eine zunehmende Rolle bei der Konstruktion und Charakterisierung von Nukleinsäure-Na-

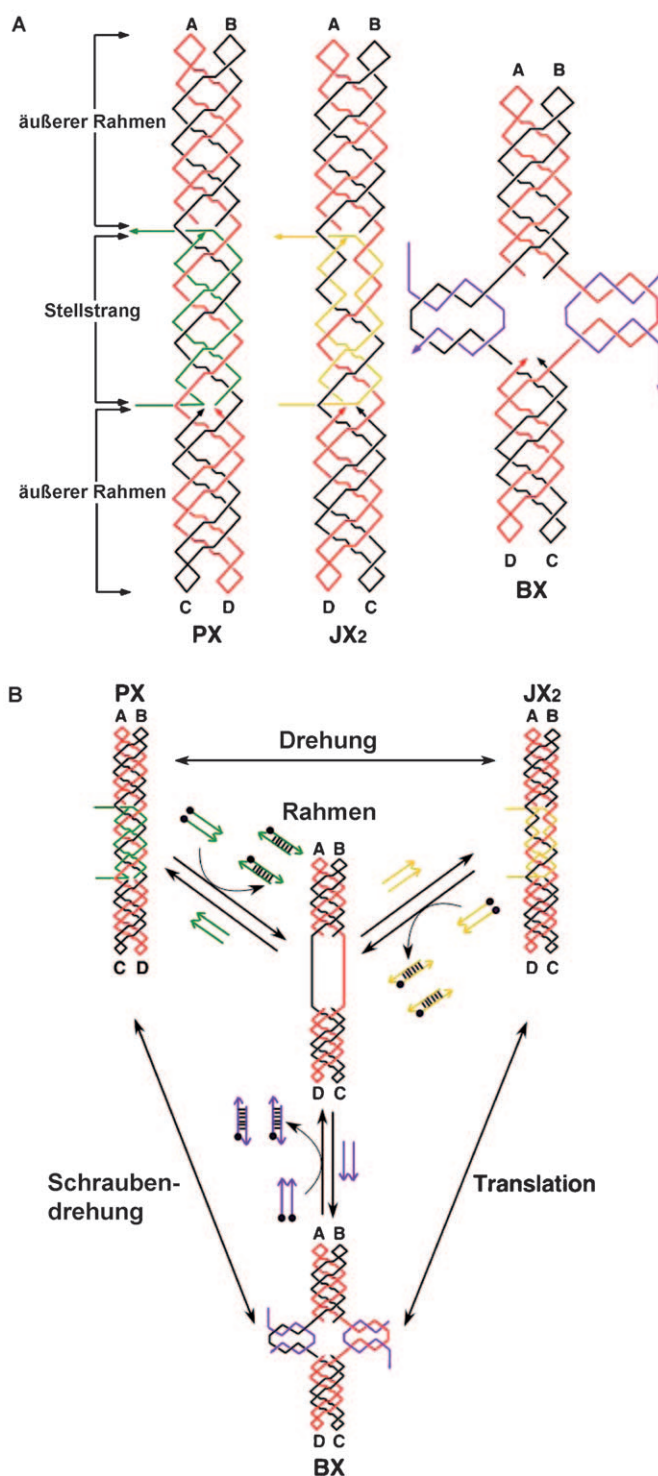
nobauteilen spielen werden. Beispielsweise wurde spFRET unlängst auch in Zusammenhang mit einem schaltbaren DNA-Nanobehälter (siehe Abschnitt 5.2)<sup>[154]</sup> angewendet und überdies zur Charakterisierung des Nanometronoms genutzt, das schon in Abschnitt 3.2 erwähnt wurde.<sup>[107]</sup>

Ein komplexeres hybridisierungsgetriebenes Bauteil als die pinzettenähnlichen Strukturen wurde von Yan et al. entwickelt.<sup>[155]</sup> Dieses PX-JX<sub>2</sub>-Bauteil basiert auf einem paranemischen DNA-Kreuzungsübergang (paranemic DNA crossover) und hat eine verringerte Tendenz zur Dimerbildung. Eine paranemische DNA-Struktur kann durch gegenseitigen Austausch von Strängen derselben Polarität zwischen zwei Doppelhelices an jeder der möglichen Positionen gebildet werden (Beispiele für PX- und JX<sub>2</sub>-Strukturen in Abbildung 13).<sup>[156]</sup> Wenn Teile dieser Struktur entfernt und durch DNA-Bereiche ohne solche Übergänge ersetzt werden, ergibt dies Moleküle in einer versetzten Anordnung (juxtaposed structure), in der zwei Helices um 180° gegenüber der paranemischen Struktur gedreht vorliegen. Diese Bewegung lässt sich nutzen, um molekulare Strukturen, die an dieses Bauteil angebunden sind, zu drehen, was sich beispielsweise durch Rasterkraftmikroskopie (AFM) charakterisieren lässt.

Seeman und Mitarbeiter demonstrierten bereits mehrere molekulare Maschinen von fortschreitender Komplexität, die auf dem PX-JX<sub>2</sub>-Motiv beruhen. So wurde die PX-JX<sub>2</sub>-Struktur unlängst zu einem Schalter mit drei Zuständen erweitert<sup>[157]</sup> – dem PX-JX<sub>2</sub>-BX-Schalter –, in dem zusätzlich zur Drehung der PX-Sektion der zentrale Teil des Bauteils zur Kontraktion und Ausstülpung zweier Doppelkreuzungs-Sektionen (double-crossover sections) gebracht werden kann, was global zu einer Art Kreuzkonformation führt (Abbildung 13). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich ein Paar von PX-JX<sub>2</sub>-Bauteilen parallel betreiben lässt – mit demselben Satz an Effektorsträngen (effector strands).<sup>[158]</sup> Bei diesem Ansatz wird ein Bauteil von der PX- in die JX<sub>2</sub>-Konformation, das andere in die umgekehrte Richtung geschaltet, was sich in einer entgegengesetzte Bewegung der beiden Strukturen manifestiert. Diese Arbeit repräsentiert eines der ersten Beispiele, bei denen zwei unterschiedliche Bauteile parallel im gleichen Reaktionsvolumen betrieben werden.

In einer anderen Reihe von Experimenten führten Seeman und Ding PX-JX<sub>2</sub>-Kassetten in ein supramolekulares Netzwerk aus DNA-TX-Kacheln (triple crossover DNA-tiles, TX) ein.<sup>[159]</sup> Unter Verwendung von doppelsträngigen Zeigermolekülen, die an diese Kassetten angebracht waren, konnte das Schalten zwischen den PX- und JX<sub>2</sub>-Zuständen eindrucksvoll für die gesamte supramolekulare Anordnung sichtbar gemacht werden, was konzeptionell auf die Realisierung zukünftiger molekularer Montagelinien mit DNA-Robotern anspielt. Ein vergleichbarer Ansatz wurde erst unlängst für ein System auf der Basis von DNA-Origami eingesetzt.<sup>[160]</sup>

Wie in Abschnitt 7 noch diskutiert werden wird, ist eines der Ziele der Nanotechnologie mit Nukleinsäuren der Betrieb von DNA-basierten Nanobauteilen *in vivo*. Allerdings kommt DNA in lebenden Organismen einzelsträngig nicht vor – RNA hingegen schon. Aus diesem Grund haben



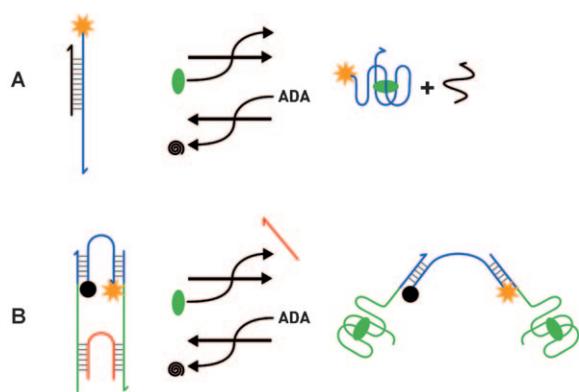
**Abbildung 13.** Drei-Zustands-Schalter auf Grundlage eines Strangaus-tauschs zwischen PX-, JX<sub>2</sub>- und BX-Strukturen.<sup>[157]</sup> A) Im „paranemischen Zustand“ (paranemic state) PX sind zwei Doppelhelices durch eine maximale Zahl an Strangaus-tauschs (strand crossovers) miteinander verwoben. Im JX<sub>2</sub>-Zustand ist die Zahl der Strangaus-tauschs um zwei reduziert, was zu einer relativen Verdrehung der Helices C und D zueinander führt. Zusätzlich lässt sich die innere Region der Struktur „ausbeulen“, was zum Zustand BX führt. B) Der Übergang zwischen den verschiedenen Strukturen lässt sich durch das Entfernen oder die Zugabe geeigneter Stellstränge steuern. Wiedergabe mit Genehmigung aus den Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.



verschiedene Gruppen bereits versucht, RNA-Stränge anstelle von DNA-Strängen als Effektormoleküle zu nutzen, um DNA-Bauteile anzutreiben. Sowohl für das PX-JX<sub>2</sub>-Bauteil<sup>[161]</sup> als auch für die DNA-Pinzetten<sup>[162]</sup> konnte gezeigt werden, dass sich diese genauso gut mit RNA-Effektorsträngen betreiben lassen. Diese Beispiele repräsentieren die ersten Versuche, die Aktivität von DNA-Bauteilen mit „genetischer“ Information zu steuern. In Lit. [163] wird die Produktion von RNA-Kontrollsequenzen für DNA-Pinzetten der Kontrolle eines einfachen genregulatorischen Elements *in vitro* unterworfen.

### 3.4. Bauteile mit Aptamerkomponenten

Aptamere sind äußerst vielversprechende Komponenten für funktionale Nanobauteile; außer dem TBA ist hierfür bereits eine ganze Reihe anderer Aptamere eingesetzt worden (siehe Abschnitt 3.2). So nutzt ein Aptamer-basierter Schalter das AMP-Aptamer in der ersten Hälfte seines Schaltzyklus und die Zugabe von Adenosin-Desaminase, um anschließend das System wieder zurückzusetzen.<sup>[164]</sup> Dieses System wurde dahingehend erweitert, dass DNA-Pinzetten – angetrieben von diesem AMP/Adenosin-Desaminase-System – geöffnet und geschlossen werden, wobei die AMP-Aptamere an den Enden der Pinzetten mit einem kurzen DNA-Strang verbunden sind, der sich ablöst, wenn das Aptamer in seiner gefalteten Form vorliegt (Abbildung 14).<sup>[165]</sup> Die Bindung eines Proteins an sein Aptamer lässt sich auch durch die Gegenwart eines Stranges verhindern, der zum Aptamer partiell komplementär ist und es entfaltet: Das Protein wird damit von seiner inaktiven, Aptamer-gebundenen Form in seine freie, aktive Form überführt. Auf solche Weise lässt sich z. B. die DNA-induzierte Inaktivierung eines Aptamers für Taq-Polymerase nutzen, um diese zu freizusetzen; die Aktivität der DNA-Polymerase lässt sich damit reversibel an- und ausschalten.<sup>[166]</sup> In einer eleganten Demonstration zur generellen Natur der Schaltbarkeit von Aptamerbindungen haben



**Abbildung 14.** A,B) Molekulare Aptamer-basierte Bauteile, die das Anbinden von Adenosin (grünes Oval) in ein Fluoreszenzsignal umwandeln. Die Zugabe von Adenosin-Desaminase (ADA) setzt das System durch die Degradation des Adenosins zu Inosin (schwarze Spirale) zurück.<sup>[164,165]</sup> Das Bauteil in (B) entspricht der Kombination zweier Aptamere mit einer DNA-Pinzette.

Li und Nutiu Anordnungen entworfen, bei denen die Komplexierung mit dem Zielmolekül eine Änderung der Fluoreszenz bewirkt. In Abwesenheit des Zielmoleküls bindet die fluoreszierende Anordnung, die auch das Aptamer enthält, an ein Segment der DNA, das mit einem Quencher markiert ist. In Gegenwart des Zielmoleküls zwingt die Bildung des Aptamer-Zielmolekül-Moduls den DNA-Quencher-Strang zur Dissoziation von der Anordnung, wodurch die Fluoreszenzlösung abgeschaltet wird.<sup>[167]</sup> Eine Reihe von Methoden, mit denen sich ein Fluoreszenzauslesesignal generieren lässt, ist in Abbildung 22 dargestellt. Diverse weitere Anwendungen funktioneller Nukleinsäuren werden in den Abschnitten 6 und 7 beschrieben.

## 4. Molekulare Motoren und Läufer

Zu den beeindruckendsten molekularen Maschinen, die sich in der Natur finden lassen, zählen molekulare Motoren – Moleküle, die Kraft und Bewegung erzeugen. Ein großer Teil theoretischer und experimenteller Arbeit zu diesem Thema widmet sich der Frage, wie molekulare Strukturen in Gegenwart von Brownscher Bewegung chemische Energie in gerichtete Bewegung umwandeln können.<sup>[168]</sup> In den letzten Jahren haben Forscher begonnen, die Selbstorganisationseigenschaften von DNA- und RNA-Molekülen zu nutzen, um experimentell die ersten nichtbiologischen Prototypen solcher Brownschen Motoren zu entwickeln.<sup>[169]</sup>

### 4.1. Hybridisierungsgetriebene DNA-Läufer

Die ersten Läufersysteme, die vollständig aus DNA bestanden, beruhten auf einer recht einfachen Idee: Typischerweise wird anfänglich ein „zweibeiniger“ DNA-Läufer – er verfügt über zwei einzelsträngige „Füße“ – an eine molekulare DNA-Laufbahn angebunden, und zwar über eine Verbindung der Füße mithilfe einzelsträngiger „Fußhalterungen“ (footholds), die als Verbindungsstränge (connector strands) aus der Bahn herausragen. Die Verbindungsstränge können durch Kreuzungspunktwanderung von Ablösesträngen (removal strands) sequenzspezifisch von der Bahn abgelöst werden. Wenn ein DNA-Fuß auf diese Weise von der Bahn angehoben wird, kann er an die nächste freie Halterung auf der Bahn anbinden. Mit den geeigneten Verbindungs- und Ablösesträngen lässt sich dies einige Male wiederholen, um den Läufer zu einer beliebigen Position auf der Bahn zu bewegen.

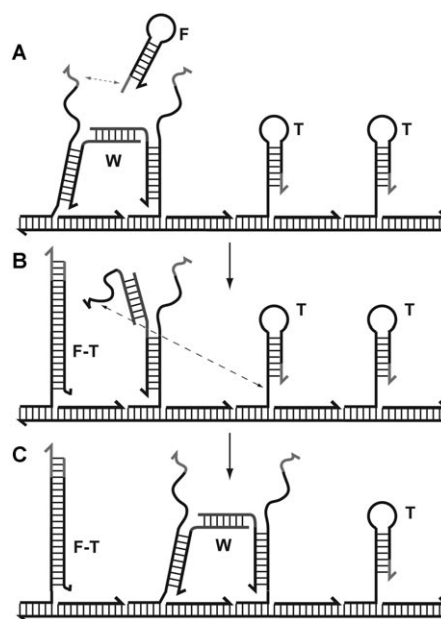
Erstmals wurde dieses Prinzip in einer Arbeit von Shin und Pierce<sup>[170]</sup> angewendet – hier ist der Läufer einfach ein DNA-Doppelstrang mit zwei einzelsträngigen Fortsätzen. Eine etwas kompliziertere Anordnung nach ähnlichem Prinzip wurde von Sherman und Seeman<sup>[171]</sup> in Form eines zweifüßigen Läufers vorgestellt, der aus zwei DNA-Doppelsträngen zusammen mit flexiblen, einzelsträngigen Verknüpfungselementen besteht. Dieser Läufer kann längs einer supramolekularen Bahn transloziert werden, die aus Molekülen mit Dreifachkreuzungen (triple crossover, TX) besteht und mit einzelsträngigen Fußhalterungen ausgestattet ist.

Im Grunde dem gleichen Prinzip folgen die molekularen Zahnräder (molecular gears) von Tian und Mao.<sup>[172]</sup> Bei deren System, in dem eine weitere Art gerichteter Bewegung realisiert ist, bewegen sich zwei zirkuläre DNA-Moleküle relativ zueinander, angetrieben vom gleichen Mechanismus der Addition und des Ablösens von Verbindungssträngen. Die beiden Kreise bestehen aus einem zirkulären Einzelstrang, an den jeweils drei weitere hybridisiert sind. Letztere haben flexible Gelenke mit einzelsträngigen Fortsätzen, die als Fußhalterungen fungieren. Wegen der Flexibilität der Gelenke können zwei zirkuläre Stränge gleichzeitig mit zwei Verbindungssträngen verbunden sein. Durch die alternierende Zugabe von Verbindungs- und Ablösesträngen in der richtigen Reihenfolge können die beiden Kreise dazu gebracht werden, relativ zueinander in eine Richtung zu rotieren.

All diese Systeme der ersten Generation haben den ernsthaften Nachteil, dass sie extern getaktet werden, d.h. dass für jeden einzelnen Schritt des Läufers manuell zusätzliche DNA-Stränge hinzugegeben werden müssen. Daher wurden in der Folge verschiedene Konzepte für eine autonome Bewegung von DNA-Läufern entwickelt, die typischerweise katalytische Reaktionen nutzen, die entweder durch Enzyme oder durch das Prinzip der Hybridisierungskatalyse vermittelt werden. Dieses Prinzip kommt durchweg bei den DNA-Läufern der zweiten Generation zur Anwendung, die in der Folge von Pierce, Turberfield sowie Seeman et al. entwickelt wurden. Bei diesen Systemen spielt der DNA-Läufer selbst die Rolle eines Hybridisierungskatalysators (siehe Abschnitt 2.1): Er katalysiert die Reaktion entweder zwischen zwei Haarnadeltreibstoffsträngen oder einem Haarnadeltreibstoffstrang und der Laufbahn des Motors. Die mechanistischen Details der katalytischen Prozesse sind dabei so entworfen, dass sie zu einer unidirektionalen Läuferbewegung führen. Als Beispiel zeigt Abbildung 15 das Prinzip des autonomen Läufers von Yin et al.<sup>[173]</sup>

Ausgehend von einer ähnlichen Idee wurde jüngst von Omabegho und Mitarbeitern ein um einiges komplexerer Läufer entwickelt, der sich auf einer DX-Bahn anstelle einer dsDNA-Bahn bewegt. Unter Verwendung zweier bestimmter Fußhalterungen und eines aufwändigen Schrittmusters gelang die autonome und prozessive Bewegung des Läufers über einige Schritte hinweg.

