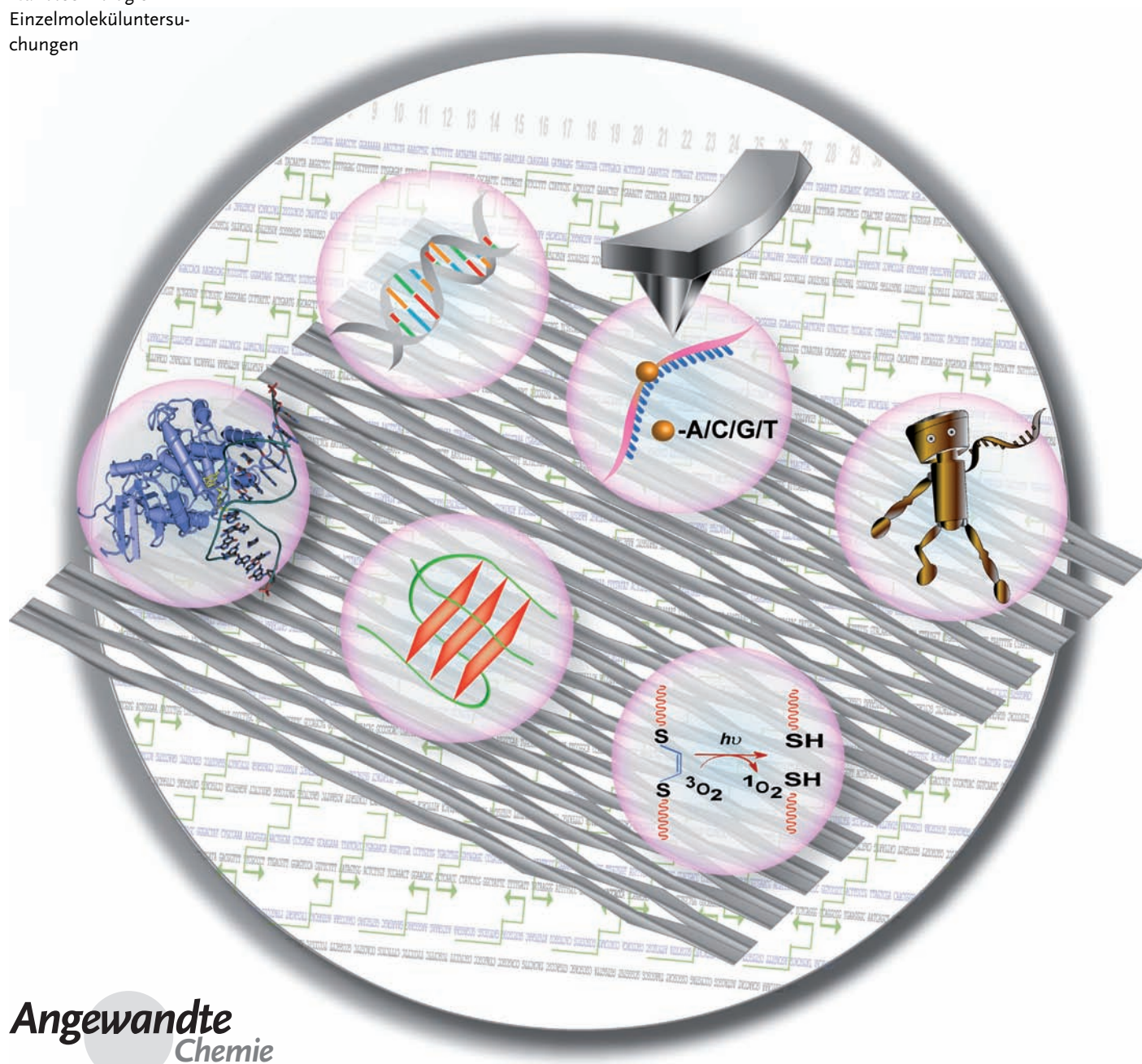


Einzelmolekülanalysen mithilfe von DNA-Origami

Arivazhagan Rajendran, Masayuki Endo* und Hiroshi Sugiyama*

Stichwörter:

Rasterkraftmikroskopie · DNA-Origami ·
Nanobaulemente ·
Nanotechnologie ·
Einzelmoleküluntersu-
chungen



In den letzten beiden Jahrzehnten wurden verschiedene Methoden entwickelt, die den Nachweis und die Manipulation einzelner Moleküle ermöglichen. Ein grundlegendes Verständnis biochemischer Reaktionen wurde mit solchen Methoden ebenso erreicht wie Biomolekülfaltung und Wirkstoff-Screenings. Einzelmolekülanalysen wurden auch in der DNA-Nanotechnologie angewendet. Bis vor Kurzem konnten mit den verbreitetsten Verfahren Strukturen von 10 bis 20 nm erhalten werden, was allerdings für viele Anwendungen nicht ausreicht. Die aktuelle Entwicklung eines „gerüstgebundenen DNA-Origami“ ermöglicht die Konstruktion größerer definierter Anordnungen. Einer der Hauptvorteile des Origami-Verfahrens ist die präzise Umsetzbarkeit der gewünschten Strukturen: Jeder Basenstapel kann als Anheftungspunkt verschiedener Arten von Nanoobjekten wirken. Daher ist die Methode geeignet, um verschiedene Funktionalitäten präzise zu positionieren und viele chemische und biochemische Prozesse auf Einzelmolekülebene zu untersuchen. Hier fassen wir die neuesten Erkenntnisse bei der Einzelmolekülanalyse mit DNA-Origami zusammen und diskutieren die künftigen Aufgaben für die Forschung.

1. Einleitung

Viele chemische und biologische Prozesse sind zu komplex, um sie mit konventionellen Techniken, mit denen viele Moleküle eines Typs oder verschiedener Typen zur selben Zeit untersucht werden, zu analysieren und zu verstehen. In einem solchen Ensembleansatz (Bustamante bezeichnete ihn als „in multiplo“)^[1] summieren sich die Eigenschaftsänderungen aller an der Umsetzung beteiligten Moleküle zu einem messbaren Signal. Solche Methoden werden zwar allgemein eingesetzt, haben aber enorme Nachteile und sind in vielen Fällen überhaupt nicht in der Lage, die Einzelmoleküleigenschaften („in singulo“) eines Systems wiederzugeben. Auf molekularer Ebene laufen die meisten Prozesse isoliert und zufallsgetrieben ab, sodass die als summarisches Signal bestimmten Eigenschaften nicht unbedingt genau die Eigenschaften der Einzelmoleküle repräsentieren. Grundsätzlich laufen alle biochemischen Reaktionen als Reaktionen einzelner Enzyme, Nucleinsäuren (DNA oder RNA) und/oder Proteine ab. Daher lassen sich nur mit der Einzelmolekülanalyse alle chemischen und biochemischen Reaktionen verstehen.

Die ersten In-singulo-Untersuchungen wurden vor etwa zwanzig Jahren durchgeführt.^[2] Seitdem haben Anwendungen dieser Verfahren auf eine immer größere Zahl von Problemen geradezu explosionsartig zugenommen. Bei der In-singulo-Analyse wird nicht nur die Mittelung über eine große Zahl von Molekülen vermieden, sondern es ist auch möglich, die Trajektorien der einzelnen Moleküle in Echtzeit zu verfolgen, während sie ihre Reaktionen durchlaufen. Die Experimente lieferten Informationen über kinetische Vorgänge^[3] und waren erfolgreich bei Anwendungen wie Genexpressions-Profilierung,^[4] Nachweis von Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNP),^[5] Strukturvorhersage von biologischen

Aus dem Inhalt

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Einleitung | 899 |
| 2. Markierungsfreie biomolekulare Erkennung auf Einzelmolekülebene | 901 |
| 3. Konformationsanalyse | 903 |
| 3. 1. Humane Telomer-G-Quadruplexe | 903 |
| 4. Chemische Reaktionen | 905 |
| 5. Enzymreaktionen | 908 |
| 6. Einzelmolekül-Fluoreszenzuntersuchungen | 908 |
| 7. Ladungstransporter und DNA-Roboter | 911 |
| 8. Schlussfolgerungen und Ausblick | 913 |

Makromolekülen,^[6] Wirkstoff-Screening^[7] usw. Die meisten dieser Untersuchungen wurden mit piko- bis nanomolaren Fluorophorkonzentrationen durchgeführt, um so die individuellen Moleküle in Lösung voneinander zu isolieren. Viele Enzyme arbeiten allerdings bei viel höheren Ligandenkonzentrationen, und ihre Michaelis-Konstanten liegen oft im mikro- bis millimolaren Bereich.^[8] Später wurden Methoden für die Einzelmolekülanalyse bei hoher Fluorophorkonzentration und für die Anwendung dieser Analyse auf Enzymuntersuchungen entwickelt.^[9]

Schnelle Fortschritte in der Nanobiotechnologie und bei der Konstruktion von Lab-on-a-Chip-Systemen für kostengünstige analytische Hochdurchsatz-Verfahren für die Biochemie verliefen parallel zur Entwicklung von analytischen Einzelmolekültechniken. Auf dem Feld der DNA-Nano-

[*] Dr. A. Rajendran, Prof. Dr. H. Sugiyama
Department of Chemistry, Graduate School of Science,
Kyoto University
Sakyo-ku, Kyoto 606-8502 (Japan)
Fax: (+81) 75-753-3670
E-Mail: hs@kuchem.kyoto-u.ac.jp
Homepage: <http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/chembio>
Dr. A. Rajendran, Dr. M. Endo, Prof. Dr. H. Sugiyama
CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)
Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075 (Japan)
Dr. M. Endo, Prof. Dr. H. Sugiyama
Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS),
Kyoto University
Yoshida-ushinomiya-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501 (Japan)
E-Mail: endo@kuchem.kyoto-u.ac.jp

technologie wurde die Pionierarbeit von Seeman geleistet, der die theoretische Grundlage für den Einsatz von DNA als nanoskaligem Baumaterial legte.^[10] Danach wurde DNA zu zunehmend komplexeren Formen und Gittern verarbeitet. In-singulo-Techniken fanden seit ihrer Einführung vor allem in der strukturellen DNA-Nanotechnologie große Beachtung. Die DNA-Motive, die hier konstruiert wurden, lagen in einem Größenbereich von 10 bis 20 nm, was für viele praktische Zwecke nicht ausreicht;^[11] allerdings standen zur Konstruktion ausgedehnter Komplexe mit definierter Größe nur wenige Strategien zur Verfügung. Darüber hinaus muss das System für spezifische enzymatische Reaktionen innerhalb einer etwas größeren Nanoumgebung fixiert werden, damit die ausgewählte Reaktion in singulo verfolgt werden kann.^[12] Beispielsweise krümmt das DNA methylierende Enzym *EcoRI*-Methyltransferase (*M.EcoRI*) die DNA-Doppelhelix während der Reaktion um 55–59°.^[13] Dadurch läuft die Enzymreaktion an dem DNA-Strang ab, der während der Reaktion leichter gekrümmt werden kann, während ein Strang, der völlig starr ist, durch das Enzym weniger (oder gar nicht) modifiziert wird. Um eine solche Reaktion mithilfe der Nanotechnologie in Echtzeit beobachten zu können, sollte die relevante Sequenz über ein DNA-Motiv fixiert werden und dabei einen gewissen Bewegungsspielraum behalten (sodass der Strang während der Reaktion gekrümmt werden kann). Gleichzeitig sollte ein Kontrollstrang mit nahezu identischer Sequenz mit einer gewissen Spannung (die keine Krümmung zulässt) fixiert werden. Eine solche Anordnung kann für die selektive Methylierung von DNA-Strängen verwendet werden. Entsprechend ist die definierte Anordnung von Molekülen auf einer Gerüststruktur auf einer größeren Fläche mit definierten Abständen dazwischen (wie ein molekulares Lochraster) ein zentraler Gegenstand der strukturellen DNA-Nanotechnologie.

2006 entwickelte Rothemund^[14] eine vielseitige und einfache Methode der Selbstorganisation, genannt „scaffolded DNA origami“ („gerüstgebundenes DNA-Origami“), für die Herstellung definierter größerer zweidimensionaler Anordnungen fast beliebiger Form mit einem Durchmesser von ca. 100 nm. Mit dieser Technik hybridisiert man ein einzelsträngiges Virengenom (M13mp18), das als Gerüst fungiert, mit Hunderten vorgeformter kurzer Oligomere („Stapel“) über

Paarung zwischen komplementären Basen, sodass zwischen benachbarten Helices viele verzweigte Kontaktstellen entstehen (Abbildung 1). Eine Eintopf-Synthese im nanomolaren Maßstab liefert $>10^{14}$ Origami-Kacheln in fast 100 %

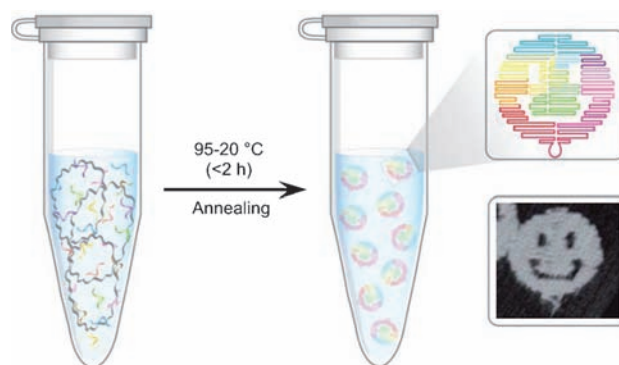


Abbildung 1. Herstellung einer Smiley-förmigen Origami-Struktur und ihr AFM-Bild. Die grauen und farbigen Bänder im linken Gefäß symbolisieren die M13mp18-Stränge und die gestapelten Stränge.

Ausbeute. Dieses Verfahren wurde für die Herstellung verschiedener zwei-^[15] und dreidimensionaler Anordnungen^[16] eingesetzt, außerdem für die Erzeugung nanoskaliger Muster aus Proteinen,^[17] Nanopartikeln^[18] und anderen funktionellen Elementen^[19] in genau definierter Weise. Die Strukturen können auch als Matrizen für das Wachstum von Nanodrähten fungieren, die Bestimmung der Proteinstruktur unterstützen und neue Plattformen für genomische Anwendungen zugänglich machen.^[20] Obwohl die Origami-Methode in der DNA-Nanotechnologie eingesetzt wurde, wurde die In-singulo-Analyse zuerst mit einem RNA-Hybridisierungstest durchgeführt^[21] (wenn wir die Herstellung von Nanomustern von funktionellen Molekülen^[17–19] unberücksichtigt lassen). Danach wurde die Methode für unterschiedliche Einzelmolekülanalysen von chemischen,^[22] photochemischen^[23] und biochemischen Reaktionen^[24] bis hin zur Bestimmung photophysikalischer Eigenschaften,^[25] der Erkennung von SNPs^[26] und Konformationsänderungen der DNA angewendet.^[27] Diese Arten der Analyse wären mit kurzen DNA-Motiven nicht möglich gewesen.



