

Konstruktionsprinzip für DNA-Rotaxane mit mechanisch versteifter PX100-Achse**

Damian Ackermann, Stefan-S. Jester und Michael Famulok*

Rotaxane sind ineinander verzahnte molekulare Architekturen, die als einfachste mechanische Einheiten aufgefasst werden können.^[1] Ein auf eine Achse aufgefädelter Makrocyclus, der durch „Stopper“ am Abfädeln gehindert wird, kann sich sowohl translatorisch entlang der Achse als auch rotatorisch um die Achse bewegen. Damit solche molekularen Anordnungen gerichtete mechanische Bewegungen gewährleisten können, müssen die entsprechenden Komponenten auch die notwendige Formsteifigkeit über den gesamten Arbeitsraum aufweisen.^[2] Wenn die mikroskopische Bewegung des Makrocyclus wirksam in mechanische Energie überführt oder als Kraft übertragen werden soll, dann muss im Falle eines Rotaxans in erster Linie die Achse (bzw. die „Hantelstange“) als starres Bauelement vorliegen. Führt die Bewegung des Makrocyclus lediglich zu einer Deformation der Achse, kann auch die Energie dieser Bewegung nicht weiter genutzt werden. Das kürzlich von uns beschriebene DNA-Rotaxan^[3] hat eine translatorische Bewegungsamplitude von 100 Basenpaaren (bp). Die Persistenzlänge der doppelsträngigen DNA von rund 130 bp ist jedoch viel zu kurz, um solchen mechanischen Eigenschaften entlang der Hantelachse gerecht zu werden.^[4]

In der DNA-Nanotechnologie^[5] wurden in vielen systematischen Studien Methoden entwickelt, die durch Selbstanordnung von DNA-Sequenzen nicht nur den Aufbau topologisch definierter Architekturen erlauben, sondern auch zu robusten, zwei- und dreidimensionalen Objekten führen.^[6] Die grundlegenden Arbeiten dazu stammen von Seeman. Er hat gezeigt, dass zwei DNA-Doppelstränge, die durch mehrfachen reziproken Strangaustausch ineinander verwoben sind, zu steifen, molekularen Assemblaten führen.^[4,7] Unter ihnen sind es insbesondere die paranemisch überkreuzten („paranemic crossover“) Strukturen PX und JX,^[8] die für mechanische Schalter in der DNA-Nanotechnologie Anwendung gefunden haben.^[9] PX-Elemente zeichnen sich da-

durch aus, dass an jedem Berührungspunkt zweier antiparallel angeordneter DNA-Doppelstränge ein Strangaustausch stattfindet. Beim JX-Element dagegen wird der Strangaustausch an zwei hintereinander folgenden Positionen aufgehoben. Das Besondere an den PX- und JX-Elementen besteht darin, dass zwei unabhängige DNA-Doppelstränge durch gegenseitige Basenpaarungen zusammengehalten werden. Eine paranemisch überkreuzte Struktur befindet sich folglich immer im Gleichgewicht mit den entsprechenden DNA-Doppelsträngen. In Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen liegt das Gleichgewicht stark auf der Produktseite.^[10]

Für die Assemblierung des dsDNA-Rotaxans haben wir ein Einfädelungsverfahren entwickelt, das auf der Bildung von acht Basenpaaren zwischen der DNA-Achse und dem Makrocyclus beruht.^[3] Die Hybridisierung der beiden Komponenten ist sehr effizient und führt zu einer quantitativen Bildung des Rotaxans. Wegen der hohen Flexibilität der Einzelstrangregion kann sich die DNA-Achse konformativ leicht an die vorgegebene Geometrie des Makrocyclus anpassen, was zu einem quantitativen Einfädeln der Achse führt. Höher geordnete DNA-Architekturen wie paranemisch überkreuzte DNA oder gar DNA-Origami^[11,12] lassen diese Flexibilität jedoch nicht mehr zu. Im Gegenteil: Gerade ihre mechanische Robustheit macht sie so bedeutend in der DNA-Nanotechnologie. Allerdings bedeutet dies umgekehrt für die Einfädelung des Makrocyclus in die Achse eines Rotaxans eine besondere Herausforderung, für die neuartige Design-Prinzipien erforderlich sind, welche wir hier beschreiben.


Um das Anwendungsspektrum mechanisch verzahnter DNA-Architekturen auch an derartigen höher geordneten DNA-Strukturen zu ermöglichen, wollten wir unser Einfädelungsprinzip auf ein robustes paranemisch überkreuztes System ausdehnen und das PX100-Rotaxan (Abbildung 1a) assemblieren. Die Versteifung der Hantelachse wird durch ein erweitertes überkreuztes PX-JX2-System erreicht, bei dem zwei parallel liegende DNA-Doppelstränge über sechs Doppelüberkreuzungen („double-crossovers“) ineinander verflochten sind (Abbildung 1b). Entscheidend am Design der Achse ist der Abschnitt, bei dem zwei mögliche Überkreuzungen nicht realisiert werden, entsprechend einem JX2-Element. Dieses wurde eingebaut, um eine einzelsträngige Lücke einzuführen, die bei der Assemblierung des Rotaxans die Hybridisierung mit dem Makrocyclus erlaubt.