Die Läufer von Yin et al.<sup>[173]</sup> und Omabegho et al.<sup>[174]</sup> beruhen beide auf dem Ansatz des „Brücken hinter sich Abbrechens“ (burnt bridges) – wie viele andere der bisher realisierten Läufersysteme auch. Bei diesem Ansatz werden die Fußhalterungen auf der Bahn entweder ganz zerstört oder unbrauchbar hinterlassen, nachdem der Läufer sie passiert hat. Durch dieses etwas brachiale Vorgehen wird ein Schritt zurück ausgeschlossen und so die Bewegung in die andere Richtung erzwungen. Anders als bei natürlichen Systemen lassen sich solche supramolekularen DNA-Bahnen daher nur ein einziges Mal verwenden. Daher ist es auch unmöglich, mehrere Läufer über denselben Abschnitt der Bahn laufen zu lassen. Dies wäre jedoch höchst wünschenswert, wenn Systeme von DNA-Motoren wirklich einmal als Transportsysteme dienen sollten – wie etwa Kinesinmotoren in Zellen, die Organellen entlang von Mikrotubuli transportieren. Turber-

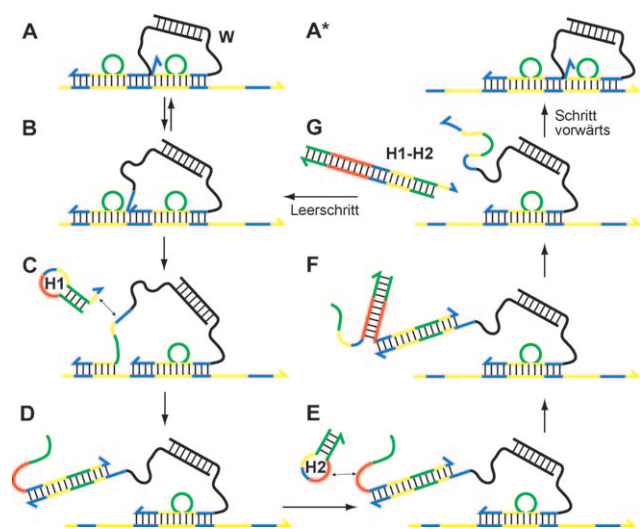


**Abbildung 15.** Autonomen, jedoch nichtprozessiver DNA-Läufer. A) Anfänglich ist der Läufer W mit zwei Füßen an die Bahn angebunden. Unbesetzte Fußschleifen T auf der Bahn bilden inerte Haarnadelschleifen. Die Haarnadeltreibstoffstränge F können nur von besetzten Fußschleifen geöffnet werden. B) Nach der Hybridisierung von F mit der Schleife ganz links löst sich der linke Fuß des Läufers von der Bahn ab. Er kann nun auf der rechten Seite in die nächste Schleife eindringen. C) Nach der Hybridisierung von W mit T hat der Läufer effektiv einen Schritt nach rechts vollführt. W agiert als Hybridisierungskatalysator der Reaktion des Haarnadeltreibstoffmoleküls mit einem Schleifenmolekül T. Wiedergabe aus Lit. [169].

field und Mitarbeiter haben jüngst ein elegantes Operationsschema entwickelt, bei dem die Bahn nicht irreversibel verändert wird.<sup>[175]</sup> Das Konzept dieses zweifüßigen Läufers ist in Abbildung 16 dargestellt: Der Läufer hat zwei Füße, die an eine einzelsträngige DNA-Bahn hybridisieren können. Die Bindungsstellen für die Füße sind jedoch so entworfen, dass sie leicht überlappen. Der führende Fuß kann das Ablösen eines DNA-Schleifensegments im hinteren Fuß einleiten, wodurch dieser für eine Hybridisierung mit einem Haarnadeltreibstoffmolekül zugänglich wird. Der entgegengesetzte Prozess – die Beeinflussung des führenden Fußes durch den hinteren – ist nicht möglich. Dank dem ausgeklügelten Design tritt eine Hybridisierungskatalyse nur für den hinteren Fuß ein – damit ist die Bewegung des Läufers gerichtet und läuft zwischen beiden Füßen koordiniert ab.

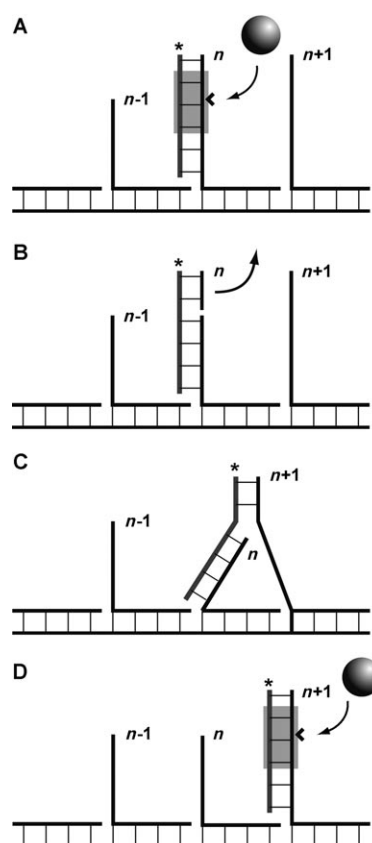
#### 4.2. DNA-Läufer, die Enzyme und Ribozyme verwenden

Eine beträchtliche Zahl von Läufern wurde mithilfe eines Hybridansatzes entwickelt, bei dem nicht nur die Hybridisierung von DNA, sondern auch das Eingreifen von Enzymen oder Desoxyribozymen (DNAzymen) zur Bewegung beiträgt. Yin et al.<sup>[177]</sup> demonstrierten die erste DNA-Maschine, die die Mitwirkung einer DNA-Ligase, die zwei DNA-Stränge kovalent zu einem verknüpft, und eines Restriktionsenzym, das Verbindungen zerstört, für die Translokation einer DNA-



**Abbildung 16.** Autonomer Läufer von Green et al.<sup>[175]</sup> A,B) Die beiden Füße des Läufers W konkurrieren um die Bindung an die einzelsträngige Laufbahn, zwischen den Zuständen A und B wird ständig gewechselt. In Zustand B kann der linke Fuß teilweise angehoben werden und C,D) mit der Haarnadel H1 über einen externen Fortsatz hybridisieren. E) Die aktivierte Haarnadel H1 kann jetzt an den komplementären Treibstoffstrang H2 hybridisieren. F) Über eine Kreuzungspunktwanderung wird der Abfallduplex H1-H2 vom Läufer entfernt. G) Der linke Fuß ist vollständig von der Laufbahn abgelöst und (A\*) kann nun diffusiv einen Schritt vorwärts machen – oder wieder an seine ursprüngliche Bindungsstelle anbinden. Wiedergabe aus Lit. [169].

Sequenz längs eines eindimensionalen Gerüstes nutzt. Das Läufersystem besteht aus einer doppelsträngigen DNA-Bahn mit DNA-Ankern in regelmäßigen Abständen, auf der eine Läufersequenz mit sticky end – etwa „klebriges Ende“ – unter Einwirkung der Enzyme von einem zum nächsten Ankerpunkt vorwärtsbewegt werden kann. Ein sehr ähnliches Konzept wurde später von Turberfield et al. demonstriert,<sup>[178]</sup> hier unter Verwendung einer DNA-Endonuklease, die nur Einzelstrangbrüche erzeugt („nicking enzyme“; Abbildung 17). Auch hier bewegt sich der Läufer auf einer doppelsträngigen DNA-Bahn, aus der in gleichmäßigen Abständen Ankersequenzen herausragen. Allerdings repräsentiert in diesem Fall eine einzelsträngige DNA den Läufer, die an einen der Anker hybridisieren kann, wodurch die Erkennungssequenz der Nuklease N.BbvC IB vervollständigt wird. Während eines Schrittzklus erzeugt das Enzym einen einzelsträngigen Spalt im Ankerstrang, an den der Läufer gerade angebunden ist. Der abgetrennte Teil des Ankers dissoziiert und hinterlässt einen einzelsträngigen Fortsatz, an den der benachbarte Ankerstrang anbinden kann. Der Läuferstrang wird dann vom alten Ankerstrang verdrängt und durch eine Kreuzungspunktwanderung zu einem neuen Angriffspunkt für das Enzym gebracht, woraufhin der Zyklus erneut abläuft. Kürzlich haben Bath et al.<sup>[179]</sup> das Konzept des prozessiven DNA-Läufers von Green et al.<sup>[175]</sup> mit der Aktivität der Endonuklease N.BbvC IB kombiniert. Dadurch konnten sie zeigen, dass sich ihr Konzept der koordinierten chemomechanischen Aktion (coordinated chemomechanical action) auch auf die Nutzung anderer Energiequellen als Hybridi-



**Abbildung 17.** DNA-Läufer auf Grundlage eines nicking Enzyms.<sup>[178]</sup>

A) Der Läufer (Markierung \*) ist anfänglich an den Ankerstrang  $n$  (anchor strand) angebunden. Der Läufer-Anker-Duplex enthält eine Erkennungssequenz (grau) für ein Spaltenzym, das – wie in (B) angedeutet – den Ankerstrang entzweischneidet. B) Dies führt zur Dissoziation des oberen Ankerabschnitts. C) Der benachbarte Ankerstrang ( $n+1$ ) dringt in den Läufer-Anker-Duplex über eine Kreuzungspunktwanderung ein, wodurch D) der Läuferstrang vollständig auf die nächste Bindungsstelle übertragen wird.

sierungsreaktionen, nämlich in diesem Fall DNA- oder RNA-Hydrolysereaktionen, verallgemeinern lässt.

Ein anderes Konzept für DNA-basierte molekulare Bewegung wurde von Sahu et al. entwickelt<sup>[176]</sup> – hier wird die hohe prozessive Polymerisations- und Strangverdrängungsaktivität der DNA-Polymerase des Phagen  $\phi 29$  genutzt. Das System besteht aus zwei miteinander verbundenen Ringen: einem zirkulären Radstrang (wheel strand), gewunden um eine zirkuläre DNA-Bahn. Um eine Bewegung des Rads längs der Bahn zu erzeugen, muss ein DNA-Primer, der an das Bahnmolekül angebunden ist, durch Polymerisation von der  $\phi 29$ -DNA-Polymerase verlängert werden. Da diese Polymerase eine starke Strangverdrängungsaktivität aufweist, kann sie das Rad aus seiner Bindungsstelle drücken und es so längs der Bahn bewegen.

Wie in Abschnitt 2.3 bereits ausgeführt wurde, lassen sich bestimmte biochemische Reaktionen, wie das Aufbrechen von Phosphodiesterbindungen oder eine Ligation, auch von RNA- oder DNA-Molekülen, so genannten (Desoxy-)Ribozymen, katalysieren. Einige der enzymgetriebenen DNA-Motorkonzepte, die soeben beschrieben wurden, lassen sich



daher auch in Systemen, die vollständig aus Nukleinsäuren bestehen, zur Anwendung bringen. So stellten Tian et al.<sup>[180]</sup> beispielsweise aus dem 10-23-DNAzym,<sup>[181]</sup> das RNA spalten kann, einen Läufer her, der sich auf einer doppelsträngigen Bahn mit einzelsträngigen Fußhalterungen entlang bewegen kann, die ihrerseits aus einem DNA-RNA-Hybrid mit einer einzelnen RNA-Base bestehen. Bei jedem Schritt bindet das DNAzym an eine der Fußhalterungen und katalysiert deren Spaltung an der Position der RNA-Base. Nach der Dissoziation eines der Spaltprodukte der Fußhalterung wird das DNAzym durch Kreuzungspunktwanderung zur nächsten Fußhalterung weitergereicht. Dies entspricht im Grunde genau dem Konzept des DNA-Läufers von Bath et al.,<sup>[178]</sup> nur wird hier das Spaltzenzym durch ein DNAzym ersetzt.

Ein ähnliches Konzept wurde unlängst von Stojanovic und Mitarbeitern zur Konstruktion „molekularer Spinnen“ (molecular spiders) verwendet.<sup>[182]</sup> In dieser Arbeit werden vier mit Biotin modifizierte 10-23-DNAzyme an die vier Bindungsstellen des Proteins Streptavidin angebunden, was einen Protein-„Körper“ mit vier katalytischen „Beinen“ erzeugt. Diese molekulare Anordnung kann dazu gebracht werden, über einen „Substratrasen“ zu laufen. Wegen der Spaltung der Substrate kann der Läufer niemals in Regionen zurückkehren, die er zuvor schon besucht hat. Die Bewegung erfolgt zwar im Prinzip diffusiv, lässt sich aber durch die Vorgabe einer eindimensionalen Bahn von Substratmolekülen in eine Richtung zwingen. Dies wurde jüngst experimentell anhand der Verwendung einer Origami-basierten Bahn für die Spinnen gezeigt. Dies ist zugleich der erste autonome molekulare Läufer, der eine Distanz von ca. 100 nm zurücklegen vermag.<sup>[183]</sup>

#### 4.3. Polymerisationsmotoren

In biologischen Systemen werden Kräfte nicht nur von molekularen Motoren erzeugt, die eine Gehbewegung vollführen, sondern auch durch andere Prozesse, etwa der Polymerisation von steifen molekularen Filamenten. Die Zellwanderung auf Oberflächen wird von Zyklen der Extension und Kontraktion angetrieben, die als Folge einer kontinuierlichen internen Reorganisation des Zytoskeletts auftreten.<sup>[184]</sup> Das Wachstum von Filopodien, Lamellipodien oder Mikrovilli beispielsweise wird durch Aktinpolymerisation verursacht. Auch die Bewegung bestimmter pathogener Bakterien, wie *Listeria Monocytogenes* oder *Rickettsia Rickettsii*, wird durch die Polymerisation von Aktin angetrieben. Diese Bakterien nutzen das aktinbasierte Motilitätssystem ihrer Wirtszellen, indem von einer Region ihrer Oberfläche aus Aktinfilamente polymerisieren, wodurch sie sich mit einer beachtlichen Geschwindigkeit von  $10 \mu\text{m min}^{-1}$  durch das Zytosol bewegen können. Die sich bewegenden Bakterien hinterlassen einen Schwanz von Aktinfilamenten, der auch als „Aktinkomet“ (actin comet) bezeichnet wird.<sup>[184,185]</sup>

Inspiziert von diesen biologischen Beispielen gab es bereits Ansätze, DNA-Polymerisationsreaktionen als Antrieb für eine molekulare Bewegung zu verwenden. In Lit. [186] demonstrierten Venkataraman et al. einen künstlichen „DNA-Kometen“, der die zuvor von Dirks und Pierce vor-

gestellte Hybridisierungskettenreaktion (hybridization chain reaction, HCR) nutzt.<sup>[187]</sup> HCR basiert auf der Katalyse der Hybridisierung zwischen zwei unterschiedlichen Typen von Haarnadelstrukturen durch einen Auslösestrang (initiator strand). Dem Konzept der Hybridisierungskatalyse ähnlich, das in Abbildung 2 erläutert wird, öffnet der Auslösestrang eine der Haarnadelstrukturen und ermöglicht dieser, mit einer Haarnadel des zweiten Typs zu reagieren. Dies legt eine zweite katalytische Region frei, mit deren Hilfe dann eine weitere Haarnadel des ersten Typs geöffnet wird. Das Ergebnis ist eine Kettenreaktion, bei der komplementäre Haarnadeln in Form eines langen Filaments miteinander hybridisieren. Mit fluoreszenzmarkierten DNA-Strängen konnten die Autoren demonstrieren, dass das Polymer zwischen zwei anfänglich benachbarten Strängen im Filament wächst, wobei diese im Zuge des Polymerisationsfortschritts räumlich getrennt werden. In Analogie zum bakteriellen Kometensystem initiierten die Autoren den Wachstumsprozess an der Kante einer DNA-Origamistruktur, was zu langen filamentösen Strukturen führte, die an einen „DNA-Körper“ angebunden waren. Dies konnte durch rasterkraftmikroskopische Aufnahmen sichtbar gemacht werden.

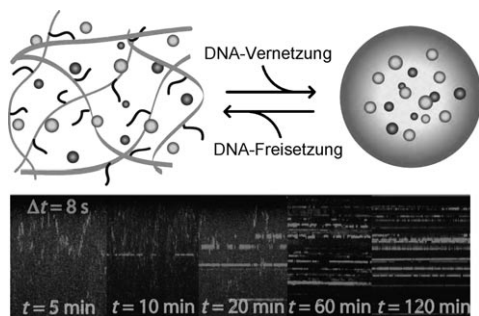
### 5. Schaltbare Materialien und Hybridkomponenten

Als mögliche Anwendung für DNA-Nanomaschinen wurde in den vergangenen Jahren eine Reihe von schaltbaren und adressierbaren molekularen Strukturen vorgeschlagen. Dies bezieht Strukturen, die ihre Geometrie oder mechanischen Eigenschaften verändern, ebenso mit ein wie Bauteile, die Nano-Objekte einfangen und wieder freisetzen können. In vielen Fällen wurden DNA-Hybride – d. h. DNA-Protein-Konjugate oder verzweigte Strukturen, die organische Linker-Moleküle einbinden – verwendet. Im Unterschied zu anderen Strategien zur Konstruktion schaltbarer Materialien ist der Hauptvorteil des Einsatzes von DNA als Effektormolekül klarerweise deren Sequenzspezifität, die es ermöglicht, den molekularen Schaltvorgang präzise zu adressieren.

#### 5.1. Gele und molekulare Netzwerke

Im Zusammenhang mit dem Transport von Wirkstoffen und Systemen für deren kontrollierte Freisetzung besteht beträchtliches Interesse an der Entwicklung von schaltbaren Mikrogelsystemen, die pharmazeutisch wirksame Verbindungen aufnehmen und diese als Reaktion auf einen Stimulus wieder gezielt freisetzen können.<sup>[188]</sup> Eine weitere mögliche Anwendung von schaltbaren Gelen ist ihre Verwendung als künstliche Muskeln, da sie pulsierendes mechanisches Verhalten aufweisen können, wenn man sie periodisch veränderlichen Stimuli aussetzt. Yurke und Mitarbeiter entwickelten ein schaltbares DNA-Gelsystem, das durch die Kopolymerisation von Acrylamid mit DNA-Strängen realisiert wurde, die mit reaktiven Gruppen (Acryditen) modifiziert waren.<sup>[189]</sup> Das Gel ließ sich aus dem flüssigen Zustand durch die Vernetzung der DNA-Acrylamidstränge über komplementäre DNA-Verbindungsstränge (DNA crosslinker

strands) in den festen Zustand überführen. Die mechanischen Eigenschaften des Gels konnten durch die Menge an Vernetzungssträngen eingestellt werden; genauso aber ließ sich das Gel auch durch einen Ablösestrang in den flüssigen Zustand zurückschalten. Später konnte gezeigt werden, dass sich dieses System dazu verwenden lässt, Nanopartikel in Form fluoreszierender kolloidaler Quantenpunkte in einem DNA-Polyacrylamidgel einzufangen und durch die Zugabe eines geeigneten Effektorstrangs wieder freizusetzen (Abbildung 18).<sup>[190]</sup>



**Abbildung 18.** Oben: DNA lässt sich als adressierbares Molekül zur Vernetzung in Polymerhydrogelen verwenden. Unter Verwendung von Hybridisierung und Strangverdrängung durch Kreuzungspunktwanderung lässt sich der Gelierungsprozess sequenzspezifisch und reversibel gestalten.<sup>[190]</sup> Auf diese Weise konnten fluoreszierende Nanopartikel reversibel eingefangen und wieder freigesetzt werden. Unten: Aufnahme der Fluoreszenz diffundierender Nanopartikel (kymographische Darstellung) während verschiedener Stadien des Gelierungsprozesses.