Arivazhagan Rajendran erhielt 2001 seinen Bachelordiplom in Chemie vom Government Arts College, Krishnagiri (Periyar University, Salem) und 2003 den M.Sc. von der University of Madras (Indien) mit einer Spezialisierung auf anorganische Chemie. Danach begann er seine Doktorarbeit in bioanalytischer Chemie bei N. Teramae an der Tohoku University (Japan). Nach der Promotion (2008) wechselte er als Postdoc zum Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER) der Konan University. Vor Kurzem nahm er eine Stelle am Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS) an der Kyoto University an.



Masayuki Endo studierte bei I. Saito an der Kyoto University und promovierte 1997 an der University of Tokyo (bei M. Komiyama). Er wechselte dann zur Tokyo Medical and Dental University als JSPS-Postdoc-Stipendiat unter Anleitung von H. Sugiyama. Anschließend setzte er seine Arbeit als Postdoc bei G. L. Verdine an der Harvard University fort (1998–2000). Nach einer Zeit bei S. Yokoyama am RIKEN-Institut war er Assistant Professor am Institute of Scientific and Industrial Research der University of Osaka (2001–2008). Während dieser Zeit forschte er 2005 bei N. C. Seeman an der New York University. Seit 2008 ist er Associate Professor bei H. Sugiyama am iCeMS der Kyoto University.

Die Einzelmolekülverfahren können grob in zwei Kategorien eingeteilt werden: 1) fluoreszenzgestützte Bildgebung und Spektroskopie und 2) kraftbasierte Techniken. Von den kraftbasierten Techniken ist es hauptsächlich die Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM), die für die In-singulo-Analysen in der Nanotechnologie Anwendung findet; sie kann aber bei allen Origami-Untersuchungen genutzt werden. Wenige Veröffentlichungen befassen sich mit fluoreszenzbasierten Techniken für diesen Zweck.^[28] In diesem Aufsatz konzentrieren wir uns auf die Einzelmolekülanalyse mit DNA-Origami als eine Methode, mit der – zusammen mit den verfügbaren unimolekularen Techniken – einzelne Moleküle isoliert und analysiert werden können.

2. Markierungsfreie biomolekulare Erkennung auf Einzelmolekülebene

Eine der wichtigsten Eigenheiten von DNA-Origami ist, dass jede Position auf der zweidimensionalen Oberfläche unterschiedliche Sequenzinformationen enthält. Damit kann eine Sequenz, die eine Funktionalität trägt, überall gezielt auf der zweidimensionalen Struktur positioniert werden. So lässt sich z. B. eine nanopartikelkonjugierte Sequenz an eine komplementäre Stelle des M13-Gerüsts hybridisieren und damit an der Oberfläche des Origami anbringen. Außerdem kann die Aufwölbung eines DNA-Einzelstranges einer spezifischen Sequenz auf dem Origami angebracht werden, die als Rezeptor für die komplementäre DNA- oder RNA-Sequenz fungiert. Im Prinzip kann jede Funktionalität mit DNA konjugiert und auf der Oberfläche des Origami positioniert werden, wo sie als Sonde für eine molekulare Erkennung dient. Auf diese Weise werden mit der Origami-Technik einzelne Moleküle isoliert, die anschließend mit einer In-singulo-Technik untersucht werden können. Um die Sonden senkrecht auf der Ebene auszurichten, sollten sie acht Basenpaare von einem Kreuzungspunkt entfernt sein. Dies definiert eine räumliche Auflösung von etwa 6 nm zwischen zwei Sonden und macht beliebige zwei- oder mehrteilige Systeme, die isoliert und mit einem bestimmten Abstand zwischen den Komponenten platziert werden können, geeignet für die Analyse aller entfernungsabhängigen Eigenschaften. Außerdem werden hundert Billionen Sondenka-

cheln in einem Schritt und innerhalb einer Stunde hergestellt, wodurch das Verfahren für die praktische Anwendung geeignet ist.

2.1. RNA-Hybridisierungstests

Die Untersuchung von Ke et al. aus dem Jahr 2008^[21] kann als erste Einzelmoleküluntersuchung von Biomolekülen angesehen werden, auch wenn bereits zuvor einzelne Moleküle oder Partikel auf einer Origami-Nanostruktur positioniert und nachfolgend mit Rasterkraftmikroskopie charakterisiert worden waren. Die Autoren entwickelten einen markierungsfreien RNA-Hybridisierungstest auf dem DNA-Origami, das ein molekulares Analogon der makroskopischen DNA-Chips ist. Einzelsträngige, 20 Nucleotide lange DNA-Segmente, die komplementär zur Ziel-RNA sind und als Sonden fungieren, wurden auf dem Origami immobilisiert (Abbildung 2 A). Die Erkennung/Hybridisierung fand am Einzelmolekül statt und wurde mit AFM sichtbar gemacht. Nach der Hybridisierung der Zielsequenz mit einem Paar von Sondenhälften bildete das DNA-RNA-Hybrid eine V-förmige Struktur (Abbildung 2 B), die leicht als heller Fleck auf dem AFM-Bild sichtbar gemacht werden kann.

Die Methode erfordert daher keine Markierung von Ziel- und/oder Sondensequenzen, und die Erkennung auf Einzelmolekülebene kann einfach sichtbar gemacht werden. Der Test wurde auf die gleichzeitige Erkennung mehrerer RNAs ausgeweitet, die einer Region von drei Genen entsprechen, nämlich *Rag-1*, *c-myc* und β -*Actin*, die in der Maus-B-Zell-vorläuferlinie exprimiert werden (Abbildung 2 C). Die Origami-Kacheln mit DNA-Sequenzen, die komplementär zu den oben erwähnten, mit Strichcode-Haarnadelmarkierungen indizierten RNA-Sequenzen sind, wurden gemischt; anschließend wurde die Bindung durchgeführt. Obwohl die verschiedenen Sondenkacheln gemischt waren, kam es zu einer spezifischen Bindung, wie anhand der Strichcode-Markierungen nachgewiesen wurde. Die Effizienz der Methode für die Erkennung der Zielsequenzen wurde in Gegenwart einer großen Menge zellulärer RNA bestätigt, mit der keinerlei unspezifische Erkennung stattfand. Zwar kann dieser Ansatz nicht mit vorhandenen Techniken wie Mikroarrays^[29] und der Polymerasekettenreaktion mit reverser Transkriptase^[30] konkurrieren, mit denen Tausende von Sequenzen gleichzeitig analysiert werden können, allerdings lässt sich mit der hier vorgeschlagenen Methode auch sehr schwache Genexpression nachweisen, möglicherweise bis hinab zur Einzelzellebene. Dies wird durch den Befund gestützt, dass die DNA-Origami-Strukturen ihre Gestalt behalten, in ihrer Faltung gegen Nucleaseverdau resistent^[31] und im Zellysats stabil sind.^[32] Die Strukturen können deshalb auf Zellebene eingesetzt werden, wenn der Nachweis von Genexpression und Proteomanalyse in einzelnen Zellen verwirklicht werden soll. Es sind allerdings weitere Fortschritte notwendig, um dieses Ziel tatsächlich zu erreichen.



Hiroshi Sugiyama promovierte 1984 bei T. Matuura an der Universität Kyoto. Nach einer Zeit als Postdoc an der University of Virginia bei S. M. Hecht kehrte er 1986 als Assistant Professor an die Kyoto University zurück und wurde 1993 Associate Professor. 1996 nahm er eine Position am Institute of Biomaterials and Bioengineering an der Tokyo Medical and Dental University an. Professor für chemische Biologie wurde er schließlich 2003 an der Kyoto University. Unter den Ehrungen, die ihm zuteil wurden, waren unter anderem der Nippon IBM Award und der Preis der Chemical Society of Japan for Creative Work.

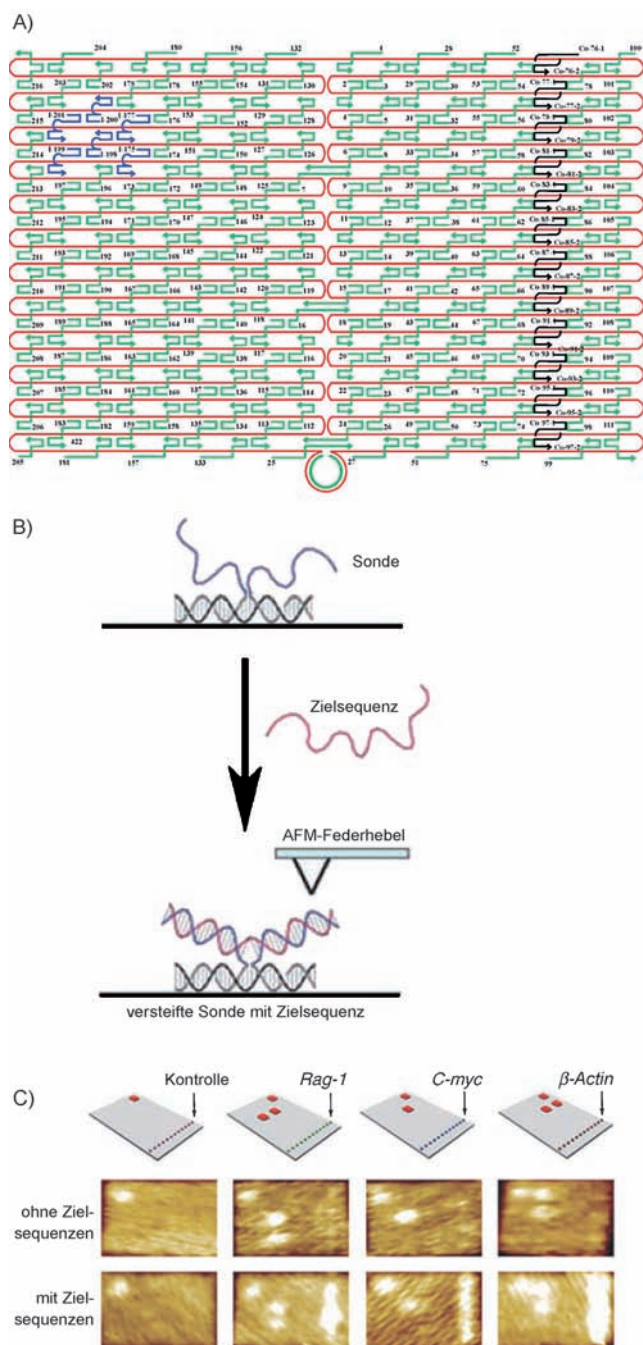


Abbildung 2. Erkennung der Ziel-RNA durch Hybridisierung mit DNA-Sondensträngen auf einer DNA-Origami-Struktur. A) Origami mit Sondensträngen rechts (schwarz) und Index-Haarnadelschleifen in der oberen linken Ecke (blau). Rote und grüne Linien entsprechen dem M13mp18-Gerüst bzw. den Stapelsträngen. B) Ein Paar benachbarter Hilfsstränge ragt aus der Origami-Oberfläche heraus, wobei jede der 20 Nucleotide großen Verlängerungen zu einer Hälfte der Ziel-RNA komplementär ist. Diese Ausstülpungen sind nicht im AFM-Bild sichtbar. Nach der Hybridisierung mit der Zielsequenz bildet sich jedoch eine V-förmige Verzweigung, die im AFM-Bild leicht als heller Fleck sichtbar ist. C) Topographische Darstellung der Strichcode-markierten Kacheln und die zugehörigen AFM-Bilder ohne und mit Zielsequenzen. Die spezifische Zielerkennung kann durch den entsprechenden Index nachgewiesen werden.

2.2. Entfernungabhängige Aptamer-Protein-Bindung

Der Vorteil der strukturellen Nanotechnologie besteht darin, viele Moleküle anordnen und dabei zugleich die Abstände zwischen ihnen kontrollieren zu können. Dies macht die Methode für entfernungsabhängige In-singulo-Analysen, z. B. für molekulare Erkennung, geeignet. Die Bedeutung der Origami-Methode für die Einzelmolekülanalyse wird am besten an der markierungsfreien Untersuchung der entfernungsabhängigen Aptamer-Protein-Bindung sichtbar.^[33] Wie in Abbildung 3 A veranschaulicht, wurde eine DNA-Origami-Kachel mit zwei verschiedenen proteinbindenden Aptameren (kurzen Oligonucleotidsequenzen) versehen, deren Abstand präzise eingestellt ist. Diese Aptamere binden an beinahe entgegengesetzte Stellen des Gerinnungsproteins Thrombin, einer Schlüsselkomponente der Blutgerinnung. Die Größe des Proteins beträgt ca. 4 nm, und aus der Änderung der gelelektrophoretischen Beweglichkeit ließ sich ableiten, dass es die Aptamere 5.3 nm voneinander entfernt bindet. Bei größeren oder kleineren Abständen konnte keine oder nur geringe Bindung beobachtet werden. Die Proteinerkennung auf der Origami-Oberfläche wurde mit AFM charakterisiert. Wie gewünscht band das Protein an Heteroaptamere, die in einer Entfernung von 5.8 nm voneinander immobilisiert waren, während keine Erkennung bei einer Entfernung von 20.7 nm

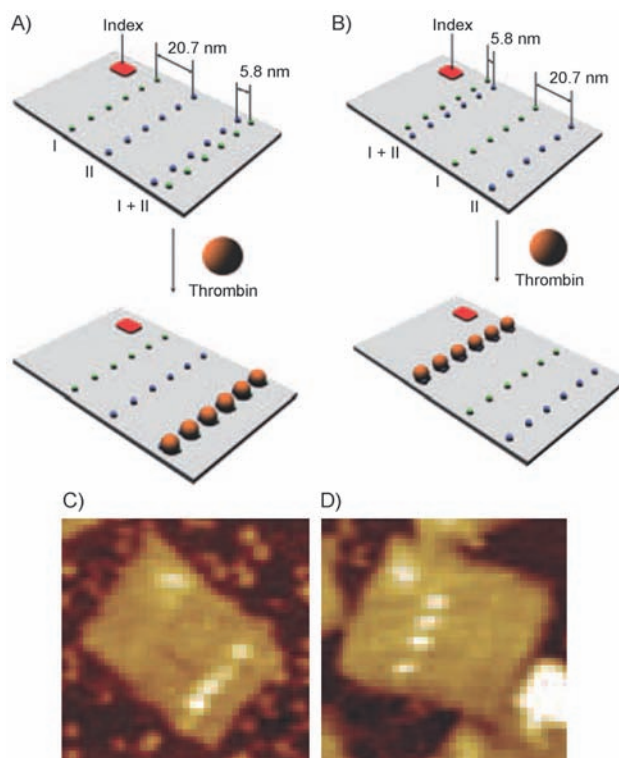


Abbildung 3. DNA-Origami-Kachel mit Index-Haarnadelschleife in der oberen linken Ecke und mit zwei Linien von Aptamer apt-I (grüne Punkte) und zwei Linien apt-II (blaue Punkte). Der Positionseffekt wurde mithilfe von zwei Schemata (A, B) untersucht, indem der Abstand der benachbarten Linien von apt-I und apt-II verändert wurde. Auch die Proteinerkennung in beiden Fällen ist gezeigt. Die AFM-Bilder zu (A) und (B) sind in (C) und (D) wiedergegeben. Jedes Bild entspricht einer Größe von $150 \times 150 \text{ nm}^2$.

beobachtet wurde (Abbildung 3C). Die Möglichkeit von Positionseffekten durch elektrostatische Abstoßung zwischen Protein und DNA-Gerüst wurde ausgeschlossen, wie man Abbildung 3B,D entnehmen kann. Die Origami-Methode bietet einen Vorteil gegenüber Volumenansätzen, weil bei diesen die Aptamere nicht in optimaler Entfernung fixiert werden können. Das Verfahren kann auch auf eine Reihe von bimolekularen Wechselwirkungen zwischen vielen Komponenten ausgedehnt werden, die dann auf Einzelmolekülebene sichtbar gemacht werden können.