Sowohl die Gap-Region der PX100-Achse als auch die am Makrocyclus bedürfen dabei einer ganz anderen Konzeption als bei einem klassischen DNA-Doppelstrang. Unseren Überlegungen zufolge muss die Hybridisierung über acht Nukleobasen an einem einzigen durchgehenden DNA-Strang erfolgen und darf nicht über eine Überkreuzung führen. Be-

[*] Dr. D. Ackermann, Prof. M. Famulok
Universität Bonn, LIMES Institut, Chemical Biology & Med. Chem.
Unit c/o Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
E-Mail: m.famulok@uni-bonn.de
Homepage: <http://www.famuloklab.de>

Dr. S.-S. Jester
Universität Bonn
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch das European Research Council (ERC Advanced Grant 267173) unterstützt. Wir danken H. Haschke, JPK Instruments, für HyperDrive-AFM-Messungen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201202816> zu finden.

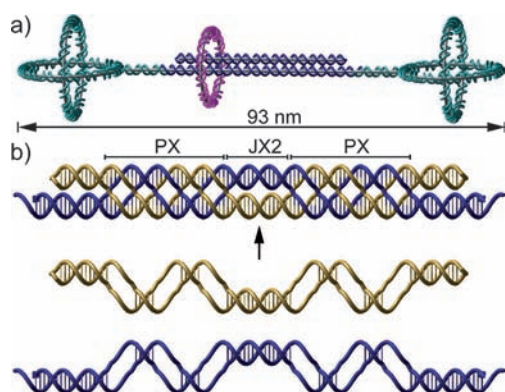


Abbildung 1. Paranemische Überkreuzungen in einem PX100-DNA-Rotaxan. a) Idealisierte dreidimensionale Darstellung des DNA-Rotaxans mit formstarrer PX100-Achse (blau), sphärischen Stoppern (grün) und frei beweglichem Makrocyclen (magenta). b) Die PX100-Achse wird durch paranemischen Strangaustausch zwischen einer 100-meren DNA-Hantel (gold) und einem 113-meren DNA-Duplex (blau) mit 5'-Überhängen gebildet. Die Abbildungen wurden mit NANOENGINEER erstellt.

sonders wichtig ist, dass die Watson-Crick-Seiten aller beteiligten Nukleobasen nach außen gerichtet sind, denn nur dadurch können sich die beiden Partner im bimolekularen Einfädelungsprozess auch finden und ein stabiles Pseudorotaxan bilden. Dementsprechend wurden die DNA-Sequenzen so angelegt, dass die beiden separierten DNA-Doppelstränge in einer 6:5-PX-Anordnung miteinander hy-

bridisieren. Die Energieminimierungen sowie die potentiellen Paarungsmuster der Sequenzen wurden mithilfe von MFOLD überprüft (siehe Hintergrundinformation, Abbildung S1). Die exakte Basensequenz der vollständigen PX100-Achse ist in Abbildung 2a dargestellt. Die Wahl der Gap-Region innerhalb des JX2-Abschnittes stützt sich auf eine für die PX100-Achse repräsentative 3D-Darstellung (Abbildung 2b), die mit dem Programm NANOENGINEER erstellt wurde. Wie der Abbildung 2b zu entnehmen ist, kann sich der Makrocyclen über den Bereich der acht vorgesehenen Nukleotide (nt) ungehindert von außen an die Einzelstrangdomäne in der PX100-Achse anlagern, sodass die Einfädelungseffizienz maximiert wird.

Die PX100-Achse setzt sich aus insgesamt drei DNA-Sequenzen zusammen. Zwei davon sind 113 Nukleotide lang und bilden zusammen den blau dargestellten Doppelstrang, an dessen 5'-Überhänge später die Stopper ligiert werden (Abbildung 1b und 2a). Die 191-mer Sequenz faltet sich unter Bildung zweier Haarnadelstrukturen zum braun gezeigten Doppelstrang. Dieser weist außerdem eine neun nt lange Lücke auf, die später dem Einfädeln des Makrocyclen durch Hybridisierung dient.