Eine Variante des DNA-vernetzten Hydrogels von Yurke et al. wurde später von Mi und Mitarbeitern realisiert,<sup>[191]</sup> die einen Vernetzungsstrang mit der Thrombinaptamersequenz verwendeten. Auf diese Weise lässt sich das Gel mit Thrombin beladen. Prinzipiell sollte es auch möglich sein, diesen Ansatz umzukehren, sodass die Auflösung des aptamervernetzten Hydrogels von der Gegenwart des Aptamerliganden abhängig sein sollte. Dies könnte man dazu nutzen, Wirkstoffträger auf ein chemisches Signal hin aus dem Gel freizusetzen.

Es gibt auch mehrere Beispiele schaltbarer supramolekularer Netzwerke, die ausschließlich aus DNA bestehen. So erzeugten etwa Luo und Mitarbeiter<sup>[266]</sup> dichte Hydrogele aus verzweigten DNA-Strukturen mit einer Reihe verschiedener Verzweigungstopologien. Diese Gele lassen sich mit Insulin beschicken, das mit dem Abbau der DNA über einen gewissen Zeitraum hinweg freigesetzt wird. Von Lubrich und Mitarbeitern wurde ein schaltbares DNA-Polymer vorgestellt,<sup>[192]</sup> bei dem das DNA-Pinzettensystem unter Verwendung der Rolling-Circle-Amplifikation polymerisiert wurde.<sup>[5]</sup> Dies resultiert in einer kontrahierbaren Nanostruktur, die sich analog zu den Monomerpinzetten zusammenziehen und strecken kann. Die entsprechende Längenänderung konnte mit einem Rasterkraftmikroskop abgebildet werden.

Einige Jahre zuvor hatten Yan und Mitarbeiter bereits ein schaltbares DNA-Gitter vorgestellt, das sich durch die Zugabe oder das Entfernen entsprechender Streckstränge

(stretching strands) zwischen zwei verschiedenen Gitterabständen schalten lässt.<sup>[193]</sup> Das Gitter besteht aus vernetzten Viererkreuzungen, die über teilweise selbstkomplementäre DNA-Sequenzen verbunden sind, die ihrerseits eine Haarnadelschleife ausstülpfen können. Ein zum Stamm der Haarnadelschleife komplementärer DNA-Strang kann mit der Haarnadel hybridisieren und dadurch das Gitter um die Länge zweier Doppelhelixwindungen strecken. Unter Verwendung des Konzepts der Kreuzungspunktwanderung lässt sich der Prozess umkehren und das Gitter damit wieder verengen. Als fortgeschritteneres Beispiel eines schaltbaren DNA-Gitters könnte man auch die Anordnung beweglicher „Roboterarme“ von Seeman und Ding betrachten, die bereits zuvor angesprochen wurde.<sup>[159]</sup>

## 5.2. Schaltbare Behälter

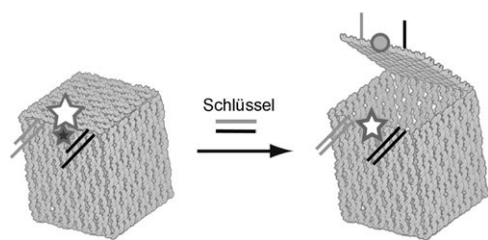
Auch im Bereich des kontrollierten Wirkstoff-Transports sind Anwendungen mit schaltbaren DNA-Bauteilen denkbar, die eine Kavität aufweisen, in der sich Proteine oder andere nanoskalige Objekte verkapseln lassen. In den vergangenen Jahren ist eine Reihe von dreidimensionalen DNA-Objekten verwirklicht worden,<sup>[194]</sup> unter ihnen Polyeder, die auf dem Zusammenfügen einiger weniger Stränge beruhen,<sup>[195,196]</sup> ebenso wie dreidimensionale Origamistrukturen, die aus ganzen Helixbündeln zusammengesetzt sind.<sup>[197–199]</sup> Darüber hinaus wurde eine Vielzahl von Strukturen realisiert, deren Topologie durch organische Linker-Moleküle gesteuert wurde.<sup>[200]</sup>

Turberfield und Mitarbeiter demonstrierten, dass sich Proteine (konkret Cytochrom c) in DNA-Tetraeder einlagern lassen.<sup>[201]</sup> Außerdem zeigten sie, dass sich die Seitenflächen des Tetraeders durch die Veränderung der Kantenlängen variieren lassen.<sup>[154]</sup> Dies wird mit dem Schaltprinzip für die Größenanpassung von Gitterabständen von Yan et al. erreicht, von dem bereits die Rede war.<sup>[193]</sup> Mit derselben Strategie konnten Aldaye und Sleiman die Ausdehnung von DNA-Behältern ändern, deren Kanten über organische Moleküle verbunden waren.<sup>[202]</sup>

Einem anderen Ansatz folgend konstruierten Gothelf et al. mit der Origamitechnik eine molekulare Schachtel.<sup>[198]</sup> Diese wurde so konstruiert, dass sich eine Seite – der Deckel – mit DNA-„Schlüsseln“ öffnen ließ. Zu diesem Zweck wurde der Deckel mit einer Seite der Schachtel über ein Gelenk und mit der ihr gegenüberliegenden über Linker-Moleküle verbunden. Diese – und damit auch die Schachtel – konnten von den DNA-Schlüsseln mithilfe der Kreuzungspunktwanderung geöffnet werden (Abbildung 19). Bislang gab es noch keine Demonstration der Kombination einer solchen Umhüllung mit einer programmierten Freisetzung durch DNA-basierte Behälter. Dies bleibt ein Ziel für zukünftige Experimente.

## 5.3. DNA-Protein-Chimären

Eine interessante jüngere Entwicklung in der chemischen Biologie ist die Synthese von DNA-Protein-Konjugaten, die



**Abbildung 19.** Eine molekulare Schachtel, hergestellt mit der Technik des DNA-Origami.<sup>[198]</sup> Der Deckel der Schachtel wird von zwei DNA-Duplexen verschlossen. Auf Abruf lässt sich die Schachtel durch Strangverdrängung mit DNA-Schlüsselsträngen (key strands) wieder öffnen. Wiedergabe mit Genehmigung der Nature Publishing Group.

vielfältige Anwendungsmöglichkeiten als schaltbare, adressierbare Materialien und als biochemische Signalwandler aufweisen.<sup>[203]</sup> Wir geben hier lediglich einige Beispiele: Choi et al. demonstrierten, dass sich die Aktivität eines allosterischen Enzym-DNA-Konjugats durch die Induktion einer mechanischen Spannung über eine DNA-Hybridisierungsreaktion verändern lässt.<sup>[204]</sup> Seitz und Mitarbeiter verwendeten DNA-Peptid-Konjugate, wodurch sich die Konformation des Peptids und damit dessen biologische Aktivität durch die Bildung von DNA-Duplexen steuern ließen.<sup>[205]</sup> Diese Strategie wurde unlängst dazu verwendet, die Aktivität einer Proteinkinase mit Peptidnukleinsäure-Hybriden zu steuern. Zu diesem Zweck wurde ein Peptid mit einer hohen Bindungsaffinität für die aktive Domäne der Kinase in eine inaktive, schleifenartige Ausgangskonformation gezwungen, in der das PNA-Konjugat an einen komplementären DNA-Strang hybridisiert war. Das Peptid ließ sich nun mittels Strangverdrängung durch ein RNA-Molekül freisetzen, wodurch die Kinase aktiviert wurde.<sup>[206]</sup> DNA-Konjugate mit dem photoschaltbaren Fluoreszenzprotein Dronpa und einem Fluorophor wurden für die Bildgebung in lebenden Zellen verwendet, wobei die Fluoreszenz des DNA-Konstrukts aktiviert und mit einem optischen Lock-in-Verfahren detektiert wurde.<sup>[207]</sup> DNA-Enzym-Konjugate wurden vor Kurzem auch zum Aufbau künstlicher Multienzym-Komplexe mit verbesserter katalytischer Effizienz herangezogen.<sup>[208]</sup>

#### 5.4. DNA-vermittelte Synthese

Eine faszinierende Idee ist die Kombination schaltbarer mechanischer Bewegung auf Basis von DNA-Nanobauteilen mit einer DNA-vermittelten Synthese – dies entspräche einer molekularen Montagelinie oder einer künstlichen Translationsmaschinerie.<sup>[209]</sup> DNA-vermittelte Synthese beruht auf der Idee, chemische Reaktanten entlang eines DNA-Gerüsts in einer durch die Sequenz der DNA programmierbaren Art und Weise anzuordnen. Durch die große räumliche Nähe lassen sich die Reaktanten dann mit hoher Effizienz miteinander zur Reaktion bringen. Eine große Zahl von Verbindungen wurde so bereits synthetisiert; einen umfassenden Überblick gibt Lit. [210]. Mithilfe dieser Strategie lässt sich im Prinzip ein DNA-Code in neuartige Verbindungen oder Heteropolymere übersetzen.<sup>[210,211]</sup>

Bislang wurde DNA-vermittelte Synthese mit dem nanomechanischen Schalten von DNA nur in wenigen Fällen vereint. Chen und Mao demonstrierten, wie das mechanische Schalten von DNA-Nanobauteilen zur Auswahl zwischen zwei alternativen Reaktionen verwendet werden kann. In diesem Falle wird ein DNA-Strang mit einer Carboxy-Endgruppe nahe an einen von zwei DNA-Strängen mit einer Aminogruppe gebracht. Die darauffolgende Bildung einer Amidbindung führt zu zwei unterschiedlichen Produkten.<sup>[113]</sup> Gu et al. zeigten, dass ein PX-JX<sub>2</sub>-Bauteil, das in eine DNA-Origamistruktur eingebaut ist, zur Bildung unterschiedlicher Muster auf dem Origamisubstrat in der Lage ist.<sup>[160]</sup> Dieselbe Gruppe konnte jüngst sogar demonstrieren, wie sich Nanopartikel durch bewegliche molekulare „Assembler“ in eine programmierbare Anordnung bringen lassen.<sup>[212]</sup>

Auch wenn noch schwerwiegende praktische Probleme bestehen, wie etwa der geringe Reaktionsdurchsatz und die schwierige Skalierbarkeit der Reaktionen, wäre eine programmierbare „molekulare Roboterstraße“ sicherlich eine herausragende wissenschaftliche und konzeptionelle Leistung.

## 6. DNA-Computing und molekulare Programmierung

### 6.1. DNA-Computing

#### 6.1.1. Traditionelle Ansätze

Zieht man die Kapazität von DNA-Molekülen als Informationsspeicher in Betracht, sind sie als Substrat für einen molekularen Computer naheliegend. Tatsächlich wurden schon 1973 DNA-prozessierende Enzyme mit Turingmaschinen, die mit einem DNA-Band arbeiten, verglichen.<sup>[213]</sup> Der Computerwissenschaftler Leonard Adleman führte 1994 vor, dass ein Rechenproblem, das mit dem berühmten „Handlungsreisendenproblem“ (traveling salesman problem) verwandt ist, experimentell unter der Verwendung von DNA und dem Methodenrepertoire der Molekularbiologie gelöst werden kann.<sup>[3]</sup> Bei diesem Problem wird von einer gegebenen Zahl von verschiedenen Reiserouten durch mehrere Städte diejenige gesucht, die genau einmal durch jede dieser Städte führt. Da dieses Problem zur Klasse der berühmten „NP-vollständigen Probleme“ gehört – das sind, vereinfacht gesprochen, Probleme, für die kein effizienter Rechenalgorithmus bekannt ist –, nährten Adlemans Ergebnisse die Hoffnung, dass sich diese schwierigen Rechenprobleme mit DNA-basierten molekularen Computern lösen ließen. Die grundsätzliche Idee hinter Adlemans Ansatz ist es, kombinatorisch alle DNA-Sequenzen zu erzeugen, die mögliche Lösungen zu einem Rechenproblem darstellen. Durch Verfahren wie PCR und Gelelektrophorese lässt sich dann die richtige Antwort zu einem Problem einem Pool von Lösungskandidaten entnehmen. In der Folge wurde eine Vielzahl von ähnlichen Konzepten entwickelt, um andere Rechenprobleme zu lösen, wie Erfüllbarkeitsprobleme (satisfiability (SAT) problems),<sup>[214]</sup> Spiel-<sup>[215,216]</sup> oder maximale Cliqueprobleme<sup>[217]</sup> (maximal clique problems) oder logische Resolutionsverfahren.<sup>[218]</sup> Bei Erfüllbarkeitsproblemen wird



beispielsweise nach der Erfüllbarkeit von logischen Bedingungen gesucht wie  $S = (x_1 \text{ ODER } x_2 \text{ ODER } x_3) \text{ UND } (x_1 \text{ ODER } x_2 \text{ ODER } x_4)$ , wobei  $x_i$  Boolesche Variablen darstellen. Beim so genannten 3-SAT-Problem enthält jede der Klauseln (die Ausdrücke in den Klammern) drei Variablen. Wegen der großen kombinatorischen Zahl von möglichen Lösungen sind diese Probleme sehr rechenaufwändig – und an dieser Stelle werden die hochgradig parallelen, DNA-basierten Ansätze interessant. Ein vielversprechendes Ergebnis aus der jüngeren Zeit ist die DNA-basierte Lösung eines 3-SAT-Problems für 20 Variablen.<sup>[219]</sup> Für viele elegante Arbeiten aus dem eher theoretischen Feld des DNA-Computing sei der Leser auf die Tagungsberichte der jährlichen Konferenz zum DNA-Computing verwiesen.

### 6.1.2. Autonomes Rechnen

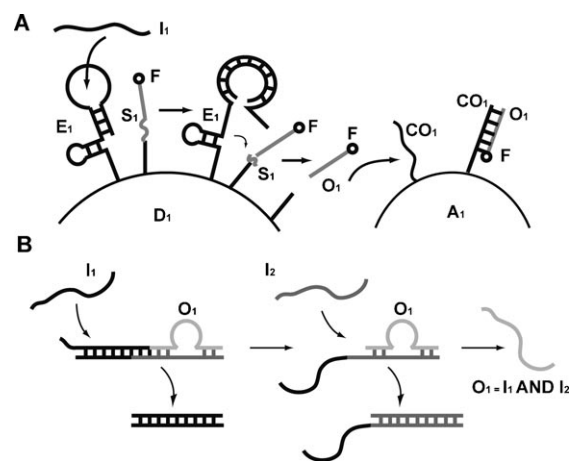
In den zurückliegenden Jahren wurden viele Konzepte vorgelegt, die deutlich von Adlemans ursprünglichem Algorithmus abweichen. Beispielsweise wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II-S für die molekulare Realisierung von endlichen Automaten<sup>[220]</sup> oder die Entwicklung von Sensoren und Signalverstärkungsmechanismen verwendet.<sup>[221]</sup> Auch wurden einfache Algorithmen zur molekularen Selbstorganisation implementiert, um supramolekulare Muster zu produzieren.<sup>[222, 223]</sup>

Stojanovic und Mitarbeiter haben diverse DNA-basierte Logikgatter und Schaltkreise beschrieben, die die katalytischen Eigenschaften von Desoxyribozymen nutzen.<sup>[216, 224]</sup> Diese setzen sich aus DNA-Konstrukten zusammen, die Desoxyribozyme enthalten, deren katalytisch aktive Konformation in Abwesenheit von bestimmten Eingangsmolekülen nicht eingenommen wird. Die Erkennung des Eingangseffektors stellt die katalytische Aktivität des Desoxyribozyms her, was zur Erzeugung eines Fluoreszenz Ausgangssignals genutzt wird. Mit diesem Prinzip wurden unter anderem NOT-, AND- und XOR-(Antivalenz)-Logikgatter verwirklicht. Einen ähnlichen Ansatz wählten Penchovsky und Breaker bei der Transformation eines allosterischen Ribozyms in ein molekulares Logikgatter.<sup>[225]</sup>

Eine vielversprechende Anwendung solch autonomer Logikgatter und Automaten liegt in der Entwicklung „intelligenter“ Biosensoren, die Hinweise aus ihrer Umgebung wahrnehmen und deuten und daraufhin die Freisetzung eines bestimmten molekularen Signals oder therapeutischen Moleküls auslösen können. Dieser Denkweise folgend demonstrierten Stojanovic und Mitarbeiter die Kommunikation zwischen an Kügelchen immobilisierten Desoxyribozym-Gattern (Abbildung 20A)<sup>[226]</sup> und darüber hinaus kürzlich auch die Freisetzung von therapeutischen Peptiden als Antwort auf einen oral verabreichbaren Wirkstoff.<sup>[227]</sup>

### 6.2. Molekulare Programmierung

Zwar wurden experimentell bereits diverse molekulare Logikgatter demonstriert, allerdings haben nur wenige Konzepte das Potenzial zur Entwicklung komplexer Schaltsysteme. Zum Teil liegt dies an der mangelnden Kompatibilität von



**Abbildung 20.** A) Chemische Kommunikation zwischen Donor- und Akzeptorkugeln D<sub>1</sub> und A<sub>1</sub>.<sup>[226]</sup> Ein Eingabemolekül (input molecule) I<sub>1</sub> aktiviert das Desoxyribozym E<sub>1</sub> durch das Anbinden an dessen obere Bindungsregion. E<sub>1</sub> kann daraufhin das benachbarte Substratmolekül S<sub>1</sub> zerlegen. Dies setzt das fluoreszenzmarkierte Ausgabemolekül (output molecule) O<sub>1</sub> frei, das dann wegdiffundiert und an einen komplementären Strang an der Akzeptorkugel anbinden kann. F = Fluorophor. B) Molekulare Logik mithilfe einer Hybridisierungskaskade. Das Ausgabemolekül O<sub>1</sub> wird nur dann von seinem komplementären Gegenstrang verdrängt, wenn beide Eingabemoleküle I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> anwesend sind.<sup>[228]</sup>

Eingangs- und Ausgangssignalen (z. B. eine niedermolekulare Verbindung als Eingangssignal, Fluoreszenz als Ausgangssignal), teilweise an fehlenden Verstärkungs- und Signalwiederherstellungsstufen, die für eine Signalverzweigung notwendig wären.