2.3 Nachweis von Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNPs)

Eines der ersten Ziele bei der Gewinnung medizinischer und biologischer Informationen aus dem menschlichen Genom war die Untersuchung und Verwertung der Einzelbasen-Austauschvorgänge im DNA-Code.^[34] Diese sind die wichtigste Basis der phänotypischen Individualität und der genetischen Variation. Diese Variationen können Anfälligkeit für oder Schutz vor Krankheiten wie Krebs, Herzerkrankungen oder Diabetes anzeigen. Auch wenn man viele Möglichkeiten zum SNP-Nachweis kennt,^[35] so gibt es doch keine einzelne akzeptierte Methode der Wahl.

Subramanian et al.^[26] versuchten zu zeigen, dass man mit der DNA-Nanotechnologie SNPs in singulo nachweisen kann. Die Methode kombinierte die AFM-Technik mit den DNA-Origami-Gerüsten, um ein visuelles Messsignal direkt vom Ziehnucleotid in der Sondensequenz zu erzeugen. Das Origami war so entworfen, dass es eine graphische Repräsentation aller vier Buchstaben für die vier Nucleotide enthält (Abbildung 4A); außerdem verschwindet das Symbol des Testnucleotids nach Zugabe der passenden Sondensequenz. Der SNP-Nachweis beruht dabei auf einer kinetischen Methode unter Verzweigungswanderung, die auch erfolgreich bei einer In-multiplo-SNP-Analyse in Lösung eingesetzt wurde.^[36] Interessant an diesem System ist, dass es isotherm arbeitet, sodass die Verzweigung letztlich in eine bestimmte Richtung – von der ursprünglichen Anknüpfungsregion hin zum entgegengesetzten Ende – wandert. Außerdem ist ein photolabiler Linker in das System eingebaut, der bei Bestrahlung bricht. So wird die signalerzeugende Komponente im Anschluss an die Organisation der DNA glatt an das Origami gebunden, kann danach aber wieder durch den Sondenstrang freigesetzt werden. Eine Computeranalyse einer Serie von AFM-Bildern ergab ein Messsignal direkt vom Nucleotid in der Sonde (Abbildung 4B). Das System funktioniert auch mit Sondenpaaren, was einem heterozygot-diploiden Genom entspricht. Der kinetische Prozess des Strangaustauschs wird dabei durch die Immobilisierung des Systems auf dem Origami-Gerüst nicht gehemmt.

Auch die ganze Sequenz eines synthetischen Oligomers anstelle eines einzelnen Nucleotids kann mit der Origami-Methode erkannt werden.^[37] Die Erkennung einer einzelnen DNA-Sequenz mit AFM wurde demonstriert. Dazu wurde der Biotin-Streptavidin-Komplex als Kontrastverstärker für die Pixel verwendet. In diesem Fall wurde eine lineare anstelle einer V-förmigen Sonde eingesetzt, wodurch der Positionseffekt deutlich verringert wurde. Auch wenn in allen

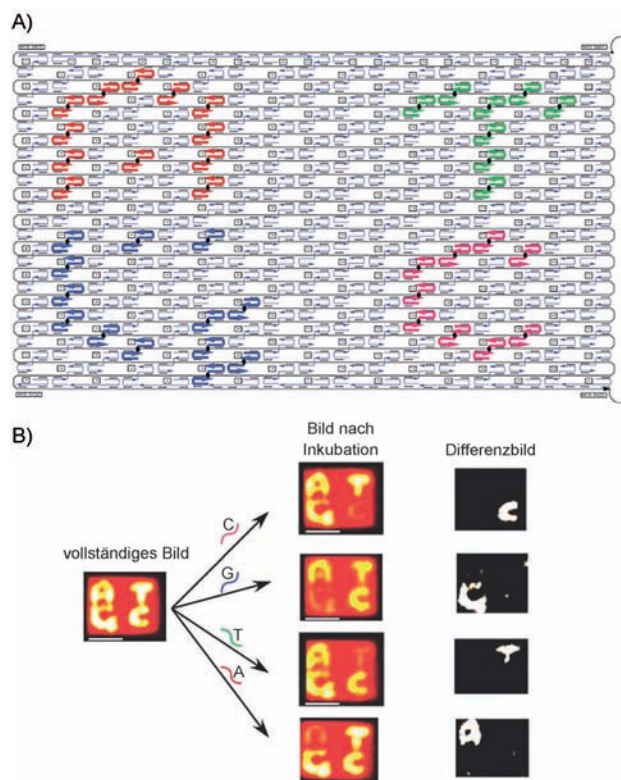


Abbildung 4. A) DNA-Origami-Kachel für SNP-Nachweise. Schwarze, hellblaue und dickere Linien entsprechen dem M13-Gerüst, den gestapelten Stränge bzw. den Strängen, die an der Darstellung der Buchstaben beteiligt sind. B) Wirkungsweise des SNP-Nachweissystems. Das vollständige Bild zeigt eine AFM-Aufnahme des Origami vor der Inkubation mit dem Analyten. Die vier Bilder nach Inkubation sind der Mittelwert aus 25 getrennten AFM-Aufnahmen; die Identität des entscheidenden Nucleotids im zugegebenen Strang ist über dem Pfeil angegeben. Maßstabsbalken 50 nm. Das Differenzbild zeigt die Identität des Nucleotids.

beschriebenen Fällen eine Serie von Sondensequenzen verwendet wurde, reicht im Prinzip eine einzige Sondensequenz für die molekulare In-singulo-Erkennung.

3. Konformationsanalyse

Die Methode kann auch auf die Konformationsanalyse von Biomolekülen übertragen werden. Konformationsänderungen in der DNA lebender Systeme sind eng mit der Regulation biologischer Funktionen wie der Genexpression verknüpft. Viele humane Sequenzen sind dazu in der Lage, andere Konformationen als die B-Helix einzunehmen. Gene mit solchen Sequenzen sind mit einem gesteigerten Risiko genetischer Instabilität verbunden und so mit humanen Erkrankungen assoziiert.^[38]

3.1 Humane Telomer-G-Quadruplexe

Unter den verschiedenen Konformationen der DNA ist die G-Quadruplexstruktur von besonderem Interesse, weil sie

oft in G-reichen repetitiven Sequenzen am Telomerende im menschlichen Genom vorkommt.^[39] Die G-Quadruplexelemente sind vielversprechende Zielstrukturen für die Krebstherapie, denn die Bildung solcher Strukturen hemmt die Telomeraseaktivität.^[40] Die Struktur humaner Telomer-G-Quadruplexe wird intensiv beforscht,^[41] ist aber noch immer unklar.

Wir entwickelten eine neue Methode mit einem Origami-Nanogerüst zur markierungsfreien direkten Beobachtung der Bildung einzelner G-Quadruplexstrukturen unter Bedingungen, die vorteilhaft für die Faltung zu einer viersträngigen Struktur sind, und solchen, die ihr Aufbrechen begünstigen.^[27] Wie in Abbildung 5 A gezeigt, wurde eine DNA-Origami-Gerüststruktur mit einer leeren rechteckigen Fläche im Inneren konstruiert, in der zwei Serien von Verbindungsstellen für die Hybridisierung mit interessierenden Duplex-DNAs eingeführt worden waren. Jede Duplex-DNA enthielt eine einzelsträngige G-reiche Aufwölbung mit drei G-Strecken im oberen und einer G-Strecke im unteren Strang. Ohne K^+ bilden die G-Strecken keine Quadruplexstruktur, und die Duplexstränge nehmen eine parallele Konformation ein. Die Zugabe von K^+ zwingt die Aufwölbungen dazu, die (3 + 1)-G-

Quadruplexstruktur zu bilden, was als X-Form der eingeführten Stränge sichtbar gemacht werden kann. Wie erwartet konnten wir auf Einzelmolekülebene die Konformationsänderung der G-Strecken von der einzelsträngigen zur G-Quadruplexstruktur und zurück verfolgen (Abbildung 5 B,C). Der Erfolg unserer Methode liegt nicht nur in der statischen Beobachtung der Veränderungen, sondern auch in der Möglichkeit, die Bewegungsabläufe von Bildung und Bruch einer einzelnen G-Quadruplexstruktur in Echtzeit während der Konformationsänderungen zu verfolgen. Diese Art der Analyse der Bildung einer (3 + 1)-G-Quadruplexstruktur in Gegenwart von K^+ wird in Abbildung 5 D veranschaulicht. Die Stränge sind zunächst parallel angeordnet und lagern sich nach einer gewissen Zeit in die X-Form um, ein deutlicher Hinweis auf die Bildung einer viersträngigen Struktur. Die Sequenzabhängigkeit der X-Form wurde mit einer Reihe von Sequenzen untersucht. Die Methode lässt sich auf verschiedene Konformationsänderungen von Nucleinsäuren übertragen.

3.2. Die sekundäre DNA-Bindungsstelle in der humanen Topoisomerase I

Die humane Topoisomerase I (hTopoIB) ist ein typisches Beispiel für die nucleäre Form einer eukaryotischen Typ-IB-Topoisomerase. Es handelt sich um ein Monomer von 91 kDa, das den topologischen Zustand der DNA während der Transkription kontrolliert und verändert. Das Enzym katalysiert den vorübergehenden Bruch und die Religation einzelsträngiger DNA, durch die die Stränge aneinander vorbeigeführt werden können und dabei die Topologie der DNA verändern. Man vermutet, dass hTopoIB jeweils nur eine Stelle der DNA-Helix zur selben Zeit bindet. Kürzlich wurde jedoch die Vermutung geäußert, es gebe eine sekundäre DNA-Bindedomäne im Enzym, die die parallele Wechselwirkung mit zwei DNA-Stellen ermöglicht.^[42] Es gibt möglicherweise zwei Typen sekundärer Wechselwirkung zwischen hTopoIB und DNA: 1) gleichzeitige Bindung einer TopoIB an zwei DNA-Helices (Wechselwirkungsmodus T_1) und 2) Bindung zwischen zwei Spaltungskomplexen von TopoIB-DNA (Wechselwirkungsmodus T_2). Der direkte Nachweis einer sekundären Bindungsstelle bei nucleären Topoisomerasen vom Typ IB ist allerdings noch nie versucht worden.

Subramani et al.^[43] versuchten, die sekundären DNA-Bindestellen in der Topoisomerase I mit der DNA-Origami-Methode aufzuklären. Die Strategie ist in Abbildung 6 A dargestellt. Ein rechtwinkliges DNA-Origami mit einer DNA-Vorwölbung als Andockstelle an einer ausgewählten Position wurde hergestellt, indem einer der gestapelten Stränge um 21 Nucleotide erweitert und anschließend an dieser Stelle mit einer komplementären Sequenz hybridisiert wurde. Die oben beschriebenen sekundären Wechselwirkungen wurden untersucht, indem entweder der TopoIB-DNA-Komplex (T_1 -Modus) oder nacheinander TopoIB und Spaltungskomplex (T_2 -Modus) zu dem Origami mit der Fänger-DNA zugegeben wurden, das auf einer Glimmeroberfläche immobilisiert war. Der Bindevorgang wurde mit AFM verfolgt.

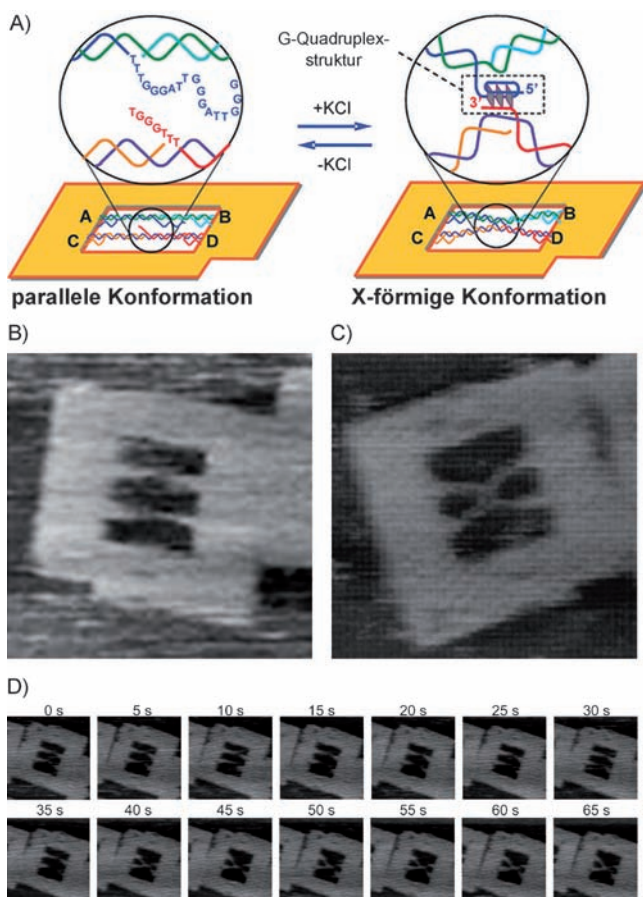


Abbildung 5. A) DNA-Rahmen mit G-Strängen, die in Abwesenheit von K^+ eine parallele, in Gegenwart von K^+ eine X-förmige Konformation einnehmen. Die zugehörigen AFM-Bilder sind unter (B) und (C) gezeigt. D) Momentaufnahmen der Hochgeschwindigkeits-AFM der G-Quadruplexbildung. Die Bilder sind 170×170 (B und C) und $160 \times 160 \text{ nm}^2$ (D) groß.