Die Assemblierung der PX100-Achse erfolgte durch langsames Abkühlen der drei DNA-Sequenzen von 95 °C auf 15 °C mit einer Abkühlrate von 36 °C h⁻¹ in TAE-MgCl₂-Puffer (Seeman-Puffer). Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) zeigt eine fast quantitative Bildung der PX100-Achse (Abbildung S2). Um bei der Rotaxansynthese unerwünschte Nebenprodukte zu vermeiden, wurde die PX100-

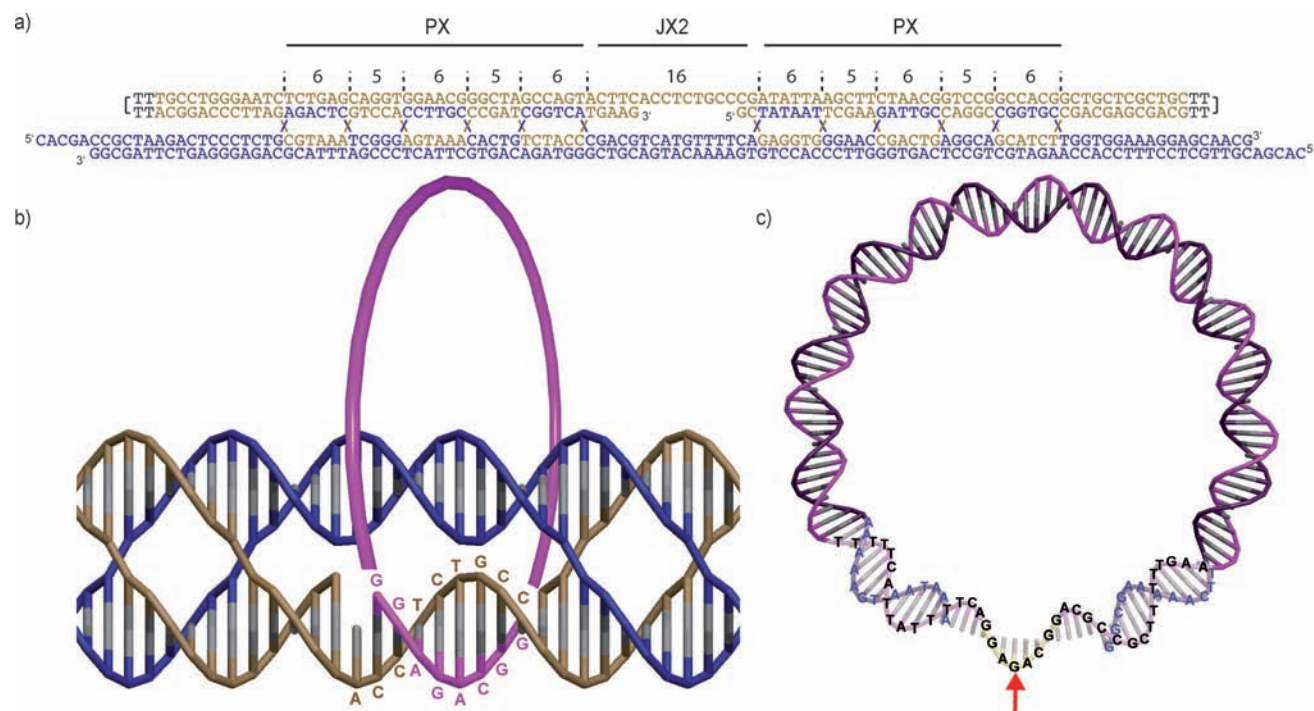


Abbildung 2. Design des DNA-Rotaxans mit PX100-Achse. a) Aufbau der PX100-Achse. Die DNA-Sequenzen der PX100-Achse wurden so angelegt, dass sich die Komponenten in einem 6:5-PX-Muster anordnen. b) Repräsentative dreidimensionale Darstellung der PX100-Achse mit eingefädelt Makrocyclen. Die Gapregion im JX2-Teil wurde so gewählt, dass die acht für das Einfädeln relevanten Nukleobasen (CCGTCTCC, gold) nach außen zeigen und sich der Makrocyclen (magenta) dadurch optimal an die Achse anlagern kann. c) Dreidimensionale Darstellung des Makrocyclen PX100GR in seiner bevorzugten Konformation. Die Hybridisierungsstelle (GGAGACGG, gelb) mit der PX100-Achse verläuft in seiner Mitte (G mit rotem Pfeil) durch eine äußere Position, sodass sich der Makrocyclen ohne Reorientierung an die Achse anlagern kann.

Achse über schwache Anionentauscher (WAX) mittels HPLC aufgereinigt. In Seeman-Puffer bleibt die aufgereinigte Achse über Monate hinweg stabil.

Um eine möglichst hohe Effizienz beim Einfädeln der Achse in den Ring zu erreichen, wurde gleichzeitig auch der Ort der Einzelstrang(Gap)-Region^[13] im Makrocyclus optimiert. Dabei orientierten wir uns an der NMR-Struktur eines (AT)6-Bereichs, aus der sich ableiten lässt, dass das 5'-A-Nukleosid des (AT)6-Bereichs bevorzugt die äußere Position im Ring einnimmt (Abbildung 2c).^[14] Die Einzelstrangregion im Makrocyclus wurde so gewählt, dass der mittlere Teil der Hybridisierungsstelle ebenfalls an einer Außenposition liegt (Abbildung 2c, roter Pfeil und gelbe Sequenz).