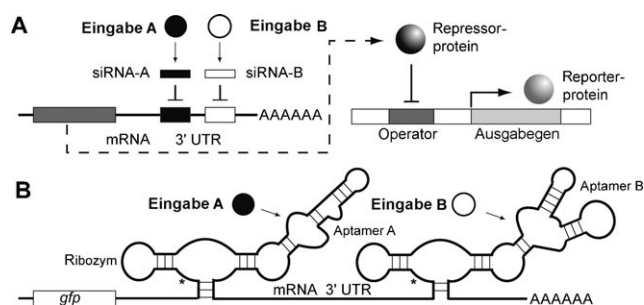
Ein in Bezug auf molekulare Informationsverarbeitung skalierbarer – d. h. einfach auf komplexere Probleme erweiterbarer – Ansatz wurde jüngst von Seelig et al. vorgestellt; die Grundlage bilden hier Strangverdrängung durch DNA-Kreuzungspunktwanderung (branch migration) und die Inhibition der DNA-Hybridisierung durch die Bildung von Haarnadeln (siehe Abschnitt 2.1).<sup>[228]</sup> So wurden DNA-Logikgatter konstruiert, bei denen die Hybridisierung einer DNA-Ausgabesequenz mit einem weiteren Strang (beispielsweise einem nachgelagerten Gatter) durch Hybridisierung mit einem Schutzstrang unterdrückt wird. DNA-Eingabestränge jedoch können die Schutzstränge durch Kreuzungspunktwanderung unter Freisetzung des Ausgabestrangs verdrängen. Mit diesem Konzept wurden AND-, OR-, NOT- und Schwellwertgatter ebenso wie ein Signalwiederherstellungskreis konstruiert.<sup>[22]</sup> Ein Beispiel für ein AND-Gatter ist in Abbildung 20B zu sehen. Als Demonstration des Anwendungspotenzials dieser Technik wurde die An- und Abwesenheit einer Reihe von microRNAs innerhalb einer komplexen Mischung solcher Moleküle durch ein Netzwerk von entsprechenden DNA-Gattern analysiert. Diverse andere Hybridisierungskaskaden wurden unlängst von Pierce et al.<sup>[173, 187]</sup> und Winfree et al.<sup>[229]</sup> vorgestellt; im Prinzip können solche Hybridisierungsschaltkreise auch zur Emulation beliebiger chemischer Reaktionen oder deren Kinetik genutzt werden.<sup>[230]</sup>

Ein etwas anderer Ansatz im Hinblick auf molekulare Programmierung wurde vor Kurzem von Kim et al. verfolgt,<sup>[231]</sup> die eine Methode der Transkriptionsregulation *in vitro* entwickelten, die ohne regulatorische Proteine auskommt. Zu diesem Zweck wird einer der beiden Einzelstränge der Promotorregion in zwei Teile zerlegt. Entfernt man den einen der beiden durch Kreuzungspunktwanderung, hinterlässt man einen unvollständigen (teilweise einzelsträngigen) Promotor, der von der entsprechenden RNA-Polymerase nicht mehr erkannt wird. In diesem Zustand ist die Transkription des Gens ausgeschaltet. Gibt man den fehlenden Teil wieder hinzu, wird das Gen aktiviert. Auf Grundlage dieses einfachen Prinzips haben Kim et al. einen künstlichen genregulatorischen Schaltkreis entwickelt, der auf der gegenseitigen negativen Rückkopplung zweier Gene beruht, was zu einem bistabilen Verhalten des Systems führt.

### 6.3. Computing in vivo

Die Zusammenführung der unterschiedlichen Forschungsrichtungen des DNA-Computing, der RNA-Biologie und der Gentechnik wurde jüngst im Zusammenhang mit mehreren Versuchen der Implementierung von DNA- oder RNA-basierten Rechenmodulen *in vivo* angestrebt.<sup>[232]</sup> So entwickelten Isaacs et al. künstliche regulatorische RNA-Moleküle zur Steuerung der Genexpression in Bakterien, und später folgten Bayer und Smolke mit ligandkontrollierten allosterischen Riboregulatoren zur Steuerung eukaryotischer Genexpression.<sup>[233]</sup> Auf Grundlage dieser Prinzipien konnten Win und Smolke die Funktion einer Reihe von Logikgattern in Hefezellen demonstrieren (Abbildung 21 B).<sup>[234, 235]</sup> Zu diesem Zweck implementierten sie einen allosterischen Ribozymschalter in die unübersetzte 3'-Region eines Reportergens, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert. Konformationsänderungen, die durch das Anbinden einer Kombination verschiedener Liganden an die entsprechenden Konstrukte induziert werden, aktivieren oder deaktivieren die RNA-spaltenden Ribozyme und schalten so die Synthese des fluoreszierenden Reporters an bzw. aus. Rinaudo et al. gelang unter Verwendung der RNAi-Maschinerie sogar eine Implementierung logischer Funktionen in Säugetierzellen (Abbildung 21 A).<sup>[236]</sup> Ein interessantes Experiment wurde unlängst von Topp und Gallivan durchgeführt, die künstliche RNA-Schalter in *E. coli* entwickelten, die die Synthese des CheZ-Proteins steuern, das für die bakterielle Chemotaxis unverzichtbar ist.<sup>[237]</sup> CheZ wird hier nur produziert, wenn Theophyllin an die Aptamerregion des RNA-Schalters angebunden ist. Da CheZ ein Bakterium in seinen Bewegungsmodus schaltet, wird so auf effektive Weise die chemotaktische Maschinerie des Bakteriums auf die Verfolgung eines neuen chemischen Stoffes reprogrammiert. Wegen ihrer vergleichsweise einfachen und darüber hinaus programmierbaren Strukturen dürften RNA-Bauteile und Steuerschaltkreise als Komponenten künstlicher Zellen von beträchtlichem Interesse sein.<sup>[238]</sup>

Wie angesprochen könnten DNA- oder RNA-basierte Rechenbauteile auch zur Steuerung der DNA-Assemblierung dienen<sup>[173, 223]</sup> oder biosensorische Aufgaben erfüllen, bei



**Abbildung 21.** Zwei Konzepte für logische Rechnungen *in vivo*, die auf RNA-Interferenz der unübersetzten 3'-Region (3'-UTR) von mRNA-Molekülen beruhen. A) Beide Eingabemoleküle A und B verursachen eine verstärkte Erzeugung kurzer RNA-Interferenzmoleküle siRNA-A und siRNA-B. Diese siRNAs bewirken eine Spaltung der 3'-UTR einer mRNA mithilfe der RNAi-Maschinerie, wodurch die Translation eines Repressorproteins unterdrückt wird, das seinerseits die Produktion eines fluoreszierenden Reporterproteins steuert. Insgesamt repräsentiert dieses Schema eine logische ODER-Funktion (A oder B). Wiedergabe aus Lit. [236]. B) Die Spaltung einer mRNA für ein fluoreszierendes Reporterprotein (grün fluoreszierendes Protein, GFP) wird durch zwei allosterische Ribozyme in der 3'-UTR erreicht. Die Schnittposition ist durch einen Stern (\*) gekennzeichnet. Die Ribozyme werden allosterisch von zwei Aptamereinheiten gesteuert. Das Anbinden der beiden molekularen Eingabesignale A und B inaktiviert die entsprechenden Ribozyme. GFP wird daher nur dann produziert, wenn beide Moleküle (A UND B) vorhanden sind und die mRNA nicht gespalten wird. Wiedergabe aus Lit. [235].

denen nicht lediglich eine binäre Information über das Vorhandensein einer Molekülspezies, sondern die Analyse einer Mischung auf eine Vielzahl an möglichen Komponenten benötigt wird. Ein Überblick über Anwendungen von Nukleinsäurebauteilen in der Biologie folgt im nächsten Abschnitt.

## 7. Molekulare Bauteile aus Nukleinsäuren in der Biologie

Wegen der großen Bandbreite dieses Gebiets bemüht sich dieser Abschnitt vor allem um die Darstellung der Vielfalt biologischer Anwendungsmöglichkeiten von Nukleinsäurebauteilen, mit besonderem Augenmerk auf den molekularen Grundlagen der Funktion der entsprechenden Bauteile. Eine erschöpfendere Abhandlung der einzelnen Teilbereiche erhält der Leser, wenn er aktuelle, spezialisierte Übersichtsartikel heranzieht, die in den jeweiligen Unterabschnitten angegeben werden.

### 7.1. Diagnostik und Sensorik

Nukleinsäurestrukturen finden als Sensoren *in vitro* und *in vivo* für eine Reihe von biologisch relevanten Zielobjekten wie Ionen, niedermolekularen Verbindungen, Proteinen und auch anderen Nukleinsäuresequenzen Verwendung. Die molekulare Grundlage für die Erkennung von Zielmolekülen aus den unterschiedlichen Klassen unterscheidet sich leicht und nutzt dabei jeweils einen bestimmten Aspekt der Nukleinsäuren in Bezug auf die molekulare Zielerkennung. Die

unterschiedlichen Verfahren bei der molekularen Erkennung durch DNA- oder RNA-Strukturen werden in dem exzellenten Übersichtsartikel von Liu et al. abgehandelt.<sup>[87]</sup> Verkürzt gesagt besteht die Möglichkeit der molekularen Detektion durch Nukleinsäurestrukturen auf optischem (d.h. turbidimetrischem, kolorimetrischem oder fluoreszentem), elektrochemischem und akustischem Wege sowie mithilfe von Quarzkristall-Mikrowaagen (QCMs), Oberflächenplasmonen-Resonanz (SPR) oder Federbalken-basierten Methoden.<sup>[239]</sup>

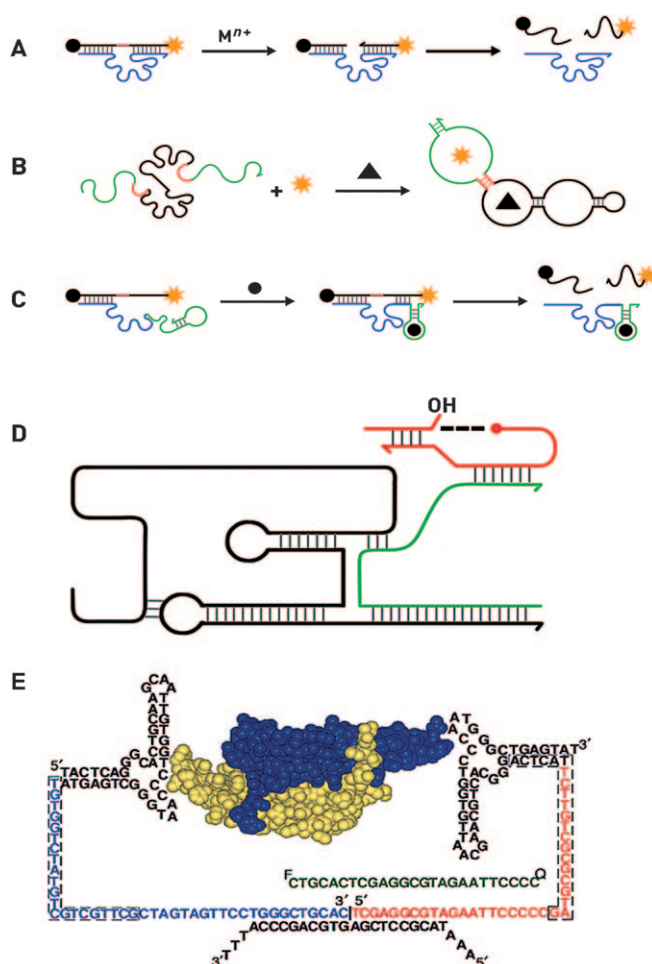
#### 7.1.1. Ionendetektion

Die bekanntesten Nukleinsäuremotive, die als Sensoren für Metallionen fungieren können, sind DNAzyme und RNAzyme. Diese nutzen in der Regel eine Fluoreszenz- oder Farbänderung, die beobachtet wird, wenn das DNAzym/RNAzym in Gegenwart der entsprechenden Metallionen aktiviert und ein markiertes Substrat gespalten wird. Einige Ausführungsvarianten aus der Literatur verwenden einen DNA <zym/RNAzym-Substratkomplex, der mit einem Fluorophor (Abbildung 22 A–C, orange) und einem Quencher (schwarz) markiert ist, wobei im Komplex die Fluoreszenz unterdrückt wird. Die Gegenwart eines bestimmten Metallions ( $M^{n+}$ ) fördert die Spaltung des DNAzym/RNAzym-Substratkomplexes, was zur Dissoziation des kürzeren Stücks des gespaltenen Substrats führt. Dieses Stück trägt eine Markierung, daher ist nach der Dissoziation ein Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten (Abbildung 22 A). Solche Sensoren funktionieren in Lösung oder immobilisiert auf einer Oberfläche. Die erstgenannten lassen sich zwar nicht wiederverwenden, da sie beim Detektionsvorgang irreversibel verändert werden, sind aber trotzdem durchaus vorteilhaft, da die Detektion primär über die Kinetik erfolgt; daher sind sie hochgradig selektiv und außerdem recht effektiv, sogar bei Auftreten einer (moderaten) Hintergrundfluoreszenz. Im Allgemeinen können oberflächenimmobilisierte Sensoren Nachweisgrenzen von 0.1–1 nM erreichen, was eine Größenordnung unterhalb derjenigen lösungsbasierter Sensoren liegt. Typische Metallionen, die sich mit DNAzymen nachweisen lassen, sind  $Cu^{2+}$ ,<sup>[240]</sup>  $Pb^{2+}$ ,<sup>[241]</sup>  $Zn^{2+}$ <sup>[242]</sup> und  $UO_2^{2+}$ .<sup>[243]</sup>

#### 7.1.2. Sensoren für niedermolekulare Verbindungen

Die entsprechende Änderung der Fluoreszenz oder anderer Eigenschaften markierter Aptamere beim Kontakt mit niedermolekularen Verbindungen zeigt, dass sich Aptamere als exzellente Sensoren für ihre kleinen Zielmoleküle nutzen lassen. Hierzu gibt es einige Übersichtsartikel aus jüngster Zeit.<sup>[87, 239, 246]</sup> Aptamere lassen sich als einzelne Module auffassen. Da auf der Basis von Nukleinsäurestrukturen einzelne Module einfach miteinander kombiniert werden können, lässt sich eine Vielzahl funktionell unterschiedlicher Nanoschalter erzeugen.

Zum Beispiel können zwei einzelne Aptamermodule zu einem allosterischen Aptamer verknüpft werden, sodass die Bindungsfähigkeit des einen Moduls davon beeinflusst wird, ob das andere gerade in seiner bindenden Konformation



**Abbildung 22.** A) Ein Nukleinsäure-Enzym – ein RNA- oder DNAzym – katalysiert unter Bindung eines Metallions ( $M^{n+}$ ) die Spaltung an einer spezifischen Position (in Rot dargestellt), was zur Aufhebung des fluoreszenzunterdrückten Zustands der intakten Anordnung führt. B) Ein allosterisches Aptamer-basierter Bauteil, das ein Aptamermodul für Malachitgrün (MG; grün) über ein Kommunikationsmodul (rot) mit einem weiteren Aptamermodul verbindet, das seinerseits eine weitere niedermolekulare Verbindung ( $\blacktriangle$ ) binden kann, wie rechts dargestellt. C) Aptazyme wandeln auf ähnliche Weise die Erkennung einer niedermolekularen Verbindung in ein Spaltereignis um, was sich durch die Kopplung von Aptamer- und DNAzym oder RNAzym-Modulen anhand der Fluoreszenz auslesen lässt. D) Ein Aptazymbauteil, das virale RNA amplifiziert. Die virale RNA erscheint in Grün, das Ribozym mit der Ligaseaktivität ist in Schwarz dargestellt, das RNA-Substrat für die Ligation in Rot.<sup>[244]</sup> E) Aptamere bieten durch die Kopplung eines Proteinnachweises an eine DNA-Vervielfältigung über PCR eine insgesamt herabgesetzte Nachweisgrenze. PDGF-BB (blau und gold) erkennt ein Aptamer (schwarz) mit Fortsätzen (rot und grün), die über einen Splint (schwarz) ligiert werden (schwarz), wobei ligierte Termini durch PCR nachgewiesen werden. Wiedergabe aus Lit. [245] mit Genehmigung der Nature Publishing Group.

vorliegt. Zur Illustration (Abbildung 22 B) sei hier auf Stojanovic und Kolpashchikov verwiesen, die die drastische Fluoreszenzverstärkung von Malachitgrün (MG) infolge der Anbindung an das entsprechende RNA-Aptamer genutzt haben, um eine Reihe anderer bioaktiver niedermolekularer Verbindungen, wie Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Flavinmononukleotid (FMN) und Theophyllin, nachzuweisen.<sup>[247]</sup>



Das MG-RNA-Aptamer wurde über ein Verbindungsmodul mit einem ATP-Aptamer kombiniert, sodass in Abwesenheit von ATP die MG-Aptamerdomäne unstrukturiert und damit unfähig zur effizienten Bindung von MG vorlag (Abbildung 22B). In Gegenwart von ATP jedoch führte die Strukturbildung des ATP-Aptamermoduls gleichzeitig auch zur Strukturierung der MG-Aptamerdomäne, die nun MG binden konnte, was sich in einer drastischen MG-Fluoreszenzverstärkung ausdrückte. Willner et al. zeigten anhand vieler Beispiele, dass die Kombination verschiedener DNA-basierter funktionaler Module zu sensorischen Kaskaden und damit zu einer wesentlich höheren Empfindlichkeit als derjenigen von einfachen Sensoren führen kann.<sup>[248]</sup>

Kombiniert man ein DNAzym/RNAzym so mit einem Aptamermodul für eine niedermolekulare Verbindung, dass erst deren Anbinden eine Strukturbildung des DNAzym/RNAzym-Moduls und damit seine katalytische Aktivierung bewirkt, bezeichnet man dieses allosterische Aptamer als Aptazym (Abbildung 22C).<sup>[249]</sup> Die Effizienz der Erkennung niedermolekularer Verbindungen durch Aptamere kann so mit der einfachen Detektierbarkeit verbunden werden, die mit der DNAzym/RNAzym-Aktivität und einer entsprechenden Strangspaltung einhergeht, und auf diese Weise zur Realisierung Aptazym-basierter Sensoren dienen. Ausgehend vom Hammerhead-Ribozym und einem Aptamer für eine niedermolekulare Verbindung (sowie einem optimierten Kommunikationsmodul zwischen beiden) entwickelten Breaker und andere eine Reihe von Aptazymsensoren unter anderem für cyclisches Adenosin- (cAMP) und cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) sowie Doxycyclin.<sup>[91, 250]</sup> So führt die Kombination von oder Kommunikation zwischen bestimmten strukturellen Modulen zu einer funktionalen Vielfalt bei molekularen Nukleinsäurebauteilen. Diese Eigenschaften ließen sich auch für die Schaffung von Sensoren nutzen, die mit einem Satz von biologisch relevanten Molekülen logische Operationen ausführen (siehe Abschnitt 6) und dabei als molekulare Diagnoseelemente fungieren könnten.