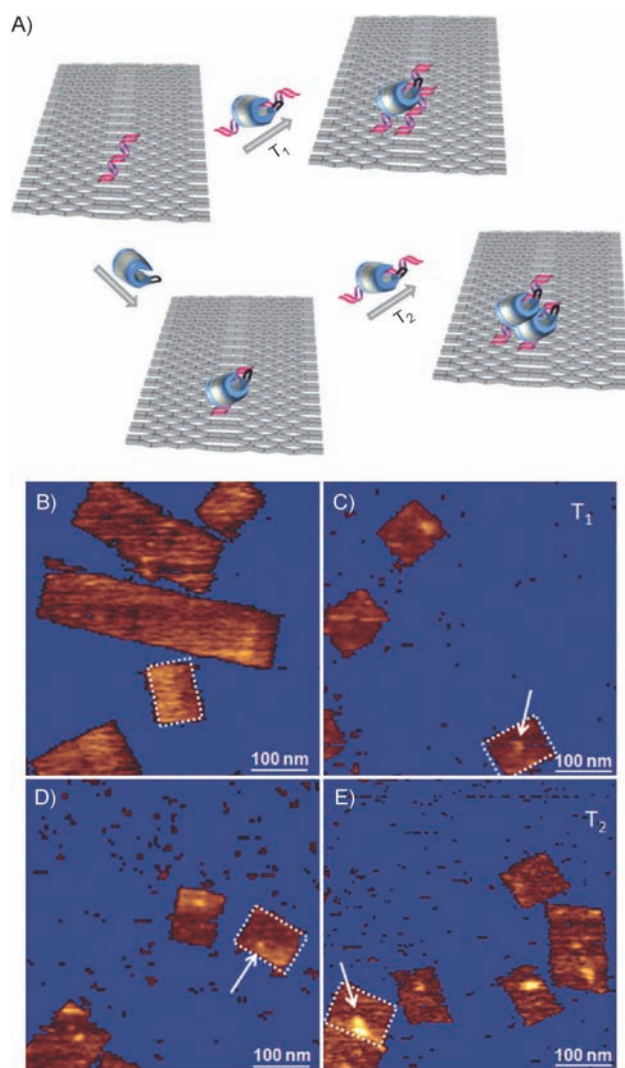


Abbildung 6. A) Experimenteller Aufbau zur Untersuchung der Wechselwirkungen der Fänger-DNA auf dem Origami mit dem hTopoIB-DNA-Spaltungskomplex (T₁-Wechselwirkungsmodus, oben) und der schrittweisen Wechselwirkung zwischen zwei Spaltungskomplexen (T₂-Wechselwirkungsmodus, unten). AFM-Bilder des DNA-Origami mit Fänger-DNA (B), nach Inkubation mit dem Spaltungskomplex (C), inkubiert mit hTopoIB (erster Schritt des T₂-Modus, D) und nachfolgender Zugabe des Spaltungskomplexes (zweiter Schritt des T₂-Modus, E).

Wie man in Abbildung 6B sieht, ist die hervortretende Fänger-DNA wegen der Flexibilität der Doppelstrang-DNA im AFM-Bild nicht sichtbar. Dagegen wird nach Zugabe des gereinigten Spaltungskomplexes ein hellerer Fleck auf dem Origami an der Stelle sichtbar, an der sich die Fänger-DNA befand (Abbildung 6C, Pfeil). Dieser Fleck entsteht durch die Wechselwirkung zwischen der Fänger-DNA und dem Spaltungskomplex, was auf eine sekundäre T₁-Wechselwirkung schließen lässt. Ähnlich entsteht bei Behandlung des Origami mit TopoIB ein hellerer Fleck (Abbildung 6D, Pfeil), der auf eine Wechselwirkung zwischen Fänger-DNA und TopoIB hinweist. Der Fleck wurde auf die nachfolgende Zugabe des Spaltungskomplexes hin viel heller (Abbildung 6E, Pfeil), ein deutliches Indiz für einen T₂-Wechselwirkungsmodus. Die Befunde sprechen stark für das Vor-

handensein einer sekundären DNA-Bindestelle. Eine solche Bindestelle verleiht dem Enzym möglicherweise das Potenzial, ein DNA-Crossover zu erkennen, das dadurch als topologischer Sensor fungieren kann, um die Aktivität von hTopoIB auf eine plektonemisch superspiralisierte DNA zu lenken.

4. Chemische Reaktionen

Biomoleküle wie Nucleinsäuren und Proteine sind relativ groß und können daher leicht mit AFM sichtbar gemacht werden. Demgegenüber sind Komponenten von chemischen Reaktionen zu klein für einen solchen Nachweis. Dessen ungeachtet wurde eine überzeugende Demonstration der Vorteile von Origami für eine Einzelmolekülanalyse chemischer Reaktionen vor Kurzem von Voigt et al.^[22] vorgelegt. Die Autoren nutzten Origami-Strukturen als adressierbare Unterlage, um Spaltung und Bildung einzelner chemischer Bindungen auszulösen und sichtbar zu machen.

4.1. Bindungsspaltungen

Rechtwinklige Origami mit biotinylierten Stapelsträngen an zwölf Positionen wurden hergestellt, um darauf Bindungsspaltungen zu untersuchen. Bei Zugabe von Streptavidin bildeten sich starke Komplexe mit Biotin, die als Messsignal für die chemische Reaktion wirkten. Drei Linker-Typen wurden in diese biotinylierten, gestapelten Stränge eingebaut: nichtspaltbare Linker (Typ A, als Kontrolle), Linker mit einer Disulfideinheit (Typ B, können durch eine Reduktion gespalten werden) und Linker mit einer elektronenreichen 1,2-Bis(alkylthio)ethyleneinheit (Typ C, können durch Singulett-Sauerstoff gespalten werden). Eine effiziente Spaltung der Linker B und C gelang mit 1,4-Dithiothreitol bzw. mit Singulett-Sauerstoff, der mit dem Photosensibilisator Eosin gebildet wurde (Abbildung 7A). Diese Reaktionen wurden mit AFM auf Einzelmolekülebene verfolgt, indem das selektive Verschwinden von Streptavidin von der Oberfläche des Origami registriert wurde.

4.2. Bindungsknüpfung

Die In-singulo-Erkennung einer Bindungsknüpfung ist eine noch schwierigere Aufgabe, weil die Position des Anheftungspunktes oft bis zum Ablauf der Reaktion unbekannt bleibt. Die DNA-Origami-Methode bietet allerdings eine geeignete Plattform zur Lösung dieses Problems, denn die genaue Position der reagierenden funktionellen Gruppe kann auf der Origami-Matrize vorbestimmt werden. Eine der reagierenden Gruppen kann auf der Oberfläche des Origami positioniert werden, und die eintretende Gruppe kann mit Biotin markiert werden. Der Einbau der funktionellen Gruppe oder die Bildung der chemischen Bindung kann durch Zugabe von Streptavidin sichtbar gemacht werden. Die Reaktionen von drei funktionellen Gruppen (Dreifachbindungen sowie Amino- und Azidogruppen) wurden unter-

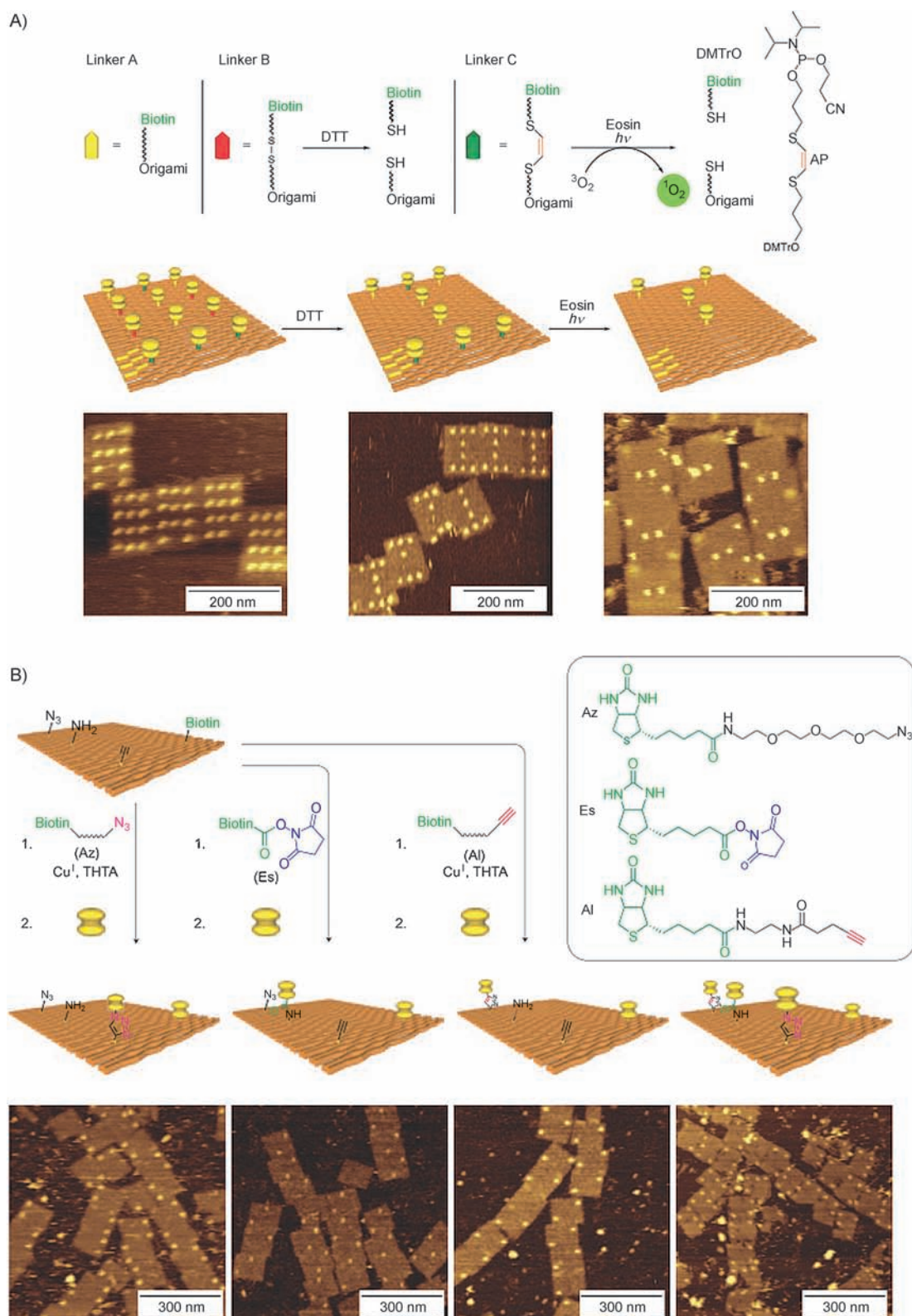


Abbildung 7. Chemische Einzelmolekülreaktionen auf der Origami-Oberfläche: A) Demonstration der In-singulo-Analyse der Spaltung chemischer Bindungen. Die selektive Bindungsspaltung wurde durch AFM nachgewiesen, nachdem die hellen Flecke, die durch den Streptavidin-Biotin-Komplex verursacht wurden, selektiv verschwunden waren. AP = Alkenphosphoramidit, DMTr = 4,4-Dimethoxytrityl, DTT = 1,4-Dithiothreitol. B) In-singulo-Analyse der Knüpfung einer chemischen Bindung. Eintretende Gruppen wurden an Biotin gekuppelt, und die Bindungsknüpfung wurde mit AFM-Bildgebung nach Zugabe von Streptavidin sichtbar gemacht. Al = Alkin, Az = Azid, Es = N-Hydroxysuccinimid-aktivierter Ester, THTA = Tris(1-[3-hydroxypropyl]triazolyl-4-methyl)amin.

sucht. Diese Gruppen werden gewöhnlich für Biokonjugationen eingesetzt. Ein Alkin kann mit einem Azid in einer Huisgen-Meldal-Sharpless-Azid-Alkin-Klickreaktion^[44,45] zu einem Triazol reagieren und umgekehrt. Ein Amin kann mit einem *N*-Hydroxysuccinimid-aktivierten Ester zu einem Amid reagieren. Diese Reaktionen laufen nacheinander auf der immobilisierten Origami-Plattform mit hoher Chemoselektivität ab (Abbildung 7B). Damit wurde eine hochselektive Art von „chemischer Einzelmolekülsynthese“ eingeführt. Außerdem könnte man mit dieser Methode eine Reihe chemischer Reaktionen und Prozesse untersuchen.

4.3. Photochemische Reaktionen

Die photochemische Reaktion, also die Bindungsspaltung durch Singulett-Sauerstoff, hergestellt durch Photosensibilisierung, wurde im vorherigen Abschnitt beschrieben. In diesem Fall wurde der Singulett-Sauerstoff in der Vorratslösung gebildet und zur Bindungsspaltung auf der Oberfläche des Origami genutzt. Die Produktion von Singulett-Sauerstoff auf der Einzelmolekülebene und sein Verhalten auf der Origami-Matrize sind sehr interessant. Eine solche Art von Untersuchung wurde jüngst veröffentlicht.^[23] Ein einzelner Indium-Pyropheophorbid-Singulett-Photosensibilisator (IPS) wurde mit einem Stapelstrang in der Mitte der Origami-Kachel konjugiert. Um das Verhalten des Singulett-Sauerstoffs zu verfolgen, wurden biotinylierte Oligonucleotide, die einen durch Singulett-Sauerstoff spaltbaren Linker enthielten, an beiden Seiten des Stranges mit dem Photosensibilisator angebracht (Abbildung 8A). Außerdem wurde ein biotinylierter Kontrollstrang in einer Ecke angeknüpft. Ähnlich wie beim vorherigen Beispiel wurde auch hier ein Biotin-Streptavidin-Komplex als Messsignal für die Reaktion registriert. Die Produktion des Singulett-Sauerstoffs durch einen einzelnen Photosensibilisator und seine Diffusion auf der Oberfläche des Origami wurden mit AFM verfolgt (Abbildung 8B).