Zur Untersuchung der Einfädeleffizienz wurden zunächst Pseudorotaxane hergestellt, bei denen einfache 168 bp große Ringstopper an die Hantelstange ligiert wurden (Abbildung 3a). Auch wenn dieses Vorgehen nicht zu mechanisch stabilen Rotaxanen führt, haben solche Pseudorotaxane

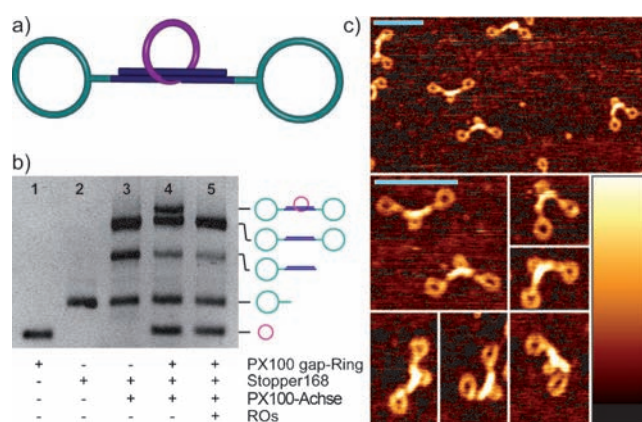


Abbildung 3. PX100-Pseudorotaxan. a) Vereinfachte Darstellung des Pseudorotaxans mit Ringstopperrn (grün), PX100-Achse (blau) und gebundenem Makrocyclus (magenta). b) Agarose-Gel (2.2%) der Pseudorotaxan-Synthese. Spur 1: PX100-Gap-Ring; Spur 2: Stopper168; Spur 3: Rohprodukt der Hantelsynthese; Spur 4: Rohprodukt der Pseudorotaxansynthese; Spur 5: Durch Zugabe der beiden ROs zum Pseudorotaxan wird dieses vollständig zur Hantel und zum freien Makrocyclus abgebaut. c) AFM-Bilder des aufgereinigten Pseudorotaxans. Der Makrocyclus ist jeweils in der Mitte der Achse lokalisiert (Maßstabsleiste 100 nm, Farbkodierung der Höhe 0.0–1.0 nm).

gleich zwei bedeutende Vorteile. Erstens lassen sich die planaren Architekturen einfach auf Glimmer adsorbieren und mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) gut charakterisieren. Zweitens ist das durch „Release-Oligonukleotide (ROs)“ getriggerte Ausfädeln des Makrocyclus von der Hantel ein direkter Beleg für den verzahnten Charakter der Struktur (vor der Zugabe der RO) und für die freie Beweglichkeit des Makrocyclus nach dem Ablösen von der Achse. Das Pseudorotaxan wurde in zwei Schritten assembliert. Zunächst wurden der Makrocyclus und die PX100-Achse über Nacht bei 12°C inkubiert. Anschließend wurde der Ringstopper an die beiden Enden der Achse ligiert.

Die Ligation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese verfolgt. Aus dem Verhältnis zwischen der Hantel- und der Rotaxanbande kann die Effizienz des Einfädelns bestimmt

werden. Bei einer Gesamtkonzentration von 25 mM $MgCl_2$ in 1× Ligase-Puffer bei 12°C wurde eine Effizienz von rund 50% erreicht (Abbildung S3). Eine weitere Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration hatte keinen Einfluss auf das Einfädeln. In einem weiteren Gelshift-Experiment wurde gezeigt, dass durch Zugabe der beiden ROs unseren Erwartungen entsprechend der Ring von der Achse abgelöst wird und das Pseudorotaxan über einen „slippage“-Mechanismus^[15] zur entsprechenden Hantel und dem freien Ring abgebaut wird (Abbildung 3b). AFM-Aufnahmen von durch WAX-HPLC aufgereinigtem Pseudorotaxan belegen die Struktur der verzahnten Architektur (Abbildung 3c). Ein besonderes Augenmerk gilt dabei der PX100-Achse, die sich im Durchmesser und im Höhenprofil deutlich vom einfachen DNA-Doppelstrang der Ringstopper und des Makrocyclus unterscheidet. Außerdem sitzt der eingefädelte Makrocyclus erwartungsgemäß immer in der Mitte der PX100-Achse, die entweder komplett gerade verläuft oder an der Ring-Bindungsstelle minimal geknickt ist. Diese Beobachtung deckt sich vollständig mit unserer Vorstellung von der steifen Achse, die sich in Abwesenheit der ROs innerhalb der JX2-Domäne minimal beugen lässt.