### 7.1.3. Proteine und Peptide

Wegen ihrer herausragenden Eigenschaften (Abschnitt 2.3) werden vermehrt Aptamere anstelle von Antikörpern in biologischen Testverfahren eingesetzt.<sup>[246, 251]</sup> Dies schließt entsprechende Alternativen zum enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), Proteinaufreinigungsverfahren, Western Blotting,<sup>[252]</sup> Durchflusszytometrie,<sup>[253]</sup> Bildgebung in vivo<sup>[254, 255]</sup> und Mikroarrays mit ein.<sup>[256]</sup> Aptamer-funktionalisierte stationäre Phasen zur chromatographischen Aufreinigung bioaktiver niedermolekularer Verbindungen und Proteine wurden bereits ausführlich beschrieben.<sup>[257]</sup> Die erste Demonstration eines Reporter-vermittelten Aptamertests (reporter linked aptamer assay, RLAA) diente der Detektion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) in Serum, die über ein VEGF-Aptamer mit Fluoreszenzmarkierung vermittelt wurde; die Empfindlichkeit ist mit der von ELISA-Standardmethoden vergleichbar.<sup>[258]</sup> Auch wenn dies nicht die einzigartigen Eigenschaften von Aptameren aus-

schöpft, unterstreicht es doch die hohe Effizienz des Aptamerkonzepts im Vergleich zu der traditioneller Antikörper. In Verdrängungstests (displacement assays) konnten Aptamere gegenüber Antikörpern bezüglich der Quantifizierbarkeit bereits punkten: Zum Beispiel hat TBA eine geringere Affinität zu markiertem Thrombin als zu Thrombin in seiner nativen Form. Die Zugabe von nativem Thrombin entlässt daher markiertes Thrombin in Lösung, das zuvor mit TBA komplexiert auf einer Oberfläche angebunden war. Das auf der Oberfläche verbliebene markierte Thrombin kann einfach quantifiziert werden.<sup>[259]</sup>

Einer der größten Vorzüge des Nukleinsäuregrundgerüsts ist die Möglichkeit, jedes detektierte Signal mit PCR amplifizieren zu können. Dies ist bei einem proteinbasierten Detektionsverfahren mit Antikörpern so nicht möglich. Wegweisend war in dieser Hinsicht die Detektion des Wachstumsfaktors PDGF-BB (platelet-derived growth factor), der ursprünglich als Homodimer in einer Konzentration von zeptomolarer Größenordnung ( $10^{-21}$  M) vorlag, durch DNA-Aptamere mit Überhängen (Abbildung 22E).<sup>[245]</sup> Wann immer Paare von Aptameren an PDGF-BB binden, werden dadurch die freien Enden der Überhänge hinreichend weit angenähert, sodass sie durch Zugabe einer Sequenz, die eine Ligation ermöglicht, ringförmig gemacht werden können. Das Produkt der Ligation ist einer Detektion durch Real-Time-PCR (RT-PCR; auch: quantitative PCR, qPCR) zugänglich, wogegen die Aptamere ohne entsprechende Reaktion zu keinem Signal führten. Mit dieser Methode wurde auch humanes  $\alpha$ -Thrombin nachgewiesen; dies geschah unter Verwendung von Aptamerpaaren, die auf zwei bestimmte Bindungsstellen des Thrombins ausgerichtet sind.<sup>[245]</sup> Mithilfe von Kapillarelektrophorese konnte unlängst ein Aptamer-Protein-Komplex von einem ungebundenen Aptamer getrennt werden; der Komplex wurde abgesondert und die Menge des gebundenen Aptamers mit PCR bestimmt. Damit konnten weniger als 200 Moleküle der reversen Transkriptase von HIV-1 nachgewiesen werden.<sup>[260]</sup>

Da sich Aptamere mit Fluoreszenzmarkierungen versehen lassen, ohne dass dies ihre Erkennungseigenschaften maßgeblich beeinflusst, können Membranprotein-Aptamere mit einem derartigen „Etikett“ verwendet werden, um innerhalb einer Zellpopulation solche Zellen zu erkennen, die ein bestimmtes Membranprotein exprimieren.<sup>[261]</sup> Zur Veranschaulichung sei die Arbeit von Tan und Mitarbeitern angeführt, die FRET-Nanopartikel (FRET-NPs) zur Etikettierung von DNA-Aptameren heranzogen – jedes mit einer spezifischen Fluoreszenzsignatur, je nach Wellenlänge der Fluoreszenzanregung. Aptamere für Membranproteine, wie das sgc8-Aptamer (spezifisch für CEM-Zellen), das TDO5-Aptamer (spezifisch für Ramos-Zellen) und das T1-Aptamer (spezifisch für Toledo-Zellen) wurden jeweils mit einem gegebenen FRET-NP etikettiert. Mit einem speziellen Durchflusszytometrieverfahren, der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (fluorescence-activated cell sorting, FACS), konnte jeder Zelltypus identifiziert und aus einer Mischlösung aussortiert werden.<sup>[262]</sup> Aptamere für mesenchymale Stammzellen (MSCs) ließen sich unter Etikettierung mit magnetischen Nanopartikeln zur Markierung und Anreicherung von MSCs aus einer Mischpopulation nutzen.<sup>[263]</sup> Bemerkenswert ist,

dass bei einigen Aptameren, die gegen ganze Zellen selektiert wurden, auch das cognate Zielprotein identifiziert wurde, etwa beim Pigpen-Protein in endothelialen Glioblastomen von Ratten.<sup>[264]</sup> Oft stellen sich die als solche identifizierten Marker als biologisch funktional heraus; z. B. ist Pigpen mit der Angiogenese verknüpft.<sup>[265]</sup>

Konzepte der DNA-Nanotechnologie lassen sich auch zur Entwicklung von Sensoren verwenden, die nicht nur Aussagen über die An- oder Abwesenheit von Zielmolekülen ermöglichen, sondern über die sich auch sonst schwer zugängliche physikochemische Größen bestimmen lassen. So haben Seeman und Mitarbeiter DNA-Nanomaschinen entwickelt, die die Bestimmung von Bindungskräften und -energien DNA-bindender Proteine, wie des Integrations-Host-Faktors (IHF) oder des MutS, ermöglichen.<sup>[100,101]</sup> Hier verursacht die Biegung und Verdrillung einer supramolekularen DNA-Struktur das Aufreißen eines Abschnitts von dsDNA und wirkt so als Kraftsensor.

#### 7.1.4. DNA- und RNA-Sequenzen

Das robuste Antwortverhalten der Molecular Beacons (MBs), ihre Generalisierbarkeit hin zur Detektion beliebiger Sequenzen und ihre Anpassungsfähigkeit an nahezu jeden gewünschten Fluorophor prädestinieren diese einfachen Bauteile für eine Vielzahl von biologischen In-vitro-Testverfahren, die vor Kurzem detailliert besprochen worden sind.<sup>[8]</sup> An dieser Stelle diskutieren wir kurz zwei wichtige Beispiele: Die am weitesten verbreiteten molekularbiologischen Testverfahren zur Erkennung spezifischer DNA-Sequenzen sind die Real-Time-PCR und die Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs). Mit dem zeitlichen Fortschreiten der PCR wird eine spezifische DNA-Sequenz vervielfältigt. Der Fortschritt der PCR wird dabei durch die Detektion der gegebenen, vervielfältigten DNA-Sequenz durch MBs in Echtzeit dokumentiert. Die Verwendung verschiedener MBs mit jeweils unterschiedlichen Fluorophoren ermöglicht die Erkennung unterschiedlicher DNA-Sequenzen und ist damit äußerst hilfreich für eine multiple Detektion in einer einzigen Reaktion.<sup>[267]</sup> Anhand der thermodynamischen Eigenschaften von Duplexen detektierter Sequenzen ist es möglich, korrekte DNA-Sequenzen von solchen mit einzelnen Fehlpaarungen zu unterscheiden. Einzelne Fehlpaarungen in wichtigen biologischen DNA-Sequenzen – die bereits erwähnten SNPs – werden in der biomedizinischen Forschung, der Diagnostik und zur Kennzeichnung von Krankheitsbildern als molekulare genetische Marker eingesetzt. MBs, die für eine gegebene DNA-Sequenz spezifisch sind, können so gestaltet werden, dass sich die Stabilität von Duplexen aus diesen MBs drastisch reduziert, wenn die gegebene DNA einen SNP enthält; dieser lässt sich daher rasch und mit großer Empfindlichkeit detektieren.<sup>[268]</sup> Ein interessanter Ansatz stammt hierbei von Kolpashchikov, der die Bildung einer DNA-Holliday-Kreuzung mit der Detektion durch MBs kombinierte. Die Kreuzung besteht dabei aus dem Analyt, zwei Teststrängen und einem MB-Strang. Diese Struktur wird von den gegebenen Sequenzen in kooperativer Weise wechselseitig stabilisiert,

was zu einer hochgradig verstärkten Selektivität dieses „binären DNA-Tests“ führt.<sup>[269]</sup>

Außer durch die bereits beschriebene Ansteuerung durch niedermolekulare Verbindungen lassen sich allosterische Aptamere oder die Aktivität von Aptazymen auch durch das Anbinden verwandter DNA- oder RNA-Sequenzen steuern. Solche RNA- oder DNA-Sequenzen fungieren als Effektoren, deren Anbindung an das DNA- oder RNA-Gerüst die Maskierung eines funktionalen Moduls entfernt – beispielsweise eines DNAzyms/RNAzyms, das sich eigentlich im Gerüst verbirgt.<sup>[206]</sup> Durch die Kombination des Konzepts des binären DNA-Tests nach Kolpashchikov mit DNAzymen gelang es Mokany et al., modulare MNAzyme zu entwickeln, bei denen das aktive Ribozym durch einen Analyten und einen doppelt markierten Substratstrang kooperativ stabilisiert wird.<sup>[270]</sup>

In einem weiteren eleganten Beispiel wurde ein Aptazymbauteil zur Detektion einer viralen RNA in attomolarer Konzentration verwendet.<sup>[244]</sup> Polisky, Seiwert et al. verwendeten ein Ribozym mit RNA-Ligase-Aktivität, das nach der Bindung mit einer speziellen Region der viralen RNA dazu fähig wird, ein Substrat, das seinerseits aus zwei RNA-Strängen besteht, zu ligieren (Abbildung 22 D). Ohne den viralen Strang ist das Ribozym nicht zur Ligation des bimolekularen RNA-Substrats fähig. Nach der Erkennung der viralen RNA-Region wird die Ligase-Aktivität des Ribozyms eingeschaltet, und das Substrat wird mit einer dreimilliardenfach erhöhten Geschwindigkeit ligiert, was dieses System äußerst detektionsempfindlich macht.

#### 7.2. Biologische Bildgebungsverfahren

DNA- und RNA-Strukturen haben als Reporter für chemische Größen intrazellulär und in vivo Einzug gehalten. Wie bereits in Abschnitt 3.2 erwähnt, sind i-Motiv- und G-Quadruplex-Bauteile robuste Sensoren für den pH-Wert wie auch für Metallionen – und zwar sowohl frei in Lösung als auch in immobilisierter Form. Ein wesentlicher Machbarkeitsnachweis für intrazelluläre Sensoren auf Grundlage von DNA sind i-Motiv-basierte molekulare Strukturen, die den pH-Wert im Endosom lebender Zellen bestimmen können. Krishnan et al. hefteten ein i-Motiv-Bauteil über eine Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an das Protein Transferrin.<sup>[121]</sup> Dieser ternäre Komplex wurde von lebenden Zellen mithilfe des Transferrinrezeptors effizient in das Endosom aufgenommen. Daher ist ein solches i-Motiv-Bauteil nur in solchen Endosomen anzutreffen, die den Transferrinrezeptor enthalten. Während der Reifung der Endosomen war es möglich, durch FRET zwischen Fluoreszenzmarkern, die an ein i-Motiv-Bauteil geheftet waren, die pH-Änderungen in Echtzeit zu verfolgen. Die Zeitauflösung dieser pH-Karten jedoch ist eher niedrig, und man muss beachten, ob das Anbringen großer Komplexe aus Streptavidin und DNA an ein bestimmtes Protein nicht die dem Protein inhärenten Transporteigenschaften verändert.

Nukleinsäure-Strukturen wurden auch dazu verwendet, RNA-Moleküle in lebenden Systemen zu detektieren und abzubilden. Mit Molecular Beacons lässt sich mRNA durch

die Hybridisierung mit dem Zielobjekt in Echtzeit direkt sichtbar machen – so geschehen in lebenden Zellen<sup>[271]</sup> und in Oozyten von *Drosophila*-Embryos.<sup>[272]</sup> In einem anderen Beispiel wurde gereifte microRNA über die lacZ-mRNA<sup>[273]</sup> oder Luziferase-mRNA nachgewiesen,<sup>[274]</sup> indem ein von microRNA ansprechbares Element in die 3'-UTR der mRNA eingebaut wurde. Daher zeigte Gewebe, in dem die microRNA nicht vorhanden war, wegen der effizienten Translation der mRNA eine  $\beta$ -Galactosidase( $\beta$ -Gal)- oder Luziferase-Aktivität, während in solchem Gewebe, in dem die microRNA vorlag,  $\beta$ -Gal nicht nachzuweisen war. Diese Methode wird inzwischen weithin zur Expressionsdetektion von microRNA eingesetzt.

Nukleinsäurerüstete wurden auch zur Bildgebung in vivo verwendet.<sup>[275]</sup> Zu diesem Zweck wurden Aptamere mit Bildgebungsmarkern wie Fluorophoren,<sup>[276]</sup> Quantenpunkten<sup>[277]</sup> oder magnetischen Nanopartikeln<sup>[278]</sup> chemisch funktionalisiert. Ein elementares Beispiel hierfür ist die Arbeit von Smith und Mitarbeitern, die ein Elastase-Aptamer nutzten, das an die Oberfläche aktivierter Neutrophile anbindet. Hiermit konnte gezeigt werden, dass mit dem <sup>99m</sup>Tc-funktionalisierten Aptamer im Gammastrahlendetektor Entzündungen bei Ratten abgebildet werden können.<sup>[254]</sup> Das Aptamer zeigte eine bessere Leistung als der Antikörper IgG, der klinisch zur Sichtbarmachung von Entzündungen eingesetzt wird. Die erhöhte Effizienz hängt mit dem schnelleren Abtransport des Aptamers aus dem Blut wegen seines niedrigeren Molekulargewichts zusammen.

### 7.3. Nukleinsäurebauteile für zielgerichteten Wirkstoff-Transport und therapeutische Anwendungen

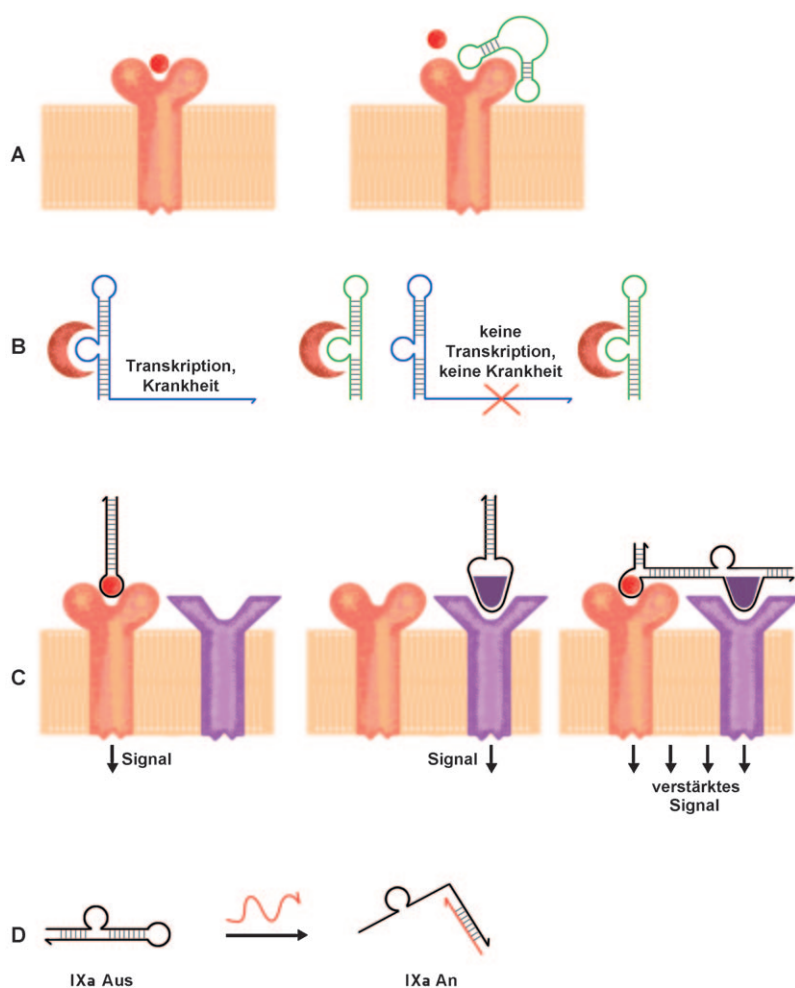
Außer in der Biosensorik und in biologischen Bildgebungsverfahren wurden Nukleinsäurestrukturen bereits für eine Vielzahl von molekularen Werkzeugen mit großem Potenzial für Anwendungen in vivo verwendet.<sup>[279]</sup> So wurde mit DNA eine Vielfalt an Polyedern<sup>[196,197,200,280]</sup> erzeugt, und Turberfield et al. demonstrierten, dass sich kleine Proteine kovalent im hohlen Innern eines DNA-Tetraeders positionieren lassen (siehe Abschnitt 5.2).<sup>[201]</sup> Krishnan und Mitarbeiter haben außerdem gezeigt, dass DNA-Polyeder verwendet werden können, um freie Goldnanopartikel aus Lösung mit hoher Effizienz einzukapseln.<sup>[281]</sup> Insgesamt lässt dies darauf schließen, dass sich DNA-Polyeder als Kapseln für bioaktive Moleküle nutzen lassen, die größer als die Porengröße des Polyeders sind. DNA-Polyeder können als leckfreie Liposomanaloga fungieren und nebenbei eine schützende und programmierbare Hülle für eine biologisch abbaubare molekulare Fracht darstellen. In letzter Zeit deutet sich an, dass Nanoröhrenstrukturen in manchen Anwendungen für den Wirkstoff-Transport besser geeignet sein könnten.<sup>[282]</sup> Yan et al. gelang es, DNA-Nanoröhren mit herausragender Genauigkeit zu dimensionieren und zu funktionalisieren.<sup>[283]</sup> Tatsächlich wurden Folsäure-modifizierte DNA-Nanoröhren erfolgreich in Zellen eingebracht.<sup>[284]</sup>

Ebenso wie funktionalisierte Liposomen zur gewebespezifischen Freisetzung von Wirkstoffen Verwendung finden,<sup>[285]</sup> lassen sich auch molekulare Nukleinsäuremotive als Naviga-

tionsmodule für eine gewebespezifische Abgabe einer molekularen Ladung in vivo einsetzen. Zellen, die zu unterschiedlichen Gewebetypen gehören, exprimieren unterschiedliche Zelloberflächenrezeptoren.<sup>[286]</sup> Eine gewebespezifische Freisetzung wird gewöhnlich über die Verwendung von Antikörpern erreicht, die wichtige Zelloberflächen-Rezeptoren einer bestimmten Gewebeart erkennen und sich daher in der Umgebung des Zielgewebes anreichern.<sup>[287]</sup> Antikörper für Schlüsselrezeptoren werden in vielen solcher Anwendungen nach und nach durch Aptameranaloga ersetzt. Die Anpassungsfähigkeit von Nukleinsäurestrukturen bezüglich einer chemischen Funktionalisierung hat es ermöglicht, dass sich so eine Vielzahl von molekularen „Ladegütern“ für einen effektiven Transport in vivo kovalent anbinden ließ. Beispielsweise handelt es sich bei PSMA (prostataspezifisches Membran-Antigen) um ein Protein, dass in vielen Krebszellen überexprimiert wird. Dieses Protein pendelt kontinuierlich zwischen der Plasmamembran und dem Inneren der Zelle und kann daher Moleküle aus dem extrazellulären Medium in das Innere der Zelle schleusen. Demgemäß konnten PSMA-Aptamere über kovalente Modifizierung ihr Ladegut, wie siRNAs,<sup>[288]</sup> niedermolekulare Verbindungen (z.B. Doxorubicin),<sup>[289]</sup> Toxine<sup>[290]</sup> und wirkstoffbeladene Nanopartikel,<sup>[291]</sup> einschleusen. Ihre Fähigkeit, sich spezifisch an verschiedene Gewebetypen anzulagern, vereint mit ihrer chemischen Funktionalisierbarkeit, erhöht das Potenzial von Aptameren für siRNA-Therapien verschiedener Krankheiten,<sup>[292]</sup> des Weiteren für die photodynamische Therapie,<sup>[293]</sup> Bor-Neutroneneinfangtherapie (boron neutron capture therapy)<sup>[294]</sup> oder eine Enzyersatztherapie<sup>[295]</sup> durch die Anreicherung des relevanten molekularen Agenten an den Zielpunkten.