4.4. Azid-Alkin-Klickreaktion an modifizierten Dendrimern

Zusätzlich zu den oben erwähnten Reaktionen wurde eine durch eine DNA-Matrize gesteuerte kovalente Kupplung von alkin- und azidmodifizierten Dendrimern auf einem DNA-Origami demonstriert.^[46] Polyamidoamin-Bernsteinsäureamid-Dendrimere der vierten Generation (G4-COOH), deren Oberflächen mit Aziden oder Alkinen funktionalisiert und mit einem spezifischen DNA-Strang konjugiert waren, wurden für eine Azid-Alkin-Klickreaktion eingesetzt. Die Dendrimere hatten 64 Carboxygruppen an der Oberfläche und einen Durchmesser von etwa 5 nm. Zunächst wurden die 64 Carboxygruppen modifiziert, wobei entweder nur Azide (G4-Azid) oder nur Alkine (G4-Alkin) gebildet wurden. Die 1:1-DNA-Dendrimerkonjugate wurden hergestellt, indem eines von zwei unterschiedlichen, 20 Nucleotide langen, einzelsträngigen DNA-Fragmenten über eine Klickreaktion mit einer der 64 Oberflächengruppen verknüpft wurde. Die restlichen 63 Oberflächengruppen auf diesen Konjugaten stan-

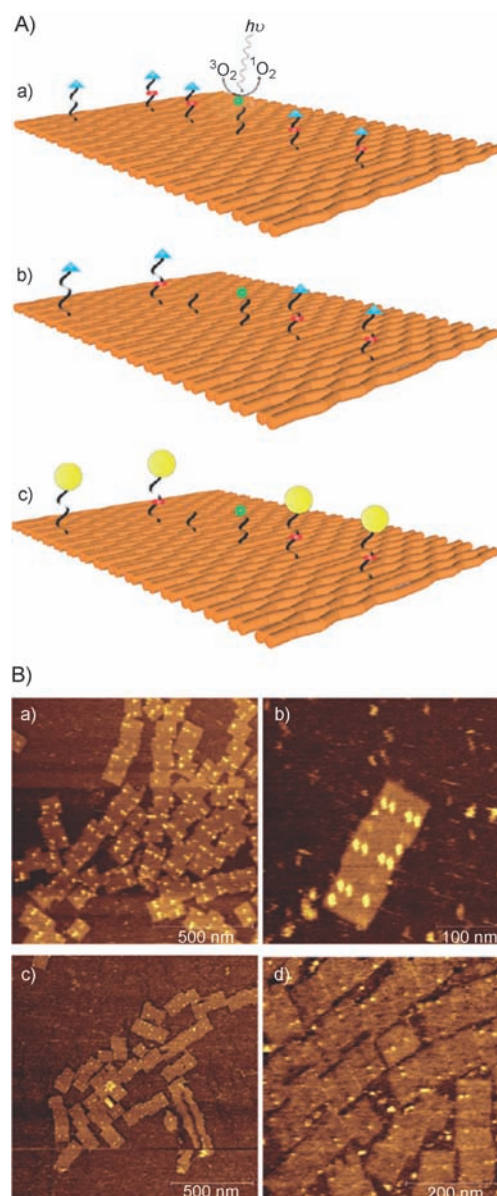


Abbildung 8. A) Molekulares System; a) Origami während der Bestrahlung, b) Singulett-Sauerstoffreaktion am Nachbarstrang und c) Origami nach Bestrahlung und der Zugabe von Streptavidin. B) AFM-Aufnahmen des Systems; a) Origami-Strukturen vor der Bestrahlung, b) vergrößertes Bild ohne Bestrahlung, c) nach Bestrahlung und d) nach Bestrahlung mit von außen zugegebenem IPS.

den als Azid- oder Alkingruppen für weitere Kupplungen auf dem DNA-Origami zur Verfügung. DNA-G4-Konjugate mit Biotingruppen auf der G4-Oberfläche wurden für die Messung mit AFM synthetisiert. Dazu wurde ein rechtwinkliges Origami hergestellt, das aus 10 gestapelten Strängen mit zwei unterschiedlichen, 20 Nucleotide langen, einzelsträngigen DNA-Überhängen bestand, die rund um das Zentrum des Origami ein ringförmiges Muster bildeten. Die Überhänge hybridisierten wechselweise mit den beiden Arten von DNA-G4-Konjugaten (Abbildung 9A). Ein AFM-Bild dieser Origami-Struktur zeigt deutlich den Ring in der Mitte (Abbildung 9B, links). Die anschließende Bindung von Streptavidin

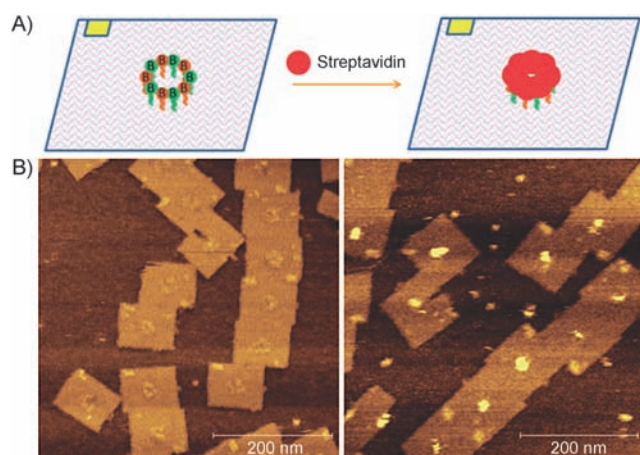


Abbildung 9. Hybridisierung von biotinmarkierten DNA-G4-Konjugaten auf einer DNA-Origami-Matrize und Bindung von Streptavidin. A) Die Designstrategie. B) AFM-Aufnahme des Origami mit biotinmodifizierten Dendrimern vor (links) und nach Bindung von Streptavidin (rechts).

an den Dendrimerring auf dem immobilisierten Origami wurde mit AFM abgebildet (Abbildung 9B, rechts), wobei gleichzeitig eine starke Höhenzunahme (ca. 4 nm) registriert wurde – ein überzeugendes Indiz für die Gegenwart von Dendrimern auf der Oberfläche des Origami. Auch die kovalente Kupplung der alternierenden Azid- und Alkin-G4-Dendrimere mit der Oberfläche des Origami über die Klickreaktion wurde versucht, und ein ungefährer Hinweis auf die Kupplung wurde durch Gelelektrophorese erhalten.

5. Enzymreaktionen

Enzyme binden zuerst an eine unspezifische Stelle der DNA, diffundieren anschließend auf der Suche nach spezifischen Sequenzen am Strang entlang und reagieren schließlich oder modifizieren die entsprechenden Stellen.^[47] Eine direkte Beobachtung dieser dynamischen Prozesse der Wechselwirkung von Enzymen mit der DNA könnte eines der wichtigsten Ziele der Untersuchung des mechanischen Verhaltens von Enzymen während der Reaktion sein. Für den Fortgang von Enzymreaktionen sind oft Strukturänderungen wie die Biegung doppelsträngiger DNA notwendig. Für eine selektive Enzymreaktion an einer bestimmten Sequenz muss man die Krümmung des DNA-Stranges steuern. Mit der DNA-Origami-Methode stellten wir ein vielseitiges Gerüst her, das doppelsträngige DNAs, wie in Abbildung 10A gezeigt, strukturell kontrollieren kann.^[12] Ein gespannter 64mer-Strang und ein entspannter 74mer-Strang wurden direkt in den Saum des M13-Gerüsts an den Stellen eingebaut, die mit I/II und III/IV bezeichnet sind. Die Aktivität des *M.EcoRI* modifizierenden Enzyms wurde untersucht. In Gegenwart von *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM) führt dieses Enzym eine Methylgruppe an der N6-Position des zweiten Adeninrestes der Sequenz GGAATC ein. Im Verlauf der DNA-Methylierung biegt *M.EcoRI* die Doppelhelix um 55–59° und dreht dabei den zweiten Adeninrest aus der Helix heraus.^[13] Der

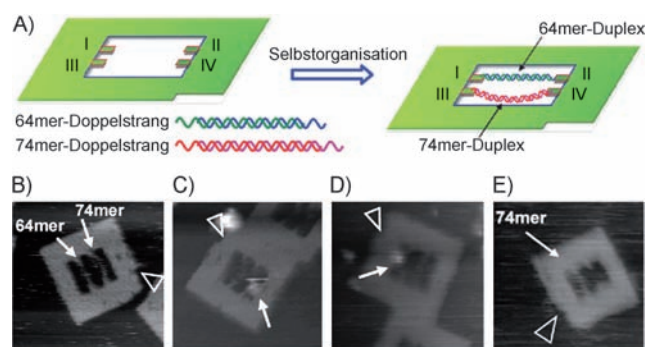


Abbildung 10. A) Origami-Gerüst und Einbau zweier verschiedener strukturell kontrollierter DNA-Stränge. AFM-Aufnahmen des Origami-Gerüsts mit zwei Duplexstrukturen (B), einem einzelnen *M.EcoRI*, das an die 64mer- (C) und 74mer-Stränge (D) bindet und des Reaktionsproduktes der anschließenden Enzymbehandlung (E). Das Restriktionsenzym spaltet selektiv den 64mer-Strang. Die Abbildungen sind 225 × 225 (B–D) und 250 × 250 nm² (E) groß.

entspannte Strang wird während der Bindung des Enzyms gekrümmt und stellt sich als besseres Substrat für die Enzymreaktion dar. Im Unterschied dazu wird der gespannte Strang weniger durch das Enzym verändert, denn er krümmt sich nicht so leicht während der Wechselwirkung mit dem Enzym. Außerdem kann der entspannte Strang nach der Methylierung nicht durch das Restriktionsenzym (*R.EcoRI*) gespalten werden, während der nichtmethylierte, gespannte Strang verdaut werden kann. Unsere AFM-Analyse mit hoher Abtastgeschwindigkeit, die nach aufeinanderfolgenden enzymatischen Behandlungen durchgeführt wurde, ergab, dass der 74mer-Strang, anders als der 64mer-DNA-Strang, nicht effektiv gespalten wurde. Offenbar wird durch die Strukturkontrolle das Substrat für die Methylierung definiert (Abbildung 10B–E). Eine Beobachtung der Enzymbindung an die aufgenommenen DNA-Stränge in Echtzeit gelang ebenfalls.

Weiterhin wurde die Reaktivität der Basen ausschneidenden Reparaturenzyme 8-Oxoguanin-Glycosylase (hOGG1) und T4-Pyrimidindimer-Glycosylase (PDG) mit einer ähnlichen Strategie für die Strukturkontrolle untersucht.^[24] Wir untersuchten für beide Reaktionen auch die Zwischenstufen, die durch Reduktion mit NaBH₄ eine kovalente Bindung mit dem Enzym eingehen. Diese markierungsfreie In-singulo-Analyse der enzymatischen Reaktionen und ihrer Zwischenstufen kann Einblicke in die biologischen Reaktionen geben, die auf Einzelmolekülebene in der Zelle ablaufen.

6. Einzelmolekül-Fluoreszenzuntersuchungen

Die Möglichkeit, Ereignisse in singulo mit DNA-Origami zu untersuchen, reicht über chemische und biochemische Reaktionen hinaus. In allen bisher diskutierten Fällen war das Moment der Materie (des Moleküls) mit bildgebenden Verfahren auf Einzelmolekülebene verfolgt worden. Im Falle der Bildung oder des Bruchs einer chemischen Bindung ging die

Bindung bzw. Ablösung beispielsweise mit der Verdrängung des Streptavidin-Biotin-Komplexes einher. Dies gilt sogar für die molekulare Erkennung, die durch Bewegung und Anheftung eines Nucleinsäurestrangs oder eines Proteins abgebildet wurde. Physikalische oder photophysikalische Phänomene gehen jedoch nicht mit einer solchen Bewegung von Materie oder einem Molekül einher. So wird bei einem Energieübertragungsprozess eben Energie vom Donor auf den Akzeptor übertragen und nicht ein Molekül. Solche physikalischen Prozesse in singulo zu verfolgen, ist ein sehr schwieriger, aber auch hoch interessanter Teil der Forschungsarbeiten an DNA-Origami.

6.1. Kontrollierte Energieübertragungswege

In einer aktuellen Untersuchung gelang Stein et al.^[25] die Kombination einer Reihe von Energieübertragungsschritten in einer drahtähnlichen photonischen Struktur mit einer Energieübertragungskaskade. Fluorophore, die einen Verlauf über alternative Energieübertragungswege in Abhängigkeit von einem zusätzlichen Übertragungsfarbstoff („jumper dye“) ermöglichen, wurden auf einer Origami-Oberfläche angeordnet (Abbildung 11 A). Ein Eingabefarbstoff (ATTO488), zwei Ausgabefarbstoffe (der rote Fluorophor ATTO647N und der IR-Fluorophor Alexa 750) und zwei Übertragungsfarbstoffe (ATTO565) wurden über drei Helices verteilt, um Fluorophorwechselwirkungen durch die DNA hindurch zu minimieren. Die Übertragungsfarbstoffe wurden zwischen dem Eingabefluorophor und den Ausgabe-fluorophoren angeordnet. Der Einzelmolekül-Vierfarb-FRET (FRET = resonanter Fluoreszenzenergietransfer) mit wechselnder Laseranregung wurde in dieser Untersuchung angewendet, weil er geeigneter schien als die kraftbasierten Methoden. Wie beabsichtigt wurden die Energieübertragungswege vom blauen zum roten oder vom blauen zum IR-Farbstoff auf Einzelmolekülebene durch die Übertragungsfarbstoffe kontrolliert, welche die Energie des angeregten Zustandes vom Eingangsfarbstoff auf einen der beiden Ausgabefarbstoffe weiterleiteten (Abbildung 11 B). Diese Befunde lassen darauf schließen, dass das DNA-Origami als Schalttafel für photonische Bauelemente unterhalb der Beugungsgrenze bis hinunter zur Molekülgröße dienen könnte.