Aus einer vorangegangenen Studie wissen wir, dass die mechanische Blockierung des Makrocyclus auf der Hantel, und damit die Herstellung eines echten Rotaxanes, erst unter Verwendung von sphärischen Stoppern möglich wird.^[3] Die bisherige Synthese der sphärischen Stopper ist vergleichsweise aufwändig, weil sie über drei Stufen verläuft. Mittels einer abgeänderten Methode gelingt es uns nun, die Crossover-Ringe in einem Zweistufen-Verfahren ohne Zwischenreinigung zu assemblieren.

Dazu wird die Kugel in zwei Ringe (Ring B, Ring C) aufgeteilt (Abbildung 4a). Ring B weist vier Überhänge auf, die an die beiden Einzelstrangregionen des Doppel-Gap-Rings binden. In einem ersten Schritt wurden die beiden Ringe separat assembliert und ligiert. Werden die beiden Ringe unter Ligationsbedingungen vereint, dann entsteht die Kugel (Abbildung 4b) als einziges, einheitliches Produkt (Hintergrundinformationen, Movie 1). Nach Aufreinigung über WAX-HPLC werden die Crossover-Ringe in zufriedenstellender Ausbeute von 10–20% erhalten. Wir haben zwei Arten dieser sphärischen DNA-Architekturen hergestellt: die erste Variante enthielt eine „Drei-Wege-Kreuzung“ an einem der Ringe, die mit einer zu dem blauen Einzelstrang-Überhang der PX100-Achse komplementären Sequenz endet (Abbildung 1b), welche später für die Ligation der kugelförmigen Stopper verwendet wird. In einer zweiten Variante fehlte diese Verzweigung. Hier erhielten wir in Abbildung 4b rechts gezeigte sphärische DNA-Architektur, deren überkreuzte, kugelförmige Struktur im AFM-Bild in sehr guter Auflösung zu erkennen ist (Abbildung 4c). Diese rein sphärischen, aus überkreuzten DNA-Nanoringen assemblierten DNA-Nanostrukturen könnten potentiell Anwendungen als DNA-Käfige für die Verkapselung von molekularem Frachtgut dienen, ähnlich wie es kürzlich für tetraedrische Architekturen beschrieben wurde.^[16]

Um ein mechanisch stabiles Rotaxan der in Abbildung 4d schematisch gezeigten Struktur zu erhalten, wurden die verzweigten sphärischen Stopper an die PX100-Achse mit dem