Aptamere, die gegen Wirkstoffziele wie Koagulations- und Wachstumsfaktoren, Hormone, Entzündungsmarker, neuropathologische Ziele, mit Infektionskrankheiten assoziierte Proteine (infectious disease associated proteins) und sogar ganze Organismen entwickelt wurden, haben großes therapeutisches Potenzial gezeigt. Für eine eingehende Übersicht über die Entwicklung solcher Aptamere sei auf die Artikel von Nimjee et al. sowie Thiel und Giangrande verwiesen.<sup>[279,296]</sup> Hier beschreiben wir die allgemeinen molekularen Prinzipien, nach denen diese Aptamer-basierten Werkzeuge in vivo funktionieren. Ein Weg ist die Funktionsinhibierung des molekularen Ziels durch das Aptamer, d.h., das Aptamer wirkt in diesem Fall als Rezeptorantagonist (Abbildung 23 A). Die Unterdrückung der Gefäßneubildung beispielsweise ist eine Schlüsselstrategie gegen Krebs; in diesem Zusammenhang ist das Aptamer Pegaptanib erwähnenswert, das an die Heparin-bindende Domäne von VEGF-165 bindet, sie damit blockiert und so eine Vaskularisation verhindert.<sup>[297]</sup> Auf ähnliche Weise wirkt eine Klasse von Oligonukleotiden, die G-Quadruplexe bilden (Antisoma), als Aptamere, die Nukleolin binden und inhibieren, was zu Antiproliferationseffekten führt.<sup>[298]</sup> Da Nukleolin jedoch viele verschiedene zelluläre Funktionen hat, konnte eine Wirkung von Antisoma auf eine spezifische Funktion von Nukleolin nicht genau zugeordnet werden. Aptamere können auch als Köder fungieren, indem sie einem molekularen Wirkstoffziel eine konkurrierende Bindungsgruppe anbieten (Abbil-





**Abbildung 23.** A) Aptamere als Rezeptorantagonisten: Das Anbinden des Aptamers (grün) verhindert die Anbindung des natürlichen Rezeptorliganden (rot). B) Aptamere als Köder: Durch die Imitation des natürlichen Zielobjekts wird eine zelluläre Antwort unterdrückt. C) Ein Aptamer stimuliert entweder den OX40- oder den 4-1BB-Rezeptor. Die Kombination beider Module in einem einzigen Aptamergerüst leistet eine Kostimulation.<sup>[307]</sup> D) Aptamere als Schalter in vivo: Das REG-1-Aptamer (schwarz) inhibiert den Gerinnungsfaktor IXa. Das Einbringen eines Gegenmittelstrangs (antidote strand; rot) hebt die Inhibition auf.<sup>[305, 306]</sup>

Abbildung 23B). Die Wirkung verschiedener RNA- oder DNA-bindender Proteine, die Wirkstoffziele darstellen, kann gehemmt werden, indem man ihre Anbindung an die zugehörigen natürlich vorkommenden DNA/RNA-Sequenzen dadurch verhindert, dass man Aptamere zur Verfügung stellt, die eben diese DNA/RNA-Sequenzen enthalten. So konnte HIV durch die Adressierung von HIV-TAR<sup>[299]</sup> und tat<sup>[300]</sup> oder durch die Imitation des Rev-responsiven Elements unterdrückt werden.<sup>[301]</sup> Auf ähnliche Weise konnten Aptamere mit konkurrierenden Sequenzen für Transkriptionsfaktoren wie die aus der E2F-Familie<sup>[302]</sup> oder NFκB<sup>[303]</sup> die Aktivität der entsprechenden Transkriptionsfaktoren wirksam blockieren, was Behandlungen von Ekzemen und Dermatitis ermöglichen könnte.

Ein wichtiger Aspekt des Nukleinsäuregrundgerüsts ist seine Modularität, und so ist dieses biomolekulare Gerüst dazu prädestiniert, aus verschiedenen, beliebig kombinier-

baren Modulen molekulare Werkzeuge zu generieren, die eine entsprechend vergrößerte funktionale Diversität und verbesserte Effizienz aufweisen. Wir haben bereits beschrieben, wie die Erzeugung funktionaler Diversität durch Kombination von Modulen zur Klasse der Aptazyme führt (siehe Abschnitt 7.1). Der Fall einer erhöhten funktionalen Effizienz sei anhand der Kombination mehrerer Aptamermodule illustriert (Abbildung 23C): Durch die Kombination von Aptameren für bestimmte Motive, die Teil desselben molekularen Ziels sind, lassen sich bivalente Aptamere erzeugen, die eine höhere Affinität zum Zielobjekt als die einzelnen Aptamererkennungsmodulen aufweisen.<sup>[304]</sup> Eine solche bivalente Strategie kann über eine Inhibition<sup>[305, 306]</sup> oder Aktivierung des Zielobjekts funktionieren. Dies ist schön illustriert im Falle der Aktivierung einer Antitumor-Immunantwort, bei der Aptamermodule für unterschiedliche Ziele zur Kostimulation von T-Zellen-Rezeptoren kombiniert worden sind. Hier konnte ein bivalentes Aptamer für 4-1BB- oder OX40-Rezeptoren eine sehr viel effizientere Immunantwort als jeweils nur eines der beiden Aptamere für sich hervorrufen (Abbildung 23C).<sup>[307]</sup>

Aptamerbauteile können auch als Schalter in vivo fungieren. In einem Beispiel werden die kurzen Halbwertszeiten von Aptameren genutzt. Bei Prozeduren wie kardiologisch-vaskulären Operationen werden Antikoagulatoren verwendet. Unter solchen Bedingungen können Aptamere während einer einstellbaren Zeitspanne für eine gerinnungshemmende Wirkung sorgen, nach deren Ablauf sie effizient abgebaut werden. Beispielsweise wird das RNA-Aptamer REG1 (RB006) verwendet, um den Koagulationsfaktor IXa zu erkennen und die Gerinnung zu verhindern (Abbildung 23D). Die Inhibition des Faktors IXa kann, wann immer es gewünscht wird, durch die Zugabe eines RNA-Gegenmittelstrangs RB007 aufgehoben werden, der mit RB006 hybridisiert und die Bindung zwischen RB006 und dem Koagulationsfaktor IXa aufhebt.<sup>[305, 306]</sup>

Angesichts des Potenzials von Aptamermodulen für den zielgerichteten Wirkstoff-Transport und für die Therapeutik könnten sich durch die Kombination dieser Strukturmodule mit DNA-Architekturen, dem DNA-Computing und DNA-Aktuatoren multifunktionale und „intelligente“ molekulare Maschinen für die Wirkstoff-Freisetzung oder auch therapeutische Eingriffe verwirklichen lassen.

## 8. Zusammenfassung und Ausblick

In den zurückliegenden Jahren haben sich DNA und RNA als herausragende Moleküle für den Entwurf und die expe-

rimentelle Ausführung von künstlichen molekularen Maschinen erwiesen. Die vorhersagbare, sequenzabhängige Strukturgebung dieser Moleküle ermöglicht die programmierbare Anordnung von supramolekularen Strukturen, die zwischen einer Reihe von bestimmten Zuständen oder Konformationen hin- und hergeschaltet werden kann. Einer der elementaren Vorzüge von Nukleinsäuren als molekulares Gerüst ist ihre Modularität und dabei insbesondere ihre Fähigkeit, multiple funktionale Einheiten in einer einzigen Struktur zu verknüpfen, um damit multifunktionale Werkzeuge zu generieren. Die biochemischen und chemischen Techniken, die für die Anfertigung solcher Bauteile in einer akzeptablen Menge notwendig sind, sind bereits vorhanden und werden kontinuierlich verbessert.

In der Grundlagenforschung werden solche DNA- oder RNA-Schalter momentan verwendet, um physikalische Aspekte von molekularen Maschinen in einem nichtbiologischen Zusammenhang zu untersuchen. Theoretische Konzepte, wie etwa Brownsche Läufer und molekulare Computer, werden mithilfe von DNA-Molekülen direkt implementiert. Ein interessanter Aspekt dieses Ansatzes ist die Möglichkeit eines direkten Rückschlusses vom Experiment auf die Theorie. Viele Aspekte von DNA-Bauteilen wie ihre mechanische Stabilität oder ihre Reaktionskinetik sind einfach einstellbar.

Auf der anderen Seite sind Wissenschaftler aber auch dabei, echte Anwendungen für Bauteile aus Nukleinsäuren zu suchen. Vielversprechende Beispiele lassen sich unter schaltbaren Materialien, molekularen Behältern und der DNA-vermittelten Synthese finden. Es gibt eine Fülle von Anwendungen von Nukleinsäurebauteilen in der Biologie. Nukleinsäuren können für die Konstruktion von Biosensoren, molekularen Computern und diagnostischen Hilfsmitteln eingesetzt werden, die sogar unter In-vivo-Bedingungen funktionstüchtig sind.

Molekulare Schalter aus Nukleinsäuren werden daher wahrscheinlich einen weitreichenden Einfluss auf so unterschiedliche Bereiche wie die Materialwissenschaften, die Physik biomolekularer Strukturen und Funktionen oder in biologischen Systemen haben; die Natur nutzt längst schon die Formbarkeit von DNA- und RNA-Strukturen, um als Antwort auf spezifische molekulare Auslöser spezifische Ausgabesignale zu erzeugen. Zelluläre Funktionen sind das Ergebnis von vielfältigen Berechnungen auf der Basis von Nukleinsäurestrukturen, die letztlich die Genexpression kontrollieren. Daher sind Nukleinsäuren sicherlich auch dazu in der Lage, sehr viel komplexere Rechenaufgaben und Stellbewegungen in vitro durchzuführen. Eine der Befürchtungen ist hier, dass sich die Geschwindigkeit der Konformationsänderungen von Nukleinsäuren als geschwindigkeitsbestimmend erweisen könnte. Daher besteht auch ein Bedarf an Schaltern, die noch schneller werden und neue Strukturübergänge aufweisen, die auf der Zeitskala von Millisekunden oder darunter stattfinden.<sup>[37,96,153]</sup>

Zukünftig wird die Konstruktion von deutlich komplexeren Architekturen den Schlüssel dafür liefern, die mechanischen und strukturellen Einschränkungen von DNA oder RNA bezüglich ihrer Eigenschaften als nanoskalige Konstruktionsmaterialien besser zu verstehen. Diese Einschrän-

kungen werden letztlich auch den möglichen Grad an Komplexität bestimmen, den man mit molekularen Schaltern aus Nukleinsäuren erreichen kann.

Für einige Anwendungen sind Nukleinsäuren bereits jetzt die idealen Moleküle, beispielsweise, wenn molekulare Bauteile mit genetischen Prozessen verknüpft werden sollen oder wenn einfache und robuste Biosensoren benötigt werden. Bei anderen Anwendungen mögen sich andere Substrate, wie Peptide oder synthetische organische Moleküle, als geeigneter erweisen, auch wenn sie zum jetzigen Zeitpunkt nicht hinreichend steuerbar scheinen. In diesen Fällen sind molekulare Maschinen und Werkzeuge aus Nukleinsäuren aber eine bereits jetzt verfügbare Alternative zur Erforschung der allgemeinen Prinzipien, die der molekularen Selbstorganisation und molekularen Maschinen zugrunde liegen.

*F.C.S. dankt der DFG für die Unterstützung durch den Exzellenzcluster der „Nanosystems Initiative Munich“. Y.K. bedankt sich für die Auszeichnung als „Innovative Young Biotechnologist“ durch das DBT und dankt der Initiative „DST Nanoscience“ für die Bereitstellung von Geldmitteln.*

Eingegangen am 22. Dezember 2009,  
veränderte Fassung am 5. Juni 2010

- [1] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, 99, 237.
- [2] J. Zheng, J. J. Birktoft, Y. Chen, T. Wang, R. Sha, P. E. Constantinou, S. L. Ginell, C. Mao, N. C. Seeman, *Nature* **2009**, 461, 74.
- [3] L. M. Adleman, *Science* **1994**, 266, 1021.
- [4] C. D. Mao, W. Q. Sun, Z. Y. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, 397, 144.
- [5] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature* **2000**, 406, 605.
- [6] D. S. Wilson, J. W. Szostak, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 611.
- [7] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 303.
- [8] K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, W. Tan, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 870; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 856.
- [9] V. Balzani, A. Credi, M. Venturi, *Molekular Komponenten und Machines*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [10] N. C. Seeman, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, 30, 119; M. K. Beisenhirtz, I. Willner, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 3392; F. C. Simmel, *Nanomedicine* **2007**, 2, 817; J. Bath, A. J. Turberfield, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 275.
- [11] V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco, Jr., *Nucleic Acids*, University Science Books, Sausalito, **2000**.
- [12] J. SantaLucia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 1460.
- [13] M. Zuker, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 3406.
- [14] I. L. Hofacker, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 3429.
- [15] N. Peyret, P. A. Seneviratne, H. T. Allawi, J. SantaLucia, *Biochemistry* **1999**, 38, 3468.
- [16] R. M. Dirks, J. S. Bois, J. M. Schaeffer, E. Winfree, N. A. Pierce, *Siam Rev.* **2007**, 49, 65.
- [17] D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Biochimie* **2008**, 90, 1040.
- [18] S. Muhuri, K. Mimura, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 9268.
- [19] H.-Q. Yu, D.-H. Zhang, X.-B. Gu, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 9174; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9034.
- [20] I. Schoen, H. Krammer, D. Braun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 21649.

