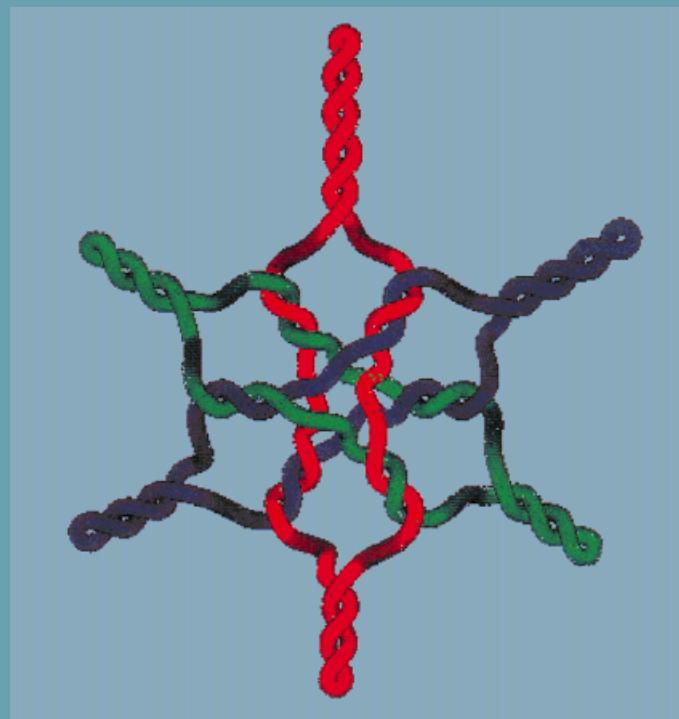
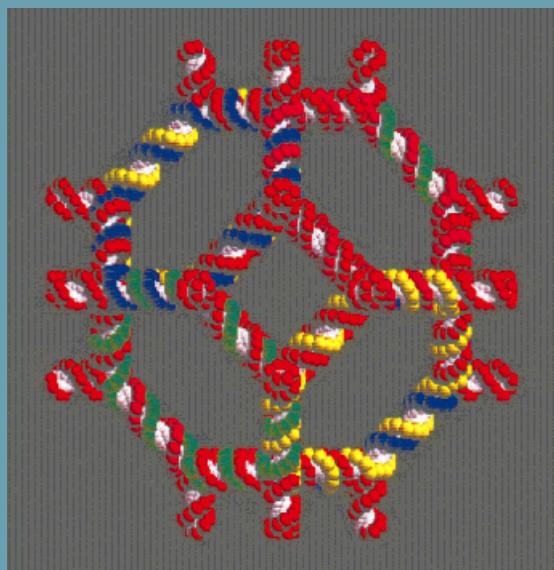


Drei ästhetisch ansprechende topologische Zielstrukturen der DNA-Nanotechnologie (von oben nach unten): ein Würfel, borromäische Ringe und ein Oktaederstumpf.



Mit den Verknüpfungsmethoden der Biotechnologie werden diese Strukturelemente aus verzweigten DNA-Molekülen aufgebaut.



Nanostrukturen und Topologien von Nucleinsäuren

Nadrian C. Seeman*

Die DNA ist als genetisches Material aller lebenden Organismen wohlbekannt. Die Eigenschaften, die sie für diese Rolle tauglich machen, können aber auch für chemische Zwecke genutzt werden. So basiert eine der aussichtsreichsten Richtungen der Nanotechnologie auf diesem genetischen Molekül. Es ist möglich, stabile verzweigte DNA-Moleküle aufzubauen, die durch die Spezifität überhängender kohäsiver („sticky“) Enden gesteuert

zu aus Stäben aufgebauten Körpern zusammengefügt werden können. Es wurden Moleküle mit Kanten aus doppelhelicaler DNA konstruiert, die die Konnektivität eines Würfels oder eines abgestumpften Oktaeders aufweisen. Auch zweidimensionale Anordnungen mit vorprogrammierten Struktureigenschaften wurden synthetisiert. Die topologischen Eigenschaften der DNA wurden genutzt, um gezielt entworfene Knoten und borromäische Ringe

herzustellen. Außerdem lassen sich DNA-Konformationsumwandlungen als Basis für nanomechanische Funktionseinheiten nutzen. DNA kann viel mehr sein als nur ein Speicher für genetische Information!

Stichwörter: Catenane • DNA-Strukturen • Mechanische Bindungen • Nanostrukturen • Topochemie

1. Einleitung

1.1. DNA-Nanotechnologie

„Nanotechnologie“ ist ein Wort, dem man in der Chemie mittlerweile häufig begegnet. Es gibt viele Interpretationen für diesen Begriff, aber das offensichtlichste Ziel der Nanotechnologie ist es, das gleiche Ausmaß an Kontrolle über die Manipulation und Anordnung realer Moleküle und molekulärer Gruppierungen zu erhalten, die die molekulare Graphik über die Manipulation und Anordnung von Molekülmodellen hat. Es gab zwei maßgebliche Anregungen für diesen Ansatz einer sehr ehrgeizigen Chemie: Die erste war Feynmans berühmter Vortrag „*There's Plenty of Room at the Bottom*“.^[1] Feynman vermutete, daß es möglich sein würde, Maschinen herzustellen, die Kopien ihrer selbst in einem etwas kleineren Maßstab produzieren; letztendlich würde dieser Prozeß zu winzig kleinen Fabriken führen, die dicht gepackt werden könnten. Die zweite Anregung stammt aus unserer wachsenden Kenntnis darüber, wie biologische Systeme ihre Strukturkomponenten arrangieren: in erster Linie durch Selbstorganisation in supramolekularem Maßstab. Daher ist diese zweite Annäherung an die Nanotechnologie biomimetisch. Feynmans Ansatz hat die „Top-down“-Methodik begründet,

für die das beste Beispiel heute Molekülarrangements sind, die mit dem Rasterkraftmikroskop hergestellt wurden.^[2] Im Unterschied dazu hat die biomimetische Nanotechnologie insofern „Bottom-up“-Charakter, als individuelle Komponenten dafür entworfen wurden, besondere Tertiärstrukturen einzunehmen, die sich letztlich selbst zu Quartärstrukturen und Netzwerken zusammenlagern.