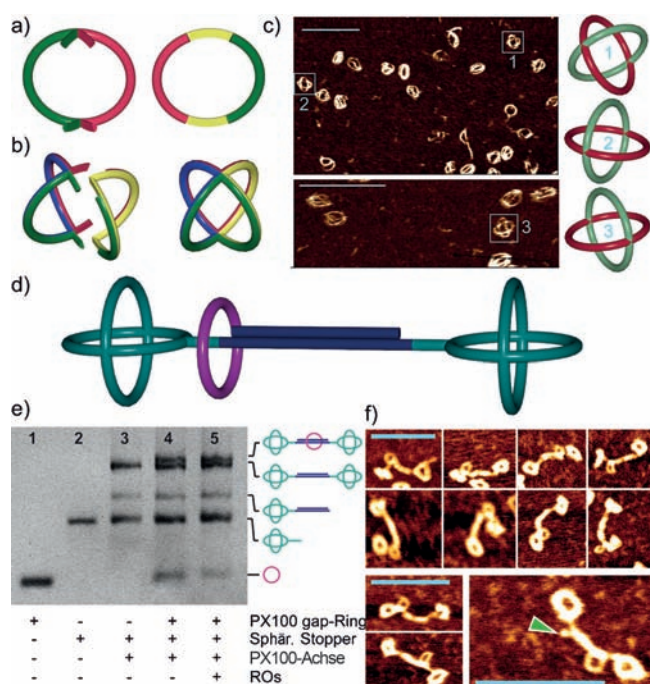


Abbildung 4. Assemblierung der sphärischen DNA-Stopper und des PX100-DNA-Rotaxans. a) Vereinfachte Darstellung der Intermediate bei der Kugelsynthese: Ring B (links) mit vier Überhängen, Ring C (rechts) mit zwei Einzelstranglücken. b) Illustration zum Aufbau der Holliday-Junction (links) und Darstellung der Kugel mit vier zirkulären Einzelsträngen (rechts). c) AFM-Bilder der aufgereinigten Kugel (Maßstabsleiste 100 nm). d) Vereinfachte Darstellung des PX100-Rotaxans mit sphärischen Stoppern. Im Unterschied zum Pseudorotaxan mit Ringstoppern wird das Pseudorotaxan durch Zugabe der ROs in ein mechanisch stabiles Rotaxan überführt. e) Agarose-Gel (2.2%) der PX100-Rotaxan-Synthese. Spur 1: PX100-Gap-Ring; Spur 2: sphärische Stopper; Spur 3: Rohprodukt der Hantelsynthese; Spur 4: Rohprodukt der Pseudorotaxansynthese mit ca. 50% Einfädeeffizienz; Spur 5: Durch Zugabe der beiden ROs zum Pseudorotaxan wird dieses in ein echtes Rotaxan überführt. f) AFM-Bilder des aufgereinigten Pseudorotaxans. Die Position des Makrocyclus ist nicht mehr auf das Zentrum beschränkt (Maßstabsleiste 100 nm).

aufgefädelten Makrocyclus ligiert. Der Aufbau wurde wiederum mittels Agarose-Gelelektrophorese verfolgt (Abbildung 4e). Aus dem Verhältnis der Banden, die dem Pseudorotaxan und der Hantelstruktur entsprechen (Abbildung 4e, Bahn 4), ist eine Einfädeeffizienz von fast 50% ersichtlich. Durch Zugabe der beiden Release-Oligonukleotide bildete sich das mechanisch stabile Rotaxan (Abbildung 4e, Bahn 5). Die in Abbildung 4f gezeigten AFM-Bilder des mechanisch stabilen PX-100-DNA-Rotaxans offenbaren einige bemerkenswerte Eigenschaften dieser neuartigen Klasse von DNA-Rotaxanen mit formstabiler Achse. Zunächst zeigen die Höhenprofile, dass sowohl die sphärischen Stopper als auch die PX100-Region der Achse im Vergleich zum Makrocyclus, aber auch hinsichtlich der kurzen Doppelstrangregionen an der Ligationstelle deutlich hervorgehoben sind. Besonders interessant ist aber die Beobachtung, dass sich der DNA-Makrocyclus in einigen Scans in Abbildung 4f in der Nähe der Stopper aufhält, was seine freie Beweglichkeit belegt. Außerdem zeigt die in Abbildung 4f

unten rechts dargestellte Struktur einen Zustand mit abgewinkelter Haarnadelstruktur am Ende der PX100-Achse (grüner Pfeil). AFM-Aufnahmen der aufgereinigten PX100-Achse bestätigen diese Beobachtung (Abbildung S4).

Zusammenfassend konnten wir ein neuartiges Konstruktionsprinzip etablieren, das erstmals die Einfädelung eines DNA-Makrocyclus in eine mechanisch versteifte paranemische PX100-Struktur ermöglicht. Die so erhaltene DNA-Architektur kann an sphärische DNA-Stopper ligiert werden, über deren vereinfachten Aufbau wir hier ebenfalls berichten. Durch Zugabe der „Release-Oligodesoxynukleotide“ zum Pseudorotaxan erhielten wir ein stabiles DNA-Rotaxan mit einem mechanisch verzahnten, aber frei beweglichem Makrocyclus, das über eine mechanisch versteifte Achse verfügt, die – anders als in bisher beschriebenen DNA-Rotaxanen^[3] – kaum noch verformbar ist. Diese Art verzahnter DNA-Architekturen sollte prinzipiell für die wirksame Überführung der Bewegung des Makrocyclus in mechanische Energie geeignet sein und könnte potentiell Anwendung in der Nanomechanik finden.

In der Biologie gibt es eine Reihe von Prozessen, die auf der wirksamen Übertragung mechanischer Kräfte beruhen. Prominente Beispiele dafür sind Muskel-, Motor- und Transportproteine.^[17] Dabei führt die Energie, die durch die Bindung von Molekülen oder die Hydrolyse chemischer Bindungen freigesetzt wird, zur Erzeugung von Kräften oder mechanischer Arbeit entlang einer Koordinate. Die hier vorgestellten DNA-Architekturen sollen in unseren weiteren Studien der Übertragung von Kräften in gerichtete Bewegungen dienen und so weiter entwickelt werden, dass sie zur Verrichtung von mechanischer Arbeit fähig werden. Solche komplexen Systeme verlangen eine graduelle Weiterentwicklung, zu der auch die hier gezeigten Möglichkeiten der mechanischen Verfestigung und ihre Integration in höher geordnete Assemblate zählen. Ganz allgemein kann man diese Strukturen als Modellsysteme auffassen, mit deren Hilfe es gelingen kann, mechanische Phänomene in biologischen Systemen zu emulieren und besser zu verstehen.

Experimentelles

Reagentien. Die DNA-Sequenzen für die PX100-Achse stammen von der Firma Biolegio. Alle anderen Sequenzen stammen von der Firma Metabion. Alle Sequenzen wurden mit einem 5'-Phosphat in HPLC-Qualität erhalten. Für die verwendeten Sequenzen siehe Hintergrundinformation. Seeman-Puffer: 40 mM Tris, 20 mM AcOH, 12.5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA. 1× DNA-Lagerpuffer: 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.5.