- [21] A. J. Turberfield, J. C. Mitchell, B. Yurke, A. P. Mills, M. I. Blakey, F. C. Simmel, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 118102.
- [22] G. Seelig, B. Yurke, E. Winfree, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12211.
- [23] L. P. Reynaldo, A. V. Vologodskii, B. P. Neri, V. I. Lyamichev, *J. Mol. Biol.* **2000**, *297*, 511.
- [24] B. Yurke, A. Mills, *Genetic Programming and Evolvable Machines* **2003**, *4*, 111.
- [25] I. G. Panyutin, P. Hsieh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2021.
- [26] S. McKinney, A. Declais, D. Lilley, T. Ha, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 93.
- [27] S. W. Choi, N. Makita, S. Inoue, C. Lesoil, A. Yamayoshi, A. Kano, T. Akaike, A. Maruyama, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 172.
- [28] W. H. Taylor, P. J. Hagerman, *J. Mol. Biol.* **1990**, *212*, 363.
- [29] S. B. Smith, L. Finzi, C. Bustamante, *Science* **1992**, *258*, 1122; C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, S. Smith, *Science* **1994**, *265*, 1599.
- [30] S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, *Science* **1996**, *271*, 795.
- [31] T. T. Perkins, D. E. Smith, R. G. Larson, S. Chu, *Science* **1995**, *268*, 83.
- [32] T. Odijk, *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* **1977**, *15*, 477; J. Skolnick, M. Fixman, *Macromolecules* **1977**, *10*, 944; J.-L. Barrat, J.-F. Joanny, *Europhys. Lett.* **1993**, *24*, 333.
- [33] C. G. Baumann, S. B. Smith, V. A. Bloomfield, C. Bustamante, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6185.
- [34] H. Abelson, *Communications of the ACM* **2000**, *43*, 74.
- [35] B. Tinland, A. Pluen, J. Sturm, G. Weill, *Macromolecules* **1997**, *30*, 5763; C. Rivetti, C. Walker, C. Bustamante, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 41; K. Rechendorff, G. Witz, J. Adamcik, G. Dietler, *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 095103.
- [36] A. Rich, F. H. C. Crick, J. D. Watson, D. R. Davies, *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 71.
- [37] S. Chakraborty, S. Sharma, P. K. Maiti, Y. Krishnan, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 2810.
- [38] M. Gueron, J. L. Leroy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 326; K. Snoussi, S. Nonin-Lecomte, J. L. Leroy, *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 139.
- [39] S. Kumari, A. Bugaut, J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 218.
- [40] A. T. Phan, V. Kuryavyy, D. J. Patel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 288.
- [41] H. J. Lipps, D. Rhodes, *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 414; H. M. Wong, L. Payet, J. L. Huppert, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2009**, *11*, 146.
- [42] D. Monchaud, M. P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 627.
- [43] H. Fernando, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, *Biochemistry* **2008**, *47*, 9365.
- [44] Y. Krishnan-Ghosh, E. Stephens, S. Balasubramanian, *Chem. Commun.* **2005**, 5278; J. T. Nielsen, K. Arar, M. Petersen, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2006; N. Kumar, J. T. Nielsen, S. Maiti, M. Petersen, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9380; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9220; J. L. Mergny, L. Lacroix, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 4797.
- [45] A. Paul, P. Sengupta, Y. Krishnan, S. Ladame, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 8682; Y. Xu, Y. Suzuki, M. Komiyama, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3331; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3281; V. L. Marin, B. A. Armitage, *Biochemistry* **2006**, *45*, 1745; S. Chakraborty, S. Modi, Y. Krishnan, *Chem. Commun.* **2008**, *70*; S. Modi, A. H. Wani, Y. Krishnan, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 4354; S. Chakraborty, Y. Krishnan, *Biochimie* **2008**, *90*, 1088.
- [46] Y. Wang, D.-J. Patel, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 1171.
- [47] J. C. Chaput, C. Switzer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10614.
- [48] G. Felsenfeld, D. R. Davies, A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2023.
- [49] H. Y. Han, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3806.
- [50] M. D. Frank-Kamenetskii, S. M. Mirkin, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 65; D. E. Gilbert, J. Feigon, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 305.
- [51] C. E. Pearson, R. R. Sinden, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5041.
- [52] S. M. Mirkin, V. I. Lyamichev, K. N. Drushlyak, V. N. Dobrynin, S. A. Filippov, M. D. Frankkamenetskii, *Nature* **1987**, *330*, 495.
- [53] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, *289*, 905; B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartsch, V. Ramakrishnan, *Nature* **2000**, *407*, 327; J. Harms, F. Schluenzen, R. Zarivach, A. Bashan, S. Gat, I. Agmon, H. Bartels, F. Franceschi, A. Yonath, *Cell* **2001**, *107*, 679; P. L. Adams, M. R. Stahley, A. B. Kosek, J. M. Wang, S. A. Strobel, *Nature* **2004**, *430*, 45.
- [54] S. R. Holbrook, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 445.
- [55] N. B. Leontis, E. Westhof, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 300; P. B. Moore, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 287.
- [56] M. Tamura, D. K. Hendrix, P. S. Klosterman, N. R. B. Schimmel, S. E. Brenner, S. R. Holbrook, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, D182.
- [57] C. Tuerk, P. Gauss, C. Thermes, D. R. Groebe, M. Gayle, N. Guild, G. Stormo, Y. Daubentoncarafa, O. C. Uhlenbeck, I. Tinoco, E. N. Brody, L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 1364; C. R. Woese, S. Winker, R. R. Gutell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8467.
- [58] S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, McPherson, A. J. L. Sussman, A. H. J. Wang, N. C. Seeman, A. Rich, *Science* **1974**, *185*, 435.
- [59] R. F. Gestelund, T. R. Cech, J. F. Atkins, *The RNA World*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, **1999**.
- [60] H. W. Pley, K. M. Flaherty, D. B. McKay, *Nature* **1994**, *372*, 111.
- [61] K. Y. Chang, I. Tinoco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8705.
- [62] G. J. Quigley, A. Rich, *Science* **1976**, *194*, 796.
- [63] J. C. Lee, J. J. Cannone, R. R. Gutell, *J. Mol. Biol.* **2003**, *325*, 65.
- [64] D. J. Klein, T. M. Schmeing, P. B. Moore, T. A. Steitz, *EMBO J.* **2001**, *20*, 4214.
- [65] S. Szep, J. M. Wang, P. B. Moore, *RNA* **2003**, *9*, 44.
- [66] J. H. Gate, A. R. Gooding, E. Podell, K. H. Zhou, B. L. Golden, A. A. Szewczak, C. E. Kundrot, T. R. Cech, J. A. Doudna, *Science* **1996**, *273*, 1696.
- [67] M. Tamura, S. R. Holbrook, *J. Mol. Biol.* **2002**, *320*, 455.
- [68] P. Nissen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4899.
- [69] S. V. Steinberg, Y. I. Boutorine, *RNA* **2007**, *13*, 549.
- [70] G. Mayer, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2710; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2672.
- [71] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818; C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505.
- [72] N. Kawazoe, Y. Ito, Y. Imanishi, *Biotechnol. Prog.* **1997**, *13*, 873.
- [73] C. Pestourie, B. Tavittian, F. Duconge, *Biochimie* **2005**, *87*, 921.
- [74] D. M. J. Lilley, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 313.
- [75] S. K. Silverman, *Chem. Commun.* **2008**, 3467; J. Achenbach, W. Chiuman, R. Cruz, Y. Li, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2004**, *5*, 321.
- [76] A. Jäschke, B. Seelig, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 257.
- [77] B. Seelig, A. Jäschke, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 167.
- [78] S. Fusz, A. Eisenfuhr, S. G. Srivatsan, A. Heckel, M. Famulok, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 941.
- [79] G. Sengle, A. Eisenfuhr, P. Arora, J. Nowick, M. Famulok, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 459.
- [80] P. J. Unrau, D. P. Bartel, *Nature* **1998**, *395*, 260.
- [81] M. Illangasekare, G. Sanchez, T. Nickles, M. Yarus, *Science* **1995**, *267*, 643; P. A. Lohse, J. W. Szostak, *Nature* **1996**, *381*, 442; A. Jenne, M. Famulok, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 23; N. Lee, Y.



- Bessho, K. Wei, J. W. Szostak, H. Suga, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 28.
- [82] S. Chun, S. Jeong, J. Kim, B. Chong, Y. Park, H. Park, J. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10844.
- [83] T. L. Sheppard, P. Ordoukhanian, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 7802.
- [84] Y. Li, Y. Liu, R. R. Breaker, *Biochemistry* **2000**, 39, 3106.
- [85] F. Huang, M. Yarus, *Biochemistry* **1997**, 36, 6557.
- [86] I. Willner, B. Shlyahovsky, M. Zayats, B. Willner, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1153; Z. Wang, J. H. Lee, Y. Lu, *Adv. Mater.* **2008**, 20, 3263; K. Schlosser, Y. Li, *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 413.
- [87] J. Liu, Z. Cao, Y. Lu, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 1948.
- [88] M. N. Stojanovic, *Prog. Nucleic Acid Res.* **2008**, 82, 199.
- [89] M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3715.
- [90] P. Burgstaller, A. Jenne, M. Blind, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2002**, 5, 690; T. Kuwabara, M. Warashina, K. Taira, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 669; M. P. Robertson, A. D. Ellington, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 62.
- [91] N. Piganeau, A. Jenne, V. Thuillier, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 4538; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4369.
- [92] N. C. Seeman, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1990**, 8, 573; A. Brennenman, A. Condon, *Theor. Comput. Sci.* **2002**, 287, 39; U. Feldkamp, S. Saghafi, W. Banzhaf, H. Rauhe in *DNA Computing* (Hrsg.: N. Jonoska, N. C. Seeman), Springer, Tampa, FL, **2001**, S. 23 (7th International Workshop on DNA-based Computers, DNA7, Vol. 2340); R. M. Dirks, N. A. Pierce, *J. Comput. Chem.* **2003**, 24, 1664.
- [93] R. M. Dirks, M. Lin, E. Winfree, N. A. Pierce, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 1392.
- [94] L. Jaeger, E. Westhof, N. B. Leontis, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 455.
- [95] V. Viasnoff, A. Meller, H. Isambert, *Nano Lett.* **2006**, 6, 101; R. Tashiro, H. Sugiyama, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 6200; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 6018.
- [96] X. Liang, H. Nishioka, N. Takenaka, H. Asanuma, *ChemBioChem* **2008**, 9, 702.
- [97] S.-n. Uno, C. Dohno, H. Bittermann, V. L. Malinovskii, R. Haener, K. Nakatani, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 7498; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7362; H. Kang, H. Liu, J. A. Phillips, Z. Cao, Y. Kim, Y. Chen, Z. Yang, J. Li, W. Tan, *Nano Lett.* **2009**, 9, 2690; S. S. White, H. T. Li, R. J. Marsh, J. D. Piper, N. D. Leonczek, N. Nicolaou, A. J. Bain, L. M. Ying, D. Klenerman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11423.
- [98] Y. Ogura, T. Nishimura, J. Tanida, *Appl. Phys. Express* **2009**, 2, 025004.
- [99] C. V. Miduturu, S. K. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10144.
- [100] W. Shen, M. F. Bruist, S. D. Goodman, N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4854; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4750.
- [101] H. Gu, W. Yang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 4352.
- [102] X. Yang, A. V. Vologodskii, B. Liu, B. Kemper, N. C. Seeman, *Biopolymers* **1998**, 45, 69.
- [103] M. A. Fuertes, V. Cepeda, C. Alonso, J. M. Perez, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 2045.
- [104] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, 2, 55; L. Stryer, R. P. Hauglund, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 719; J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2. Aufl., Kluwer Academic, New York, **1999**.
- [105] A. Okamoto, Y. Ochi, I. Saito, *Chem. Commun.* **2005**, 1128.
- [106] C. M. Niemeyer, M. Adler, S. Lenhart, S. Gao, H. Fuchs, L. Chi, *ChemBioChem* **2001**, 2, 260.
- [107] C. Buranachai, S. A. McKinney, T. Ha, *Nano Lett.* **2006**, 6, 496.
- [108] D. M. J. Lilley, *Q. Rev. Biophys.* **2000**, 33, 109.
- [109] S. D. Wettig, G. A. Bare, R. J. S. Skinner, J. S. Lee, *Nano Lett.* **2003**, 3, 617.
- [110] D. C. Harris, X. Chu, J. Jayawickramarajah, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14950.
- [111] Y. Chen, S. H. Lee, C. D. Mao, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 5449; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5335.
- [112] M. Brucale, G. Zuccheri, B. Samorì, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 575.
- [113] Y. Chen, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13240.
- [114] Y. H. Jung, K.-B. Lee, Y.-G. Kim, I. S. Choi, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 6106; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5960; Y. Chen, C. Mao, *Small* **2008**, 4, 2191.
- [115] J. J. Li, W. Tan, *Nano Lett.* **2002**, 2, 315; P. Alberti, J. L. Mergny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 1569.
- [116] A. T. Phan, J. L. Mergny, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 4618.
- [117] D. Liu, S. Balasubramanian, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 5912; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5734.
- [118] H. Liu, Y. Zhou, Y. Yang, W. Wang, L. Qu, C. Chen, D. Liu, D. Zhang, D. Zhu, *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 6893; H. J. Liu, Y. Xu, F. Y. Li, Y. Yang, W. X. Wang, Y. L. Song, D. S. Liu, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 2567; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2515.
- [119] Y. Mao, D. Liu, S. Wang, S. Luo, W. Wang, Y. Yang, Q. Quyang, L. Jiang, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, e33.
- [120] Y. Wang, X. Li, X. Liu, T. Li, *Chem. Commun.* **2007**, 4369.
- [121] S. Modi, M. G. Swetha, D. Goswami, G. D. Gupta, S. Mayor, Y. Krishnan, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 325.
- [122] W. Wang, Y. Yang, E. Cheng, M. Zhao, H. Meng, D. Liu, D. Zhou, *Chem. Commun.* **2009**, 824.
- [123] T. Liedl, F. C. Simmel, *Nano Lett.* **2005**, 5, 1894.
- [124] T. Liedl, M. Olapinski, F. C. Simmel, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5129; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5007.
- [125] W. Wang, H. Liu, D. Liu, Y. Xu, Y. Yang, D. Zhou, *Langmuir* **2007**, 23, 11956; J. Sharma, R. Chhabra, H. Yan, Y. Liu, *Chem. Commun.* **2007**, 477.
- [126] C. Chen, G. Song, J. Ren, X. Qu, *Chem. Commun.* **2008**, 6149.
- [127] D. Liu, A. Bruckbauer, C. Abell, S. Balasubramanian, D. J. Kang, D. Klenerman, D. J. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2067.
- [128] W. M. Shu, D. Liu, M. Watari, C. K. Riener, T. Strunz, M. E. Wellund, S. Balasubramanian, R. A. McKendry, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17054.
- [129] S. Wang, H. Liu, D. Liu, X. Ma, X. Fang, L. Jiang, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 3989; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 3915.
- [130] S. R. Shin, C. K. Lee, S. H. Lee, S. I. Kim, G. M. Spinks, G. G. Wallace, I. So, J.-H. Jeong, T. M. Kang, S. Kim, *Chem. Commun.* **2009**, 1240.
- [131] F. Xia, W. Guo, Y. Mao, X. Hou, J. Xue, H. Xia, L. Wang, Y. Song, H. Ji, Q. Ouyang, Y. Wang, L. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8345.
- [132] Y. Wang, Y. Zhang, N. P. Ong, *Phys. Rev. E* **2005**, 72, 051918.
- [133] R. P. Fahlman, M. Hsing, C. S. Sporer-Tuhten, D. Sen, *Nano Lett.* **2003**, 3, 1073.
- [134] R. Rodriguez, G. D. Pantos, D. P. N. Goncalves, J. K. M. Sunders, S. Balasubramanian, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 5501; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 5405.
- [135] A. Bourdoncle, A. E. Torres, C. Gosse, L. Lacroix, P. Vekhoff, T. Le Saux, L. Jullien, J.-L. Mergny, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11094.
- [136] D. Miyoshi, H. Karimata, Z.-M. Wang, K. Koumoto, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 5919.
- [137] D. Monchaud, P. Yang, L. Lacroix, M.-P. Teulade-Fichou, J.-L. Mergny, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 4936; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 4858.
- [138] A.-E. Radi, C. K. O'Sullivan, *Chem. Commun.* **2006**, 3432; Z.-S. Wu, C.-R. Chen, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Biomaterials* **2008**, 29, 2689.
- [139] S. Nagatoishi, T. Nojima, E. Galezowska, B. Juskowiak, S. Takenaka, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1730.

- [140] F. He, Y. Tang, S. Wang, Y. Li, D. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12343.
- [141] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564; R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe, J. Feigon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3745.
- [142] A. E. Radi, J. L. A. Sanchez, E. Baldrich, C. K. O'Sullivan, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 117; Y. Xiao, B. D. Piorek, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17990.
- [143] W. U. Dittmer, A. Reuter, F. C. Simmel, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3634; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3550.
- [144] V. Pavlov, B. Shlyahovsky, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6522.
- [145] D. Miyoshi, M. Inoue, N. Sugimoto, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7880; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7716.
- [146] F. C. Simmel, B. Yurke, *Phys. Rev. E* **2001**, *63*, 041913.
- [147] F. C. Simmel, B. Yurke, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80*, 883.
- [148] B. Yurke, F. C. Simmel, *GECCO*, Morgan Kaufman, **2002**, S. 147.
- [149] Y. Chen, M. Wang, C. Mao, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3638; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3554; Y. Chen, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8626.
- [150] J. D. Bishop, E. Klavins, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2574.
- [151] F. C. Simmel, B. Yurke, R. J. Sanyal, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2002**, *2*, 383.
- [152] W. J. Kim, T. Ishihara, T. Akaike, A. Maruyama, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 176.
- [153] H. Asanuma, X. Liang, T. Yoshida, M. Komiyama, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 39; H. Asanuma, X. Liang, H. Nishioka, D. Matsunaga, M. Liu, M. Komiyama, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 203.
- [154] R. P. Goodman, M. Heilemann, S. Doose, C. M. Erben, A. N. Kapanidis, A. J. Turberfield, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 93.
- [155] H. Yan, X. Zhang, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **2002**, *415*, 62.
- [156] N. C. Seeman, P. S. Lukeman, *Rep. Prog. Phys.* **2005**, *68*, 237.
- [157] B. Chakraborty, R. Sha, N. C. Seeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17245.
- [158] C. Liu, N. Jonoska, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2641.
- [159] B. Ding, N. C. Seeman, *Science* **2006**, *314*, 1583.
- [160] H. Gu, J. Chao, S.-J. Xiao, N. C. Seeman, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 245.
- [161] H. Zhong, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2899.
- [162] W. U. Dittmer, F. C. Simmel, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 689.
- [163] W. U. Dittmer, S. Kempter, J. O. Radler, F. C. Simmel, *Small* **2005**, *1*, 709.
- [164] R. Nutiu, Y. F. Li, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5600; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5464.
- [165] J. Elbaz, M. Moshe, I. Willner, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3892; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3834.
- [166] E. Friedrichs, F. C. Simmel, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1662.
- [167] R. Nutiu, Y. F. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4771.
- [168] R. D. Astumian, *Science* **1997**, *276*, 917; C. Bustamante, D. Keller, G. Oster, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 412; J. Howard, *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*, 1. Aufl., Sinauer, Sunderland, **2001**; E. R. Kay, D. A. Leigh, F. Zerbetto, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 72; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 72.
- [169] F. C. Simmel, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 2593.
- [170] J. S. Shin, N. A. Pierce, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10834.
- [171] W. B. Sherman, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1203.
- [172] Y. Tian, C. D. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11410.
- [173] P. Yin, H. M. T. Choi, C. R. Calvert, N. A. Pierce, *Nature* **2008**, *451*, 318.
- [174] T. Omabegho, R. Sha, N. C. Seeman, *Science* **2009**, *324*, 67.
- [175] S. J. Green, J. Bath, A. J. Turberfield, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, 4.
- [176] S. Sahu, T. H. LaBean, J. H. Reif, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3870–3878.
- [177] P. Yin, H. Yan, X. G. Daniell, A. J. Turberfield, J. H. Reif, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5014; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4906.
- [178] J. Bath, S. J. Green, A. J. Turberfield, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4432; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4358.
- [179] J. Bath, S. J. Green, K. E. Allen, A. J. Turberfield, *Small* **2009**, *5*, 1513.
- [180] Y. Tian, Y. He, Y. Chen, P. Yin, C. D. Mao, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4429; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4355.
- [181] S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4262.
- [182] R. Pei, S. K. Taylor, D. Stefanovic, S. Rudchenko, T. E. Mitchell, M. N. Stojanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12693.
- [183] K. Lund, A. J. Manzo, N. Dabby, N. Michelotti, A. Johnson-Buck, J. Nangreave, S. Taylor, R. Pei, M. N. Stojanovic, N. G. Walter, E. Winfree, H. Yan, *Nature* **2010**, *465*, 206.
- [184] D. Bray, *Cell Movements*, 2. Aufl., Garland, New York, **2001**.
- [185] E. Paluch, J. van der Gucht, J. Joanny, C. Sykes, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3113.
- [186] S. Venkataraman, R. M. Dirks, P. W. K. Rothmund, E. Winfree, N. A. Pierce, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 490.
- [187] R. M. Dirks, N. A. Pierce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15275.
- [188] I. Y. Galkaev, B. Mattiasson, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 335; Y. Qiu, K. Park, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *53*, 321; N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobundung, H. Ichikawa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 27; B. Jeong, S. W. Kim, Y. H. Bae, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 37.
- [189] D. C. Lin, B. Yurke, N. A. Langrana, *J. Biomech. Eng. Trans. ASME* **2004**, *126*, 104.
- [190] T. Liedl, H. Dietz, B. Yurke, F. C. Simmel, *Small* **2007**, *3*, 1688.
- [191] B. Wei, I. Cheng, K. Luo, Y. Mi, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 337; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 331.
- [192] D. Lubrich, J. Lin, J. Yan, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7134; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7026.
- [193] L. P. Feng, S. H. Park, J. H. Reif, H. Yan, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4342.
- [194] F. C. Simmel, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5968; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5884.
- [195] R. P. Goodman, R. M. Berry, A. J. Turberfield, *Chem. Commun.* **2004**, 1372; C. M. Erben, R. P. Goodman, A. J. Turberfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6992.
- [196] Y. He, T. Ye, M. Su, C. Zhang, A. E. Ribbe, W. Jiang, C. D. Mao, *Nature* **2008**, *452*, 198.
- [197] W. M. Shih, J. D. Quispe, G. F. Joyce, *Nature* **2004**, *427*, 618.
- [198] E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. M. Golas, B. Sunder, H. Stark, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, J. Kjems, *Nature* **2009**, *459*, 73.
- [199] S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Högberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **2009**, *459*, 414.
- [200] J. Zimmermann, M. P. J. Cebulla, S. Mönninghoff, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3682; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3626.
- [201] C. M. Erben, R. P. Goodman, A. J. Turberfield, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7574; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7414.
- [202] F. A. Aldaye, H. F. Sleiman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13376.
- [203] C. M. Niemeyer, *Nano Today* **2007**, *2*, 42.
- [204] B. Y. Choi, G. Zocchi, Y. Wu, S. Chan, L. Jeanne Perry, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 078102.
- [205] L. Röglin, M. R. Ahmadian, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2759; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2704.
- [206] L. Roeglin, F. Altenbrunn, O. Seitz, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 758.
- [207] G. Heiss, V. Lapiene, F. Kukulka, C. M. Niemeyer, C. Bräuchle, D. C. Lamb, *Small* **2009**, *5*, 1169.