6.2. Ein nanoskopisches Lineal für die In-singulo-Bildgebung

Moderne Entwicklungen der Fernfeld-Fluoreszenzmikroskopie unterhalb der Beugungsgrenze haben zur Herstellung von Strukturen mit Abmessungen unter 200 nm geführt, die einer optischen Analyse zugänglich sind.^[48] Um den Abstand zwischen den Fluoreszenzfarbstoffen exakt messen zu können, muss die optische Auflösung dieser supraauflösenden mikroskopischen Techniken geeicht werden. Inhomogene, filamentöse Strukturen wie Actinfilamente oder Mikrotubuli und kurze DNA-Duplex-Moleküle werden oft verwendet, um die optische Auflösung zu demonstrieren, haben aber Nachteile wegen ihrer nicht zu vernachlässigenden Flexibilität.^[49] Dies macht einen definierten Standard

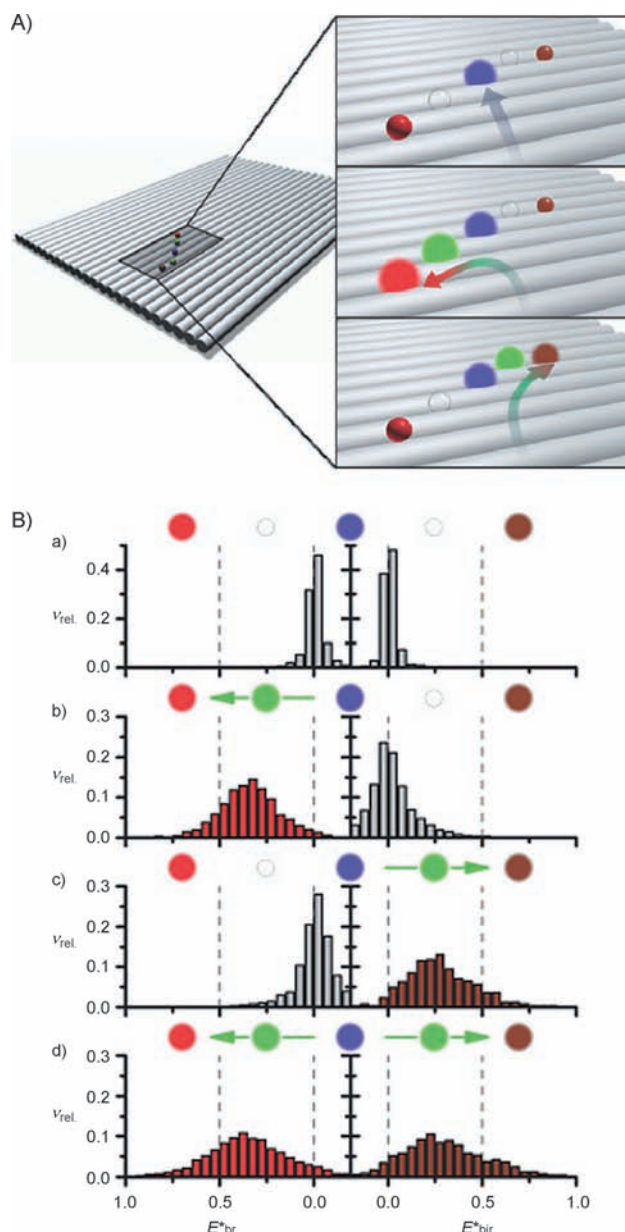


Abbildung 11. A) Anordnung von Fluorophoren auf einem DNA-Origami. B) Auf FRET bezogene Verhältnisse von Blau zu Rot, E^*_{br} , und von Blau zu IR, E^*_{bir} , für die vier verschiedenen Origami-Proben. Die blauen, grünen und roten Kreise stellen Eingabe-, Übertragungs- (jumper) bzw. Ausgabefluorophor dar. Weiße Kreise deuten auf das Fehlen des Übertragungsfluorophors hin.

erforderlich, der einfach und in festgelegter Orientierung auf der Oberfläche immobilisiert werden kann.

Das DNA-Origami bietet eine Nanostruktur mit den Eigenschaften präziser Positionierbarkeit, definierter Größe und einfacher Immobilisierung und kann in Einzelmolekülanalysen verwendet werden. Die genannten Eigenschaften machen aus den Origami-Strukturen ein nanoskopisches Lineal zur Kalibrierung supraauflösender Techniken, wie kürzlich gezeigt wurde.^[28a] Mit verschiedenen supraauflösenden Methoden wie der hochauflösenden Einzelmolekülbildgebung mit Photobleichung (SHRIMP), der Mikroskopie mit direkter stochastischer optischer Rekonstruktion (dSTORM)

oder der Blink-Mikroskopie wurde gezeigt, dass fluoreszenzmarkierte gestapelte Stränge, die an spezifische Positionen eines rechtwinkligen Origami gebunden sind, einen definierten Abstand haben. Cy5 oder ATTO655 wurden als Fluorophore an den farbstoffmodifizierten gestapelten Strängen am 5'-Ende fixiert. In Abbildung 12 A erkennt man diese farbstoffmodifizierten Stränge in der linken unteren und rechten oberen Ecke der Origami-Struktur mit einem Abstand von 89.5 nm zueinander platziert. Die immobilisierten Proben wurden mit Totalreflexions(TIRF)-Mikroskopie (TIRF = total internal reflection fluorescence) abgebildet. Die Emissionsmuster der beiden Fluorophore über-

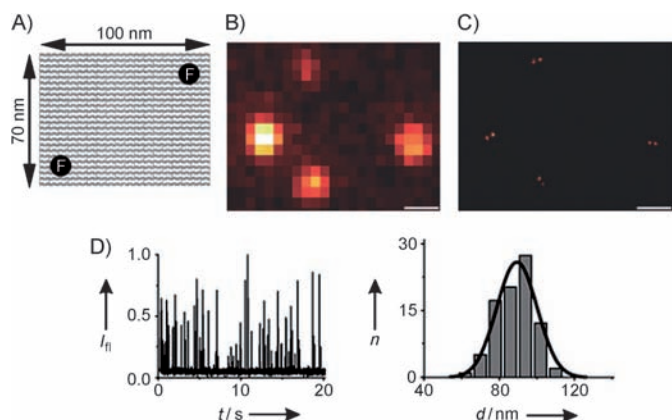


Abbildung 12. A) Origami-Kachel mit zwei fluoreszenzmarkierten gestapelten Strängen (F im schwarzen Kreis). B) TIRF-Aufnahme von Origami-Kacheln, die beide je zwei ATTO655-markierte gestapelte Stränge enthalten. C) Superaufgelöste Aufnahme der gleichen Stelle mit Blink-Mikroskopie. D) Links: Intensität gegen Zeit; rechts: statistische Verteilung des gemessenen Abstandes. Maßstabsbalken 500 nm.

lappten in dem beugungsbegrenzten Bild, wie mit TIRF-Mikroskopie nachgeprüft wurde (Abbildung 12 B). Mit der supraauflösenden Blink-Mikroskopie war die Identifizierung der Positionen der einzelnen Fluorophore dennoch möglich (Abbildung 12 C), und der gemessene Abstand zwischen den Farbstoffen war in guter Übereinstimmung mit der ursprünglichen Positionierung auf dem DNA-Origami (Abbildung 12 D). Dieses nanoskopische Origami-Lineal wurde auch für die Einzelmoleküldarstellung und die Kalibrierung anderer supraauflösender bildgebender Techniken wie SHRImp und dSTORM verwendet.

Neben dem zweidimensionalen Origami-Lineal wurde für die Einzelmolekül-FRET-Spektroskopieanalyse auch ein starres, dreidimensionales DNA-Origami-Lineal verwendet.^[50]

6.3. Kinetik von Bindungs- und Ablösungsereignissen

Hochgeschwindigkeits-AFM ist ein bildgebendes Verfahren, das 15 Bilder pro Sekunde aufnehmen kann. Es sind allerdings bessere Verfahren notwendig, um im Subsekundenbereich dynamische Prozesse zu verfolgen und Kinetiken zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde mit Fluoreszenzmikroskopie der dynamische Prozess der DNA-Bindung und -Dissoziation und seine Kinetik in singulo untersucht.^[28b] Als einfacher Aufbau für eine kinetische Analyse wurden eine lange, rechtwinklige, zweidimensionale Origami-Struktur mit einem grünen Farbstoff (ATTO532) in einer Ecke eingebaut und ein Strang zum Andocken in der Mitte positioniert (Abbildung 13 A). Die Zugabe eines mit rotem Farbstoff (ATTO655) markierten bildgebenden Strangs führte zur Bildung einer Duplexstruktur mit dem komplementären Andockstrang (Abbildung 13 B). Die Bildung der Duplexstruktur wurde verfolgt und die Kinetik der Bindungs- und Ablösungsereignisse bestimmt (Abbildung 13 C). Die Assoziationsgeschwindigkeit, die von der Konzentration des bildgebenden Strangs, nicht aber von der Duplexlänge abhängt, wurde zu $2.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (bei 600 mM NaCl) bestimmt, was vergleichbar mit den Befunden der Volumenmessung ist. Im Unterschied dazu war die Dissoziationsgeschwindigkeit unabhängig von der Konzentration, aber stark abhängig von der Länge der Duplexstruktur, die zwischen bildgebendem und Andockstrang gebildet worden war. Die Dissoziationsgeschwindigkeit wurde mit 1.6 und 0.2 s^{-1} für neun bzw. zehn Basenpaare abgeschätzt. Die Untersuchung verdeutlicht, dass zusätzlich zur statischen Analyse auch dynamische Prozesse im Subsekundenbereich in Echtzeit auf dem DNA-Origami untersucht werden können und dass die Ergebnisse mit den Ensemblemessungen vergleichbar sind.

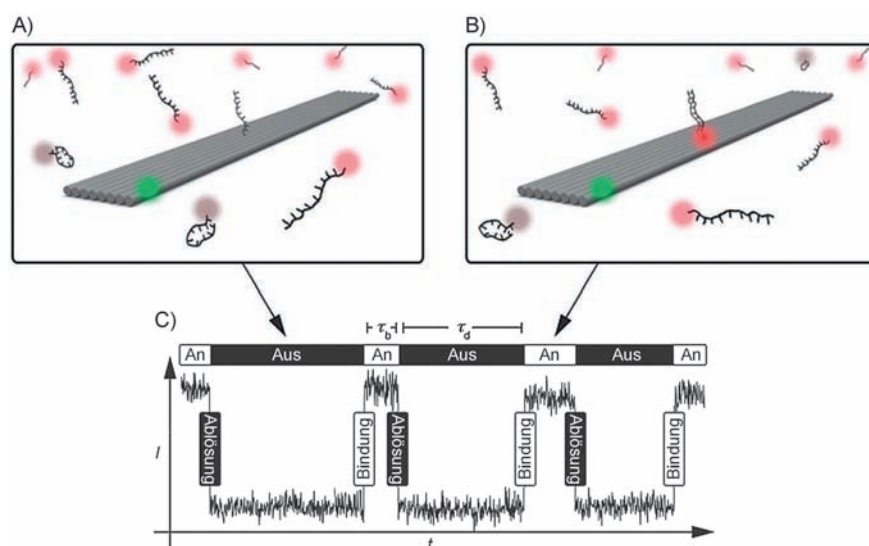


Abbildung 13. A) Aufbau einer Origami-Kachel mit einer grünen Farbstoffmarkierung in einer Ecke und einem Einzelstrang zum Andocken in der Mitte. B) Bindung eines mit rotem Farbstoff modifizierten, bildgebenden Strangs an den Andockstrang. C) Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit zur Verfolgung der Bindungs- und Ablösungsvorgänge.

7. Ladungstransporter und DNA-Roboter

Die Entwicklung funktioneller molekularer Systeme wäre unvollständig ohne die Erzeugung einer vollständig kontrollierbaren Bewegung eines molekularen Transportsystems.^[51] Ein typisches Transportsystem auf der Origami-Oberfläche besteht aus einer Schiene, einem Motor und Treibstoff, alles hergestellt aus DNA oder einer Kombination aus Biomakromolekülen. Zusätzlich zu diesen Bestandteilen kann man auch ein Kontrollsystem in Form vorprogrammierter Maschinen für den Transport der Fracht einbauen. Die Geschwindigkeit des Transporters lässt sich feinjustieren, indem man die Abstände zwischen benachbarten Schienen einstellt; alternativ kann man den Transport durch die Zugabe von Strängen, die zu den Schienen komplementär sind, auch völlig stilllegen. Wie bei einem Automobil kann man den Transporter so auslegen, dass er eine Abfolge von Aktionen autonom ausführt, wie Starten, Vorwärtsbewegen, Wenden und Anhalten; diese Aktionen können durch externe Stimuli, Hemmstoffe oder vorfunktionalisierte Bauelemente kontrolliert werden. Die DNA-Schienen auf dem Origami legen die Bewegungsrichtung des Transporters fest. Alle Positionsänderungen können mithilfe der Bindung an einem Haltepunkt und der Wanderung einer Verzweigungsstelle durchgeführt werden. Die thermodynamische Stabilisierungsenergie wirkt als Energiequelle für die mechanische Bewegung der DNA-Maschinen.

Gu et al.^[52] stellten einen molekularen Transporter mit drei Händen und vier Füßen her, die alle aus einzelsträngigen DNA-Segmenten bestehen (Abbildung 14A). Die Hände „ergreifen“ und tragen die Nanopartikel-Ladungen, die für die Aufnahme geeignet positioniert sind. Die Füße binden an die Einzelstränge der Origami-Oberfläche und ermöglichen eine schrittweise Bewegung. Zusätzlich zu den einzelsträngigen Schienen trägt das Origami drei molekulare Bauelemente, die je zwei Zustände einnehmen können („PX-JX₂-Strukturen“). Diese Strukturen können zwei benachbarte Enden der DNA-Duplexstruktur um 180° entweder in den PX- (paranemisches Crossover) oder den JX₂-Zustand (sein Topoisomer) drehen.^[53] Sie wirken als Kontrollelemente, die zunächst die Frachtpartikel festhalten und anschließend entscheiden, ob die Fracht auf den DNA-Läufer übertragen wird oder nicht. Die Bewegungen aller Elemente und des DNA-Läufers werden ausschließlich durch spezifische DNA-Stränge kontrolliert. Die Kontrollelemente, die verschiedenen große Goldnanopartikel tragen, können diese durch eine Rotationsbewegung auf den Läufer übertragen, wenn er sich in der Nähe befindet. Der Läufer bewegt sich in eine Richtung entlang der Schiene und nimmt mit einer Ausbeute von 43% drei verschiedene Frachten auf, die an drei unterschiedlichen Positionen gebunden sind (Abbildung 14B). Durch Veränderungen an den molekularen Schaltelementen kann man wahlweise acht Endprodukte erhalten.