HPLC-Aufreinigung. Schwache Anionentauscher; HPLC-Säule TSKgel DEAE-NPR 4.6 mm × 35 mm (Tosoh); Puffer A: 20 mM Tris-HCl, pH 9.0; Puffer B: Puffer A + 1 M NaCl; Gradient 40–65% B in 30 min. Nach der Aufreinigung wurden die Fraktionen mit Ultracel Centrifugal Filters (YM-30, YM-100, Millipore) aufkonzentriert, zweimal mit DNA-Lagerpuffer gewaschen und in 100 µL DNA-Lagerpuffer aufgenommen.

Gelelektrophorese: Agarosegele wurden in 0.5×TAE (Trisacetat-EDTA) während 15–20 min bei 120 V gefahren und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Synthese des Makrocyclus PX100GR und der Stopper168 erfolgte wie beschrieben.^[3]

Assemblierung der DNA-Kugeln. 1600 pmol jeder DNA-Sequenz (siehe Hintergrundinformationen) für Ring B und ebenso für

Ring C wurden in 1 × Ligasepuffer (200 µL) (Fermentas) auf 60 °C aufgeheizt und mit 36 °C h⁻¹ auf 15 °C abgekühlt. Ligase (4 µL, 20 U, Fermentas) wurde zugegeben und über Nacht bei 15 °C ligiert. Die beiden Proben Ring B und Ring C wurden vereint, nochmals mit Ligase (4 µL, 10 U) versetzt und weitere 24 h bei 15 °C inkubiert. Das Rohprodukt wurde über WAX-HPLC aufgereinigt. Die Assemblierung der sphärischen Stopper erfolgte nach gleichem Protokoll unter Verwendung der entsprechenden Sequenzen (RingSE a und RingSE b für Ring C' anstelle von GE-5, siehe Hintergrundinformationen).

Assemblierung der PX100-Achse. Die drei DNA-Sequenzen HP-PX, AK1-PX und AK2-PX (jeweils 1000 pmol) wurden in Seeman-Puffer auf 95 °C aufgeheizt und mit einer Abkühlrate von 36 °C h⁻¹ auf 15 °C abgekühlt. Das Rohprodukt wurde über WAX-HPLC aufgereinigt, über Ultracel Centrifugal Filters (YM-30, Millipore) aufkonzentriert und sofort auf Seeman-Puffer umgepuffert. Die Assemblierung wurde mit Agarosegelelektrophorese (2.2%) verfolgt (Hintergrundinformationen).

Herstellung des Rotaxans. Die PX100-Achse (10 pmol, 1.0 Äquiv.) und der PX100GR (2.0 Äquiv.) wurden im 1 × Ligasepuffer mit zusätzlichem MgCl₂ (25 mM Gesamtkonzentration) bei 12 °C über Nacht inkubiert. Die Stopper (Ringstopper bzw. sphärische Stopper, jeweils 2.5 Äquiv.) wurden zugegeben, die Proben mit Ligase (2 µL, 10 U) versetzt und 2 h bei 12 °C inkubiert (Gesamtvolumen 100 µL). Anschließend wurde zuerst das längere Release-Oligonukleotid PXGR-RO (5 Äquiv.) und nach 30 min das kürzere PX-RO (10 Äquiv.) zugegeben und 30 min weiter ligiert. Zur strukturellen Charakterisierung mit AFM wurde das Pseudorotaxan mit Ringstoppern vor Zugabe der ROs über WAX-HPLC aufgereinigt, das mit sphärischen Stoppern nach der Zugabe der ROs.

Rasterkraftmikroskopie (AFM). Nanowizard 3, JPK Instruments; Messmodi: HyperDrive in Flüssigkeit (Kugel); AC an Luft (Rotaxanstrukturen); Substrat: Glimmer mit linearem Polyethylenimin als Haftvermittler.

Eingegangen am 12. April 2012

Online veröffentlicht am 31. Mai 2012

Stichwörter: DNA-Nanoringe · DNA-Nanotechnologie · DNA-Rotaxane · Paranemische Überkreuzungen · Pseudorotaxane