- [208] J. Müller, C. Niemeyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 377, 62; O. I. Wilner, Y. Weizmann, R. Gill, O. Lioubashevski, R. Freeman, I. Willner, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 249.
- [209] A. V. Garibotti, S. P. Liao, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2007**, 7, 480.
- [210] X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4956; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4848.
- [211] S. Kauffman, A. D. Ellington, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 256; Z. J. Gartner, B. N. Tse, R. Grubina, J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Science* **2004**, 305, 1601; D. R. Halpin, P. B. Harbury, *Plos Biol.* **2004**, 2, 1022; J. Scheuermann, C. E. Dumelin, S. Melkko, D. Neri, *J. Biotechnol.* **2006**, 126, 568; M. H. Hansen, P. Blakskjaer, L. K. Petersen, T. H. Hansen, J. W. Hojfeldt, K. V. Gothelf, N. J. V. Hansen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 1322.
- [212] H. Gu, J. Chao, S.-J. Xiao, N. C. Seeman, *Nature* **2010**, 465, 202.
- [213] C. H. Bennett, *IBM J. Res. Dev.* **1973**, 17, 525; C. H. Bennett, *Int. J. Theor. Phys.* **1982**, 21, 905.
- [214] R. J. Lipton, *Science* **1995**, 268, 542; K. Sakamoto, H. Gouzu, K. Komiyama, D. Kiga, S. Yokoyama, T. Yokomori, M. Hagiya, *Science* **2000**, 288, 1223.
- [215] D. Faulhammer, A. R. Cukras, R. J. Lipton, L. F. Lundweber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 1385.
- [216] M. N. Stojanovic, D. Stefanovic, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1069; J. Macdonald, Y. Li, M. Sutovic, H. Lederman, K. Pendri, W. H. Lu, B. L. Andrews, D. Stefanovic, M. N. Stojanovic, *Nano Lett.* **2006**, 6, 2598.
- [217] Q. Ouyang, P. D. Kaplan, S. M. Liu, A. Libchaber, *Science* **1997**, 278, 446; Y. Sakakibara, *Natural Comp.* **2003**, 2, 153.
- [218] I.-H. Lee, K.-A. Yang, J.-H. Lee, J.-Y. Park, Y.-G. Chai, B.-T. Zhang, *Nanotechnology* **2008**, 19, 395103.
- [219] R. S. Braich, N. Chelyapov, C. Johnson, P. W. K. Rothmund, L. Adleman, *Science* **2002**, 296, 499.
- [220] Y. Benenson, T. Paz-Elizur, R. Adar, E. Keinan, Z. Livneh, E. Shapiro, *Nature* **2001**, 414, 430; Y. Benenson, B. Gil, U. Bendor, R. Adar, E. Shapiro, *Nature* **2004**, 429, 423; Y. Benenson, R. Adar, T. Paz-Elizur, Z. Livneh, E. Shapiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 2191; R. Adar, Y. Benenson, G. Linshiz, A. Rosner, N. Tishby, E. Shapiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 9960; M. Soreni, S. Yagev, E. Kossoy, Y. Shoham, E. Keinan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3935; E. Kossoy, N. Lavid, M. Soreni, Y. Shoham, E. Keinan, *ChemBioChem* **2007**, 8, 1255.
- [221] Y. Weizmann, Z. Cheglakov, V. Pavlov, I. Willner, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 2296; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2238.
- [222] H. Yan, L. P. Feng, T. H. LaBean, J. H. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14246; R. D. Barish, R. Schulman, P. W. K. Rothmund, E. Winfree, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 6054.
- [223] P. W. K. Rothmund, N. Papadakis, E. Winfree, *Plos Biol.* **2004**, 2, 2041.
- [224] M. N. Stojanovic, T. E. Mitchell, D. Stefanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3555; M. N. Stojanovic, D. Stefanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6673; D. M. Kolpashchikov, M. N. Stojanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11348.
- [225] R. Penchovsky, R. R. Breaker, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 1424.
- [226] R. Yashin, S. Rudchenko, M. N. Stojanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15581.
- [227] S. K. Taylor, R. Pei, B. C. Moon, S. Damara, A. Shen, M. N. Stojanovic, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 4458; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4394.
- [228] G. Seelig, D. Soloveichik, D. Y. Zhang, E. Winfree, *Science* **2006**, 314, 1585.
- [229] D. Y. Zhang, A. J. Turberfield, B. Yurke, E. Winfree, *Science* **2007**, 318, 1121; L. Qian, E. Winfree, *DNA Computing, Lecture Notes in Computer Science, Vol. 5347*, Springer Verlag (Berlin, Heidelberg), **2009**, S. 70.
- [230] D. Soloveichik, G. Seelig, E. Winfree, *DNA Computing, Lecture Notes in Computer Science, Vol. 5347*, Springer Verlag (Berlin, Heidelberg), **2009**, S. 57.
- [231] J. Kim, K. S. White, E. Winfree, *Mol. Syst. Biol.* **2006**, 2, 68.
- [232] F. J. Isaacs, D. J. Dwyer, J. J. Collins, *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24, 545; J. P. Gallivan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 612.
- [233] T. S. Bayer, C. D. Smolke, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 337.
- [234] M. N. Win, C. D. Smolke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 14283.
- [235] M. N. Win, C. D. Smolke, *Science* **2008**, 322, 456.
- [236] K. Rinaudo, L. Bleris, R. Maddamsetti, S. Subramanian, R. Weiss, Y. Benenson, *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25, 795.
- [237] S. Topp, J. P. Gallivan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6807.
- [238] J. W. Szostak, D. P. Bartel, P. L. Luisi, *Nature* **2001**, 409, 387; A. Pohorille, D. Deamer, *Trends Biotechnol.* **2002**, 20, 123; A. C. Forster, G. M. Church, *Mol. Syst. Biol.* **2006**, 2, 45.
- [239] E. J. Cho, J.-W. Lee, A. D. Ellington, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, 2, 241; N. Navani, Y. Li, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 272.
- [240] N. Carmi, S. R. Balkhi, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 2233; J. Liu, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 9838.
- [241] T. Pan, O. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1992**, 31, 3887; J. Li, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10466.
- [242] S. Santoro, G. Joyce, K. Sakthivel, S. Gramatikova, C. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2433.
- [243] J. Liu, A. K. Brown, X. Meng, D. M. Cropek, J. D. Istok, D. B. Watson, Y. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 2056.
- [244] K. Kossen, N. Vaish, V. Jadhav, C. Pasko, H. Wang, R. Jenison, J. McSwiggen, B. Polisky, S. Seiwert, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 807.
- [245] S. Fredriksson, M. Gullberg, J. Jarvius, C. Olsson, K. Pietras, S. Gustafsdottir, A. Ostman, U. Lundegren, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 473.
- [246] T. Mairal, V. C. Oezalp, P. L. Sanchez, M. Mir, I. Katakis, C. K. O'Sullivan, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 390, 989.
- [247] M. N. Stojanovic, D. M. Kolpashchikov, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9266.
- [248] B. Shlyahovsky, D. Li, Y. Weizmann, R. Nowarski, M. Kotler, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3814; D. Li, B. Shlyahovsky, J. Elbaz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 5804.
- [249] R. R. Breaker, *Nature* **2004**, 432, 838; M. Famulok, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2005**, 7, 137; J. Hesselberth, M. P. Robertson, S. Jhaveri, A. D. Ellington, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2000**, 74, 15; G. A. Soukup, R. R. Breaker, *Trends Biotechnol.* **1999**, 17, 469; G. A. Soukup, R. R. Breaker, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, 10, 318; S. K. Silverman, *RNA* **2003**, 9, 377.
- [250] M. Koizumi, G. A. Soukup, J. N. Kerr, R. R. Breaker, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 1062.
- [251] W. Mok, Y. Li, *Sensors* **2008**, 8, 7050.
- [252] M. B. Murphy, S. T. Fuller, P. M. Richardson, S. A. Doyle, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 110e; H. Ulrich, A. Martins, J. Pesquero, *Cytometry Part B* **2004**, 59, 220.
- [253] Y.-F. Huang, H.-T. Chang, W. Tan, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 567.
- [254] J. Charlton, J. Sennello, D. Smith, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 809.
- [255] P. Debbage, W. Jaschke, *Histochem. Cell Biol.* **2008**, 130, 845.
- [256] J. R. Collett, E. J. Cho, A. D. Ellington, *Methods* **2005**, 37, 4; E. J. Cho, J. Collett, A. Szafranska, A. D. Ellington, *Anal. Chim. Acta* **2006**, 564, 82; J.-G. Walter, O. Koekpinar, K. Friehs, F. Stahl, T. Scheper, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 7372; Y.-H. Lao, K. Peck, L.-C. Chen, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 1747.
- [257] C. Ravelet, C. Grosset, E. Peyrin, *J. Chromatogr. A* **2006**, 1117, 1.
- [258] D. W. Drolet, L. MoonMcDermott, T. S. Romig, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 1021.
- [259] E. Baldrich, A. Restrepo, C. O'Sullivan, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 7053.



- [260] H. Zhang, Z. Wang, X. Li, X. Le, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1606; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1576.
- [261] M.-S. L. Raddatz, A. Dolf, E. Endl, P. Knolle, M. Famulok, G. Mayer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5268; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5190.
- [262] X. Chen, M.-C. Estevez, Z. Zhu, Y.-F. Huang, Y. Chen, L. Wang, W. Tan, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7009.
- [263] R. Schäfer, J. Wiskirchen, K. Guo, B. Neumann, R. Kehlbach, J. Pintaske, V. Voth, T. Walker, A. M. Scheule, T. O. Greiner, U. Hermanutz-Klein, C. D. Claussen, H. Northoff, G. Ziemer, H. P. Wendel, *RoeFo Fortschr. Geb. Roentgenstr. Nuklearmed.* **2007**, *179*, 1009.
- [264] M. Blank, T. Weinschenk, M. Priemer, H. Schluesener, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 16464.
- [265] M. C. Alliegro, M. A. Alliegro, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 19037.
- [266] S. H. Um, J. B. Lee, N. Park, S. Y. Kwon, C. C. Umbach, D. Luo, *Nature Materials* **2006**, *5*, 797–801.
- [267] S. Tyagi, D. P. Bratu, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 49.
- [268] L. G. Kostrikis, S. Tyagi, M. M. Mhlanga, D. D. Ho, F. R. Kramer, *Science* **1998**, *279*, 1228; A. S. Piatek, S. Tyagi, A. C. Pol, A. Telenti, L. P. Miller, F. R. Kramer, D. Allund, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 359.
- [269] D. M. Kolpashchikov, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10625.
- [270] E. Mokany, S. M. Bone, P. E. Young, T. B. Doan, A. V. Todd, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1051.
- [271] C. D. Medley, T. J. Drake, J. M. Tomasini, R. J. Rogers, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4713.
- [272] D. P. Bratu, B. J. Cha, M. M. Mhlanga, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13308.
- [273] J. H. Mansfield, B. D. Harfe, R. Nissen, J. Obenauer, J. Srineel, A. Chaudhuri, R. Farzan-Kashani, M. Zuker, A. Pasquinelli, G. Ruvkun, P. A. Sharp, C. Tabin, M. T. McManus, *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 1079.
- [274] S. Yekta, I. H. Shih, D. P. Bartel, *Science* **2004**, *304*, 594.
- [275] B. Tavittian, F. Ducongé, R. Boisgard, F. Dollé, *Methods Mol. Biol.* **2009**, *535*, 241.
- [276] I. German, D. Buchanan, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4540.
- [277] W. C. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016; V. Bagalkot, L. Zhang, E. Levy-Nissenbaum, S. Jon, P. W. Kantoff, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3065.
- [278] B. Bonnemai, *J. Drug Targeting* **1998**, *6*, 167; M. G. Harisinghani, J. Barentsz, P. F. Hahn, W. M. Deserno, S. Tabatabaei, C. H. van de Kaa, J. de La Rosette, R. Weissleder, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 2491.
- [279] S. M. Nimjee, C. P. Rusconi, B. A. Sullenger, *Annu. Rev. Med.* **2005**, *56*, 555.
- [280] R. P. Goodman, I. A. T. Schaap, C. F. Tardin, C. M. Erben, R. M. Berry, C. F. Schmidt, A. J. Turberfield, *Science* **2005**, *310*, 1661.
- [281] D. Bhatia, S. Mehtab, R. Krishnan, S. S. Indi, A. Basu, Y. Krishnan, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4198; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4134.
- [282] C. Martin, P. Kohli, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 29.
- [283] J. Sharma, R. Chhabra, A. Cheng, J. Brownell, Y. Liu, H. Yan, *Science* **2009**, *323*, 112.
- [284] S. Ko, H. Liu, Y. Chen, C. Mao, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3039.
- [285] P. Konigsberg, R. Godtel, T. Kissel, L. L. Richer, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1998**, *1370*, 243.
- [286] B. Lehner, A. G. Fraser, *Trends Genet.* **2004**, *20*, 468.
- [287] E. W. Song, P. C. Zhu, S. K. Lee, D. Chowdhury, S. Kussman, D. M. Dykxhoorn, Y. Feng, D. Palliser, D. B. Weiner, P. Shankar, W. A. Marasco, J. Lieberman, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 709.
- [288] J. O. McNamara, E. R. Undrechek, Y. Wang, K. D. Viles, R. E. Rempel, E. Gilboa, B. A. Sullenger, P. H. Giangrande, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1005.
- [289] V. Bagalkot, O. C. Farokhzad, R. Langer, S. Jon, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8329; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8149.
- [290] T. C. Chu, J. W. Marks, L. A. Lavery, S. Faulkner, M. G. Rosenblum, A. D. Ellington, M. Levy, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 5989; C. S. M. Ferreira, M. C. Cheung, S. Missailidis, S. Bisland, J. Gariepy, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 866.
- [291] O. C. Farokhzad, J. M. Karp, R. Langer, *Expert Opin. Drug Delivery* **2006**, *3*, 311; O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 6315; R. M. Schiffelers, A. Ansari, J. Xu, Q. Zhou, Q. Tang, G. Storm, G. Molema, P. Y. Lu, P. V. Scaria, M. C. Woodle, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e149.
- [292] J. Zhou, P. Swiderski, H. Li, J. Zhang, C. P. Neff, R. Akkina, J. J. Rossi, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 3094; T. C. Chu, K. Y. Twu, A. D. Ellington, M. Levy, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e73; J. Zhou, H. Li, S. Li, J. Zaia, J. J. Rossi, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 1481; M. Khati, M. Schuman, J. Ibrahim, Q. Sattentau, S. Gordon, W. James, *J. Virol.* **2003**, *77*, 12692.
- [293] P. Mallikaratchy, Z. Tang, W. Tan, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 425.
- [294] S. M. Lato, N. D. S. Ozerova, K. He, Z. Sergueeva, B. R. Shaw, D. H. Burke, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1401.
- [295] C.-h. B. Chen, K. R. Dellamaggiore, C. P. Ouellette, C. D. Sedano, M. Lizardjohry, G. A. Chernis, M. Gonzales, F. E. Baltasar, A. L. Fan, R. Myerowitz, E. F. Neufeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15908.
- [296] K. W. Thiel, P. H. Giangrande, *Oligonucleotides* **2009**, *19*, 202.
- [297] E. W. M. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, D. R. Guyer, A. P. Adamis, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 123.
- [298] P. J. Bates, J. P. Kahlon, S. D. Thomas, J. O. Trent, D. M. Miller, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 26369.
- [299] B. A. Sullenger, H. F. Gallardo, G. E. Ungers, E. Gilboa, *Cell* **1990**, *63*, 601.
- [300] C. M. Browning, L. Cagnon, P. D. Good, J. Rossi, D. R. Engelke, D. M. Markovitz, *J. Virol.* **1999**, *73*, 5191; R. Yamamoto, M. Katahira, S. Nishikawa, T. Baba, K. Taira, P. K. R. Kumar, *Genes Cells* **2000**, *5*, 371.
- [301] D. B. Kohn, G. Bauer, C. Rice, J. C. Rothschild, D. A. Carbonaro, P. Valdez, Q. Hao, C. Zhou, I. Bahner, K. Kearns, K. Brody, S. Fox, E. Haden, K. Wilson, C. Salata, C. Dolan, C. Wetter, E. Aguilar-Cordova, J. Church, *Blood* **1999**, *94*, 368.
- [302] P. H. Giangrande, J. Zhang, A. Tanner, A. D. Eckhart, R. E. Rempel, E. R. Undrechek, J. M. Layzer, J. R. Keys, P.-O. Hagen, J. R. Nevins, W. J. Koch, B. A. Sullenger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12988.
- [303] S. E. Wurster, L. J. Maher, *RNA* **2008**, *14*, 1037; L. A. Cassidy, L. J. Maher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3930.
- [304] S. Santulli-Marotto, S. K. Nair, C. Rusconi, B. Sullenger, E. Gilboa, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7483; D. Boucard, J. J. Toulme, C. Di Primo, *Biochemistry* **2006**, *45*, 1518.
- [305] C. P. Rusconi, J. D. Roberts, G. A. Pitoc, S. M. Nimjee, R. R. White, G. Quick, E. Scardino, W. P. Fay, B. A. Sullenger, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1423.
- [306] C. P. Rusconi, E. Scardino, J. Layzer, G. A. Pitoc, T. L. Ortel, D. Monroe, B. A. Sullenger, *Nature* **2002**, *419*, 90.
- [307] J. O. McNamara, D. Kolonias, F. Pastor, R. S. Mittler, L. Chen, P. H. Giangrande, B. A. Sullenger, E. Gilboa, *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 376; C. M. Dollins, S. Nair, D. Boczkowski, J. Lee, J. M. Layzer, E. Gilboa, B. A. Sullenger, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 675.