In einer zeitgleich durchgeführten Untersuchung demonstrierten Lund et al.^[54] die Bewegung molekularer Roboter, die über eine vorgegebene Oberflächenform geführt werden. Der Roboter („Spinne“) enthält ein Streptavidinmolekül als inneren Körper, einen Fängerstrang und drei katalytische Beine (Abbildung 14C). Diese Beine wurden

vom 8-17-DNA-Enzym abgeleitet, das RNA-Basen hydrolysiert. Einzelsträngige DNA/RNA-Chimären wurden als Schienen in das DNA-Origami eingebaut. Diese Schienen wurden mit einer Reihenfolge von Punkten (a–e) so codiert, dass die Spinne auf einer abd-Landschaft bei a startet und über b zu d als Endpunkt gelangt. Die Punkte c und i entsprechen der Kontrollstelle bzw. dem topographischen Imaging-Marker. Die gestapelten Stränge an den verschiedenen Positionen der Schiene waren so modifiziert, dass sie Start, Vorwärtsbewegung, Wenden und Anhalten ermöglichten. Die DNA-Spinne wurde an der Startposition über einen Fängerstrang eingeführt und nachfolgend mit einem spezifischen DNA-Strang freigesetzt. Die Spinne wanderte entlang der vorgegebenen Schiene, indem sie mit den enzymatisch aktiven Beinen die chimären DNA/RNA-Stränge spaltete. Wenn die Spinne den Endpunkt erreichte, wurde ihre Bewegung durch den nichtspaltbaren DNA-Strang gestoppt. Die Bewegung der Spinne vom Start über einen Wendepunkt zum Endpunkt wurde in AFM-Bildern festgehalten (Abbildung 14D) und eindeutig in Echtzeit mit supraauflösender TIRF-Mikroskopie analysiert. Die Spinne bewegte sich auf dem DNA-Origami mit einer Geschwindigkeit von schätzungsweise 3 nm min⁻¹.

Wir entwickelten einen DNA-Transporter, der sich entlang einer vorgezeichneten Schiene auf einem DNA-Origami bewegen kann, und beobachteten eine vielstufige Bewegung auf dem Motorstrang.^[55] Eine Schiene aus 15 identischen Statoren (einzelnsträngigen DNAs), flankiert von speziellen Start- und Stoppstatoren, wurde auf einem rechtwinkligen Origami angebracht (Abbildung 14E). Die Statoren waren die 22 Nucleotide langen Sequenzen, die an die 5'-Enden der ausgewählten gestapelten Stränge angehängt waren. Der Motor war eine einzelsträngige DNA, die komplementär zum Stator war. Wenn der Motorstrang mit dem spezifischen Stator am Startpunkt hybridisierte, entfernte die Hydrolyse der Motor/Stator-Duplexstruktur durch das Nt.BbvCI-Restriktionsenzym die kurze einzelsträngige DNA vom Stator. Der Motorstrang band an den nächsten Stator durch Wanderung der Verzweigung und bewegte sich vorwärts. Der Vorgang wiederholte sich, bis der Motorstrang den Endpunkt erreicht hatte. Der Motorstrang wurde als einzelner Punkt auf der Motor/Stator-Duplexstruktur sichtbar gemacht. Die Position des Motorstranges vor Zugabe des Enzyms und nach ein, zwei und drei Stunden Inkubation wurde mit AFM bestimmt (Abbildung 14F). Die direkte Beobachtung der schrittweisen Bewegung des Motorstrangs war durch Hochgeschwindigkeits-AFM-Bildgebung ebenfalls möglich. Der Fleck bewegte sich an der Motorschiene entlang, wie durch AFM-Bilder, die alle fünf Sekunden aufgenommen wurden, sichtbar gemacht wurde, und die Schrittweite der Motorstrangbewegung entsprach der Entfernung zwischen benachbarten Statoren. Dies bestätigt, dass die Bewegung auf der Schiene in Einzelschritten abläuft.

Ein Vergleich mit proteinbasierten Läufern^[56] ergab, dass die oben beschriebenen Transporter nicht so schnell oder effizient waren. Als Kandidaten für molekulare Transporter oder Roboter bieten diese Systeme jedoch Programmierbarkeit und Richtungsspezifität und sind in hohem Maß kontrollierbar.

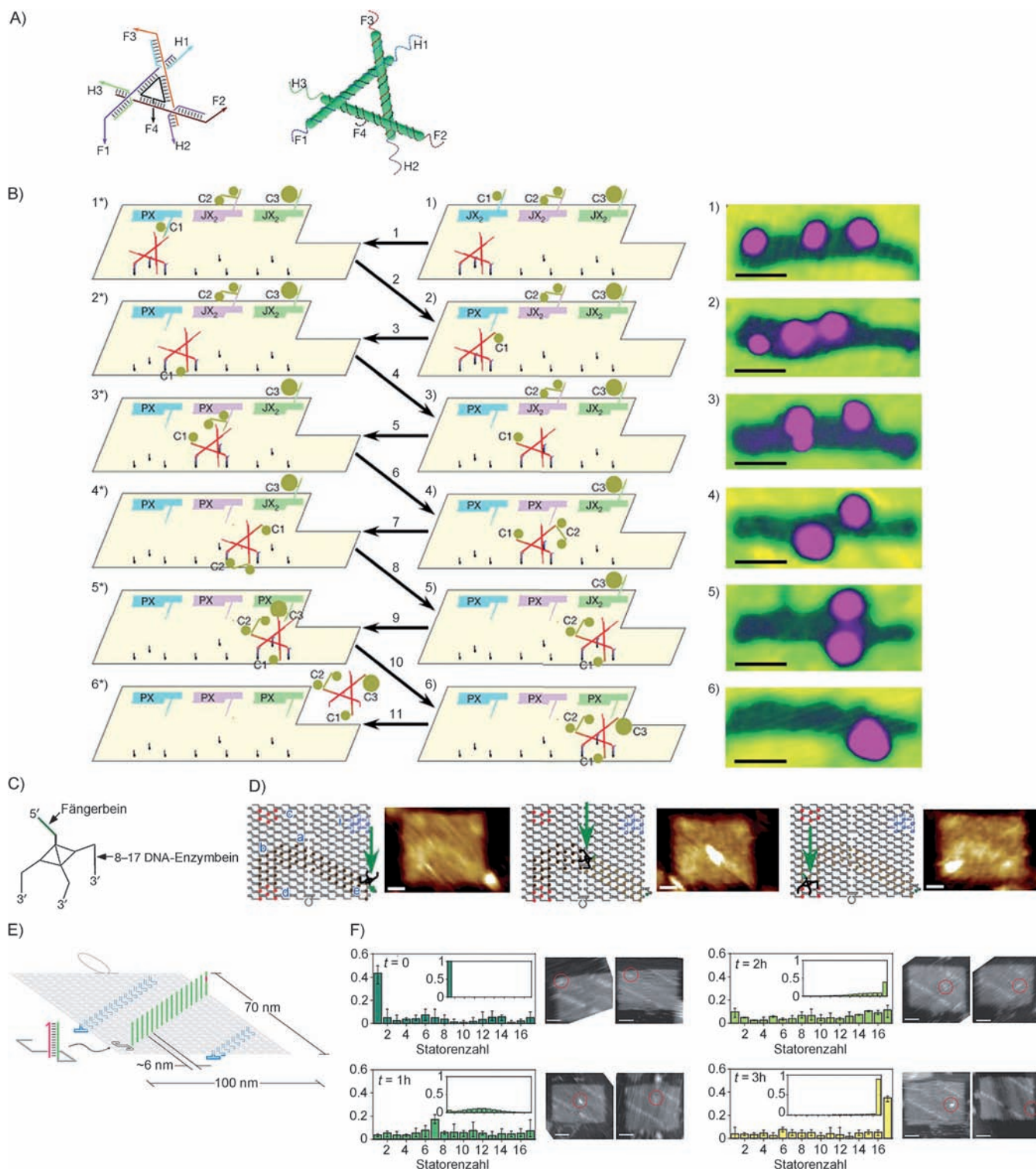


Abbildung 14. A) Stabdarstellung (links) und Strangstruktur (rechts) des Läufers mit den drei Händen (H1–H3) und vier Füßen (F1–F4). B) Die molekulare Anordnung und das Funktionsschema (links) sowie die zugehörigen AFM-Aufnahmen (rechts). Das Origami (gelber Bereich), drei Bauelemente mit zwei Zuständen (blau, purpur und grün; EIN: PX; AUS oder keine Ladungsübergabe: JX₂) und der Läufer (dreieckige Struktur) sind die Grundelemente des Systems. Die Fracht ist als grünbraune Punkte angedeutet und besteht aus einem 5-nm-Goldnanopartikel (C1), einem gekoppelten Paar aus 5-nm-Partikeln (C2) und einem 10-nm-Partikel (C3). C) Die Spinne besteht aus einem Streptavidindimer, einer einzelsträngigen 20mer-DNA (grün), die die Spinne am Start positioniert, und drei Desoxyribozymbeinen. D) Bewegung der Spinne entlang der Schiene und zugehörige AFM-Aufnahmen der Spinne am Start, unterwegs und an den Haltepunkten. Maßstabsbalken 20 nm. E) Aufbau der Origami-Kachel mit den einzelsträngigen Statoren entlang der Schiene (grün) und zwei Reihen von Haarnadelschleifen als Markierungen (blau) auf der gegenüberliegenden Oberfläche. Maßstabsbalken 100 nm. F) Spuren mit siebzehn Statoren; der Motor wird bei Sator 1 beladen und mit einem Nicking-Enzym inkubiert. Die Verteilung der Motorpositionen vor Zugabe des Enzyms und nach ein, zwei und drei Stunden wurde mit AFM bestimmt. Repräsentative Bilder und Histogramme der Motorpositionen (rote Kreise) sind für jeden Zeitpunkt gezeigt. Einschub: Verteilung der Motorpositionen, wie sie nach einem einfachen kinetischen Modell vorhergesagt wurde. Maßstabsbalken 20 nm.

8. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die in diesem Aufsatz beschriebenen Untersuchungen demonstrieren, dass mit DNA-Origami als Gerüst eine außergewöhnliche Plattform für die Anordnung unterschiedlicher funktioneller Moleküle und für ihre In-singulo-Analyse mithilfe von Einzelmolekültechniken zur Verfügung steht. Die ausgezeichnete Effizienz der Sequenzprogrammierbarkeit und die Strukturintegrität DNA-Origami-basierter Nanostrukturen wurden für die präzise Positionierung zahlreicher Moleküle und Funktionalitäten genutzt. Weiterhin wurden diese Strukturen zur Entwicklung eines Einzelmolekülnachweis-Arrays in wässriger Lösung verwendet, der verschiedene Nachteile der üblichen Mikroarray-Chiptechnologie überwindet. Da das Verfahren eine Analyse in Lösung ermöglicht, können viele physikalische, chemische und biochemische Untersuchungen an solchen Reaktionen einfach unter In-vivo-Bedingungen durchgeführt werden. Darüber hinaus sind die Origami-Strukturen mögliche Kandidaten für Einzelmoleküluntersuchungen, wie abstandsabhängige und strukturell kontrollierte Analysen, die mit einem Molekülensemble nicht möglich sind. Biomakromoleküle von mehreren Nanometern lassen sich ebenso analysieren wie chemische Reaktionen von Verbindungen im Bereich von einigen Ångström. Größe ist bei Origami-basierten In-singulo-Analysen kein begrenzender Faktor – sogar dimensionslose physikalische Abläufe wie die Energieübertragung wurden mit diesem Ansatz erfolgreich untersucht. Seine Zeitskala wird allein von der jeweiligen unimolekularen Technik bestimmt, die bei der Analyse eingesetzt wurde: Kraftbasierte Methoden erreichen Analysenzeiten von wenigen Sekunden; das Hochgeschwindigkeits-AFM-Rastersystem nimmt 15 Bilder pro Sekunde auf. Fluoreszenztechniken sind bezüglich der Geschwindigkeit überlegen und ermöglichen eine Auflösung im Subsekundenbereich. Andererseits ergeben kraftbasierte Verfahren eine höhere räumliche Auflösung (ca. 2 nm) als Fluoreszenzmessungen.

Ungeachtet der Vorteile der Origami-basierten In-singulo-Analyse warten noch verschiedene Probleme auf eine Lösung, bevor das System auf chemische und biochemische Analysen übertragen werden kann und letztlich eine praktische Anwendbarkeit von Nanochips für Systeme in Lösung erreicht wird. Die Zahl der Verfahren zur Ausweitung der Abmessungen des ursprünglichen Origami auf typischerweise 1 µm oder mehr ist begrenzt. Größere Strukturen können aber erforderlich sein, um die Adressierbarkeit des Systems bei der Positionierung vielfältiger Funktionalitäten zu steigern und um parallel laufende Analysen zu ermöglichen. Durch Selbstorganisation lässt sich diese Aufgabe effizient lösen, allerdings können hier kinetische und thermodynamische Einschränkungen vorhanden sein. Liu et al.^[15d] beschrieben ein Beispiel für die Herstellung einer größeren zweidimensionalen Origami-Struktur, während Strategien für die Konstruktion von Strukturen mit definierter Größe, kontrollierbarem Wachstum und höherer Ausbeute noch ausstehen. Die Stabilität der Origami-Strukturen – ein anderes wichtiges Kriterium – sollte bezüglich thermischer, chemischer und biochemischer Widerstandsfähigkeit verbessert werden, sodass das System ohne Einschränkungen auch

für Analysen bei höherer Temperatur und für chemische und enzymatische Untersuchungen verwendet werden kann. Wir haben kürzlich eine Methode zur thermischen Stabilisierung der DNA-Origami-Strukturen entwickelt.^[57] Es sind allerdings noch detailliertere Studien notwendig, um die verschiedenen möglichen Methoden zu erforschen. Weil auf dem Origami funktionelle Moleküle durch Konjugation an die einzelsträngige DNA angebracht werden sollen, sind vielfältige chemische Konjugationsverfahren für chemische und biologische Moleküle erforderlich. Die Leistungsfähigkeit der Techniken zur Einzelmolekülanalyse muss in Bezug auf die räumliche und zeitliche Auflösung verbessert werden. Eine Reihe von Einzelmolekültechniken ist verfügbar, jedoch wurden bislang nur wenige von ihnen eingesetzt. Allerdings verspricht das Heranziehen zusätzlicher Verfahren ein besseres Verständnis unimolekularer Prozesse, und wir erwarten, dass eine solche Entwicklung in naher Zukunft eintreten wird.