- [1] a) V. V. Balzani, A. Credi, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3484–3530; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3348–3391; b) J. E. Beves, B. A. Blight, C. J. Campbell, D. A. Leigh, R. T. McBurney, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9428–9499; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9260–9327; c) A. Coskun, M. Banaszak, R. D. Astumian, J. F. Stoddart, B. A. Grzybowski, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 19–30; d) E. R. Kay, D. A. Leigh, *Pure Appl. Chem.* **2008**, *80*, 17–29; e) E. R. Kay, D. A. Leigh, F. Zerbetto, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 72–196; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 72–191; f) J. Sauvage, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 611–619; g) C. A. Schalley, K. Beizai, F. Vögtle, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 465–476.
- [2] A. Moretto, I. Menegazzo, M. Crisma, E. J. Shotton, H. Nowell, S. Mammi, C. Toniolo, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9148–9151; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8986–8989.
- [3] D. Ackermann, T. L. Schmidt, J. S. Hannam, C. S. Purohit, A. Heckel, M. Famulok, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 436–442.
- [4] P. Sa-Ardyen, A. V. Vologodskii, N. C. Seeman, *Biophys. J.* **2008**, *84*, 3829–3837.
- [5] a) N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 65–87; b) E. Stulz, G. Clever, M. Shionoya, C. Mao, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5633–5635; c) A. V. Pinheiro, D. Han, W. M. Shih, H. Yan, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 763–772; d) a. D. Y. Zhang, G. Seelig, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 103–113; e) U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3933–3935; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *47*, 3871–3873; f) Y. Krishnan, F. C. Simmel, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3180–3215; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3124–3156.
- [6] a) T. Wang, D. Schiffels, S. M. Cuesta, D. K. Fygenson, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1606–1616; b) E. Stulz, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 4456–4469; c) N. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427–431.
- [7] a) E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, N. C. Seeman, *Nature* **1998**, *394*, 539–544; b) T. J. Fu, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3211–3220; c) X. Li, X. Yang, J. Qi, N. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6131–6140; d) X. Yang, L. Wenzler, J. Qi, X. Li, N. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9779–9786.
- [8] a) C. H. Spink, L. Ding, Q. Yang, R. D. Sheardy, N. C. Seeman, *Biophys. J.* **2009**, *97*, 528–538; b) Z. Shen, H. Yan, T. Wang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1666–1674; c) X. Zhang, H. Yan, Z. Shen, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12940–12941; d) K. A. Afonin, D. J. Cieply, N. B. Leontis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 93–102; e) P. K. Maiti, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 6047–6056.
- [9] a) H. Yan, X. Zhang, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **2002**, *415*, 62–65; b) P. E. Constantinou, T. Wang, J. Kopatsch, L. B. Israel, X. Zhang, B. Ding, W. B. Sherman, X. Wang, J. Zheng, R. Sha, N. C. Seeman, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3414–3419.
- [10] a) M. Santosh, P. K. Maiti, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 1393–1402; b) P. K. Maiti, T. A. Pascal, N. Vaidehi, W. A. Goddard, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, *7*, 1712–1720.
- [11] a) P. Rothemund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302; b) Y. Ke, N. V. Voigt, K. V. Gothelf, W. M. Shih, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1770–1774; c) Z. Zhao, Y. Liu, H. Yan, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 2997–3002; d) T. Liedl, B. Högberg, J. Tytell, D. E. Ingber, W. M. Shih, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 520–524.
- [12] Übersichtsartikel: a) B. Saccà, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 60–69; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 58–66; b) F. C. Simmel, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, DOI: 10.1016/j.copbio.2011.1012.1024; c) W. M. Shih, C. Lin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 276–282; d) T. Tørring, N. V. Voigt, J. Nangreave, H. Yan, K. V. Gothelf, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5636–5646.
- [13] a) G. Rasched, D. Ackermann, T. L. Schmidt, P. Broekmann, A. Heckel, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 981–984; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 967–970; b) T. L. Schmidt, C. K. Nandi, G. Rasched, P. P. Parui, B. Brutschy, M. Famulok, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4460–4462; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4382–4384; c) D. Ackermann, G. Rasched, S. Verma, T. L. Schmidt, A. Heckel, M. Famulok, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4154–4156; d) G. Mayer, D. Ackermann, N. Kuhn, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 985–987; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 971–973.
- [14] D. MacDonald, K. Herbert, X. Zhang, T. Polgruto, P. Lu, *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 1081–1098.
- [15] F. M. Raymo, J. F. Stoddart, *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 1987–1997.
- [16] a) C. M. Erben, R. P. Goodman, A. J. Turberfield, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7574–7577; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7414–7417; b) A. S. Walsh, H. Yin, C. M. Erben, M. J. Wood, A. J. Turberfield, *ACS Nano* **2011**, *5*, 5427–5432.
- [17] a) C. Bustamante, Y. R. Chemla, N. R. Forde, D. Izhaky, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 705–748; b) H. Herrmann, H. Bär, L. Kreplak, S. V. Strelkov, U. Aebi, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 562–573; c) J. D. Humphrey, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **2003**, *459*, 3–46; d) A. Kis, S. Kasas, B. Babić, A. Kulik, W. Benoît, G. Briggs, C. Schönenberger, S. Catsicas, L. Forró, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 248101.