In der relativ kurzen Zeit (einem halben Jahrzehnt), seit die erste Veröffentlichung über die Origami-Methode erschienen ist, wurden verschiedene funktionelle Strukturen entwickelt und für die Einzelmolekülanalyse angewendet. Die hier beschriebenen Aspekte sind lediglich ein Anfang, denn das Arbeitsgebiet befindet sich noch in einem frühen Stadium und entwickelt sich rasch weiter.^[58] Wir erwarten, dass die Forschungen von Wissenschaftlern verschiedener Disziplinen letztlich zum Aufbau komplexer, autonomer Systeme für die Untersuchung von Einzelmolekülprozessen führen werden.

Die Autoren wurden mit einer CREST-Zuwendung der Japanischen Gesellschaft für Wissenschaft und Technologie (JST) und Zuwendungen aus dem WPI-Programm (iCeMS, Kyoto University) und dem globalen COE-Programm des Ministeriums für Erziehung, Kultur, Sport, Wissenschaft und Technologie (MEXT; Japan) gefördert. Sie danken Sekar Latha für ihre Unterstützung bei der Erstellung der Graphiken.

Eingegangen am 25. März 2011

Online veröffentlicht am 25. November 2011

übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] a) C. Bustamante, *Q. Rev. Biophys.* **2005**, 38, 291–301; b) C. Bustamante, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, 77, 45–50.
- [2] P. V. Cornish, T. Ha, *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 53–61.
- [3] a) J. R. Kuhn, T. D. Pollard, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 28014–28024; b) J. Park, Y. Jeon, D. In, R. Fishel, C. Ban, J.-B. Lee, *PLoS One* **2010**, 5, e15496.
- [4] a) A. Camacho, K. Korn, M. Damond, J.-F. Cajot, E. Litborn, B. Liao, P. Thyberg, H. Winter, A. Honegger, P. Gardellin, R. Rigler, *J. Biotechnol.* **2004**, 107, 107–114; b) J. Hasse, J. Jacak, M. Kasper, G. Regl, T. Eichberger, M. Winklmayr, F. Aberger, M. Sonnleitner, R. Schlapak, S. Howorka, L. Muresan, A.-M. Frischauf, G. J. Schutz, *Genome Res.* **2006**, 16, 1041–1045; c) K. Korn, P. Gardellin, B. Liao, M. Amacker, A. Bergstrom, H. Bjorkman, A. Camacho, S. Dorhofer, K. Dorre, J. Enstrom, T. Ericson, T. Favez, M. Gosch, A. Honegger, S. Jaccoud, M. Lapczynska, E. Litborn, P. Thyberg, H. Winter, R. Rigler, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, e89.

- [5] a) C. R. Twist, M. K. Winson, J. J. Rowland, D. B. Kell, *Anal. Biochem.* **2004**, 327, 35–44; b) P.-Y. Kwok, M. Xiao, *Hum. Mutat.* **2004**, 23, 442–446.
- [6] a) J. Sung, S. Sivaramakrishnan, A. R. Dunn, J. A. Spudich, *Methods Enzymol.* **2010**, 475, 321–375; b) T. B. Miranda, T. K. Kelly, K. Bouazoune, P. A. Jones, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2010**, 89, 21.17.1–21.17.16.
- [7] a) M. Hintersteiner, M. Auer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, 1130, 1–11; b) G. M. Skinner, K. Visscher, *Assay Drug Dev. Technol.* **2004**, 2, 397–406.
- [8] D. Schomburg, I. Schomburg, *Springer Handbook of Enzymes*, 2. Aufl., Springer, New York, **2001**.
- [9] M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, W. W. Webb, *Science* **2003**, 299, 682–686.
- [10] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, 99, 237–247.
- [11] a) K. Lund, Y. Liu, S. Lindsay, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17606–17607; b) S. H. Park, C. Pistol, S. J. Ahn, J. H. Reif, A. R. Lebeck, C. Dwyer, T. H. LaBean, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 749–753; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 735–739; c) A. Chworos, I. Severcan, A. Y. Koyfman, P. Weinkam, E. Oroudjev, H. G. Hansma, L. Jaeger, *Science* **2004**, 306, 2068–2072.
- [12] M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1592–1597.
- [13] a) X. D. Cheng, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, 24, 293–318; b) B. Youngblood, N. O. Reich, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 26821–26831.
- [14] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, 440, 297–302.
- [15] a) Z. Zhao, H. Yan, Y. Liu, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 1456–1459; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1414–1417; b) A. Rajendran, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, *ACS Nano* **2011**, 5, 665–671; c) M. Endo, T. Sugita, A. Rajendran, Y. Katsuda, T. Emura, K. Hidaka, H. Sugiyama, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 3213–3215; d) W. Liu, H. Zhong, R. Wang, N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 278–281; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 264–267.
- [16] a) E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, J. Kjems, *Nature* **2009**, 459, 73–76; b) A. Kuzuya, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2009**, 4182–4184; c) Y. Ke, J. Sharma, M. Liu, K. Jahn, Y. Liu, H. Yan, *Nano Lett.* **2009**, 9, 2445–2447; d) M. Endo, K. Hidaka, T. Kato, K. Namba, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 15570–15571; e) M. Endo, K. Hidaka, H. Sugiyama, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 2075–2077; f) S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Hogberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **2009**, 459, 414–418; g) H. Dietz, S. M. Douglas, W. M. Shih, *Science* **2009**, 325, 725–730; h) Y. Ke, S. M. Douglas, M. Liu, J. Sharma, A. Cheng, A. Leung, Y. Liu, W. M. Shih, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 15903–15908.
- [17] a) R. Chhabra, J. Sharma, Y. Ke, Y. Liu, S. Rinker, S. Lindsay, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10304–10305; b) W. Shen, H. Zhong, D. Neff, M. L. Norton, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 6660–6661; c) A. Kuzyk, K. T. Laitinen, P. Torma, *Nanotechnology* **2009**, 20, 235305–235310; d) A. Kuzuya, M. Kimura, K. Numajiri, N. Koshi, T. Ohnishi, F. Okada, M. Komiyama, *ChemBioChem* **2009**, 10, 1811–1815; e) K. Numajiri, M. Kimura, A. Kuzuya, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5127–5129.
- [18] a) S. Pal, Z. Deng, B. Ding, H. Yan, Y. Liu, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 2760–2764; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2700–2704; b) B. Ding, Z. Deng, H. Yan, S. Cabrini, R. N. Zuckermann, J. Bokor, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 3248–3249.
- [19] a) N. Stephanopoulos, M. Liu, G. J. Tong, Z. Li, Y. Liu, H. Yan, M. B. Francis, *Nano Lett.* **2010**, 10, 2714–2720; b) H. T. Maune, S.-P. Han, R. D. Barish, M. Bockrath, W. A. Goddard III, P. W. K. Rothmund, E. Winfree, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, 5, 61–66.
- [20] S. M. Douglas, J. J. Chou, W. M. Shih, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 6644–6648.
- [21] Y. Ke, S. Lindsay, Y. Chang, Y. Liu, H. Yan, *Science* **2008**, 319, 180–183.
- [22] N. V. Voigt, T. Topping, A. Rotaru, M. F. Jacobsen, J. B. Ravnsbaek, R. Subramani, W. Mamdouh, J. Kjems, A. Mokhir, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, 5, 200–203.
- [23] S. Helmig, A. Rotaru, D. Arian, L. Kovbasyuk, J. Arnbjerg, P. R. Ogilby, J. Kjems, A. Mokhir, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, *ACS Nano* **2010**, 4, 7475–7480.
- [24] M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 9412–9416; siehe auch Lit. [12].
- [25] I. H. Stein, C. Steinhauer, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 4193–4195.
- [26] H. K. K. Subramanian, B. Chakraborty, R. Sha, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2011**, 11, 910–913.
- [27] Y. Sannohe, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 16311–16313.
- [28] a) C. Steinhauer, R. Jungmann, T. L. Sobey, F. C. Simmel, P. Tinnefeld, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 9030–9034; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 8870–8873; b) R. Jungmann, C. Steinhauer, M. Scheible, A. Kuzyk, P. Tinnefeld, F. C. Simmel, *Nano Lett.* **2010**, 10, 4756–4761; siehe auch Lit. [25].
- [29] a) U. R. Mueller, D. V. Nicolau, *Microarray Technology and its Applications*, Springer, Berlin, **2005**; b) M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science* **1995**, 270, 467–470.
- [30] S. A. Bustin, T. Nolan, in *Real-Time PCR: An Essential Guide* (Hrsg.: K. Edwards, J. Logan, N. Saunders), Horizon Bioscience, Norfolk, **2004**.
- [31] C. E. Castro, F. Kilchherr, D.-N. Kim, E. L. Shiao, T. Wauer, P. Wortmann, M. Bathe, H. Dietz, *Nat. Methods* **2011**, 8, 221–229.
- [32] Q. Mei, X. Wei, F. Su, Y. Liu, C. Youngbull, R. Johnson, S. Lindsay, H. Yan, D. Meldrum, *Nano Lett.* **2011**, 11, 1477–1482.
- [33] S. Rinker, Y. Ke, Y. Liu, R. Chhabra, H. Yan, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, 3, 418–422.
- [34] a) F. S. Collins, M. S. Guyer, A. Chakravarti, *Science* **1997**, 278, 1580–1581; b) A. J. Schafer, J. R. Hawkins, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 33–39; c) A.-C. Syvanen, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, 2, 930–942; d) E. Lai, *Genome Res.* **2001**, 11, 927–929.
- [35] a) U. Landegren, M. Nilsson, P.-Y. Kwok, *Genome Res.* **1998**, 8, 769–776; b) A. Rajendran, V. Thiagarajan, B. Rajendar, S. Nishizawa, N. Teramae, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2009**, 1790, 95–100; c) A. Rajendran, C. Zhao, B. Rajendar, V. Thiagarajan, Y. Sato, S. Nishizawa, N. Teramae, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2010**, 1800, 599–610; d) V. Thiagarajan, A. Rajendran, H. Satake, S. Nishizawa, N. Teramae, *ChemBioChem* **2010**, 11, 94–100; e) B. Rajendar, A. Rajendran, Z. Ye, E. Kanai, Y. Sato, S. Nishizawa, M. Sikorski, N. Teramae, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 4949–4959; f) B. Rajendar, A. Rajendran, Y. Sato, S. Nishizawa, N. Teramae, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 351–359; g) C. Zhao, A. Rajendran, Q. Dai, S. Nishizawa, N. Teramae, *Anal. Sci.* **2008**, 24, 693–695; h) A. Okamoto, K. Tanaka, T. Fukuta, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9296–9297; i) K. Nakatani, S. Sando, I. Saito, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 51–55.
- [36] a) I. G. Panyutin, P. Hsieh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 2021–2025; b) S. Q. Wang, X. H. Wang, S. H. Chen, W. Guan, *Anal. Biochem.* **2002**, 309, 206–211.
- [37] Z. Zhang, Y. Wang, C. Fan, C. Li, Y. Li, L. Qian, Y. Fu, Y. Shi, J. Hu, L. He, *Adv. Mater.* **2010**, 22, 2672–2675.
- [38] a) A. Rajendran, S. Nakano, N. Sugimoto, *Chem. Commun.* **2010**, 1299–1301; b) G. Wang, K. M. Vasquez, *Mutat. Res.* **2006**, 598, 103–119.
- [39] a) W. E. Wright, V. M. Tesmer, K. E. Huffman, S. D. Levene, J. W. Shay, *Genes Dev.* **1997**, 11, 2801–2809; b) V. L. Makarov, Y. Hirose, J. P. Langmore, *Cell* **1997**, 88, 657–666.

- [40] a) J. L. Mergny, C. Helene, *Nat. Med.* **1998**, *4*, 1366–1367; b) S. Neidle, G. Parkinson, *Nat. Drug Discov.* **2002**, *1*, 383–393; c) L. H. Hurley, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 188–200.
- [41] a) T. Mashimo, H. Yagi, Y. Sannohe, A. Rajendran, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14910–14918; b) Y. Sannohe, H. Sugiyama, *Curr. Protoc. Nucl. Acid Chem.* **2010**, *40*, 17.2.1–17.2.17; siehe auch Lit. [39, 40].
- [42] a) Z. Yang, J. F. Carey, J. J. Champoux, *FEBS J.* **2009**, *276*, 5906–5919; b) S. Shuman, D. G. Bear, J. Sekiguchi, *EMBO J.* **1997**, *16*, 6584–6589; c) A. Patel, L. Yakovleva, S. Shuman, A. Mondragon, *Structure* **2010**, *18*, 725–733.
- [43] R. Subramani, S. Juul, A. Rotaru, F. F. Andersen, K. V. Gothelf, W. Mamdouh, F. Besenbacher, M. Dong, B. R. Kudsens, *ACS Nano* **2010**, *4*, 5969–5977.
- [44] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [45] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [46] H. Liu, T. Tørring, M. Dong, C. B. Rosen, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18054–18056.
- [47] S. E. Halford, J. F. Marko, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3040–3052.
- [48] S. W. Hell, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 24–32.
- [49] a) R. B. Best, K. A. Merchant, I. V. Gopich, B. Schuler, A. Bax, W. A. Eaton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 18964–18969; b) B. Schuler, E. A. Lipman, P. J. Steinbach, M. Kumke, W. A. Eaton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 2754–2759; c) M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–796; d) T. Heinlein, A. Biebricher, P. Schlueter, C. M. Roth, D.-P. Herten, J. Wolfrum, M. Heilemann, C. Mueller, P. Tinnefeld, M. Sauer, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 949–955.
- [50] I. H. Stein, V. Schuller, P. Böhm, P. Tinnefeld, T. Liedl, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 689–695.
- [51] Typische Beispiele: a) R. Siegwart, I. R. Nourbakhsh, *Introduction to Autonomous Mobile Robots*, MIT Press, Cambridge, USA, **2004**; b) J.-S. Shin, N. A. Pierce, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10834–10835; c) W. B. Sherman, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1203–1207.
- [52] H. Gu, J. Chao, S.-J. Xiao, N. C. Seeman, *Nature* **2010**, *465*, 202–205.
- [53] a) H. Yan, X. Zhang, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **2002**, *415*, 62–65; b) S. Liao, N. C. Seeman, *Science* **2004**, *306*, 2072–2074.
- [54] 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*, 206–210.
- [55] S. F. J. Wickham, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, J. Bath, H. Sugiyama, A. J. Turberfield, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 166–169.
- [56] H. Hess, *Science* **2006**, *312*, 860–861.
- [57] A. Rajendran, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14488–14491.
- [58] B. Saccà, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.*, DOI: 10.1002/ange.201105846; *Angew. Chem. Int. Ed.*, DOI: 10.1002/anie.201105846.