Die Top-down-Nanotechnologie zeichnet sich in diesem Stadium durch ihre Eleganz und die Eigenschaft aus, mit Substanzen weitgehend willkürlicher Zusammensetzung umgehen zu können. Die entscheidende Einschränkung liegt im Fehlen von Parallelität: Nur eine kleine Zahl von Objekten kann in einem Arbeitsgang zusammengelagert werden. Der Bottom-up-Ansatz hat zwar einige Nachteile, aber auch den wesentlichen Vorteil enormer Parallelität; sogar chemische Reaktionen mit einem Picomol der Ausgangsverbindung liefern mehr als 100 Milliarden Kopien des Produkts. Bei der biomimetischen Nanotechnologie kann man gewöhnlich nicht die Rasterkraftmikroskopie einsetzen; als weitere Schwierigkeit kommt der Entwurf von Molekülen hinzu, die sich korrekt und zuverlässig in ihre gewünschten Formen falten. Wir verstehen diesen Designtyp am besten bei Systemen, die aus biologischen Makromolekülen bestehen. Damit ist die Zahl der Spezies stark eingeschränkt, und ihre Existenz ist hauptsächlich auf wäßrige Systeme beschränkt. Dennoch haben wir bessere Kontrolle über die Faltung von Nucleinsäuren und, in geringerem Ausmaß, von Proteinen, als über die der meisten anderen Polymere im Nano-Maßstab. Der Entwurf eines Proteins und die exakte Voraussage seiner Faltung bleiben die zentralen Herausforderungen auf diesem

[*] Prof. N. C. Seeman
Department of Chemistry
New York University
New York, NY 10003 (USA)
Fax: (1) 212-260-7905
E-mail: ned.seeman@nyu.edu

Gebiet, obwohl enorme Fortschritte dabei gemacht werden.^[3] Nucleinsäuren sind sehr viel einfacher, und daher haben wir eine bessere Kontrolle über ihre Faltung. Hier werden wir uns auf Nucleinsäure-Nanotechnologie und insbesondere die DNA-Nanotechnologie konzentrieren.

1.2. Schlüsselziele der DNA-Nanotechnologie

Es gibt viele mögliche Molekulanordnungen, die man mit DNA herstellen möchte. Die ursprüngliche Motivation für diese Bestrebungen war der Wunsch von Kristallographen, DNA in einer regelmäßigen Form anzutragen. Damit sollte ein Gerüst geschaffen werden, auf dem man andere Makromoleküle anordnen kann, die mit konventionellen Methoden nicht kristallisiert werden können.^[4] Eine logische Erweiterung dieser Strategie ist es, den gleichen Gerüsttyp zu benutzen, um darauf molekulare elektronische Komponenten aufzubringen und so dichtgepackte Speicher herzustellen.^[5] Keines dieser Ziele wurde bislang erreicht, doch wir werden hier die Fortschritte auf dem Weg dorthin beschreiben.

Wenn man an chemische Verbindungen denkt, die von DNA abgeleitet sind, liegt die Frage nahe, ob sie preiswerter durch biologische Reproduktion hergestellt werden können, entweder *in vivo* oder mit der Polymerasekettenreaktion (PCR), in der die DNA-Replikationsenzyme der Zelle effektiv genutzt werden.^[6] Aus Topologie-Betrachtungen lassen sich diese Methoden wahrscheinlich am effizientesten für die Synthese von DNA-Knoten einsetzen. Wir werden Arbeiten zu DNA-Knoten und anderen topologischen Zielstrukturen in Abschnitt 4 diskutieren.

Schließlich ist DNA ein Molekül, das bekanntermaßen große Strukturumwandlungen durchläuft. Diese Umwandlungen bieten die Möglichkeit, stabile DNA-Moleküle in nanomechanische Elemente zu überführen. Zwei wichtige Umwandlungen wurden untersucht, und aus beiden wurde eine nanomechanische Bewegung abgeleitet. Diese neuen Untersuchungen werden wir in Abschnitt 5 vorstellen.

2. DNA als Konstruktionsmaterial

2.1. DNA als Komponente für molekulares Design

DNA ist als genetisches Material aller Organismen gut bekannt. Tatsächlich ist ihre Doppelhelix-Struktur zu einem der kulturellen Symbole unserer Zivilisation geworden, so wie wir mit früheren Gesellschaften die Hängenden Gärten der Semiramis, den Koloß von Rhodos oder die Chinesische Mauer assoziieren. Die Hauptigkeit, die DNA so geeignet für ihre biologische Funktion macht, ist die Komplementarität, die zwischen den durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehaltenen Watson-Crick-Basenpaaren^[7] besteht: Adenin (A) paart mit Thymin (T), und Guanin (G) paart mit Cytosin (C). Diese klassischen Wechselwirkungen sind der Höhepunkt biologischer Erkennung: Unter dem Gesichtspunkt des molekularen Designs geht DNA die vorherrschenden und am einfachsten programmierbaren intermolekularen Wechselwirkungen aller Moleküle vergleichbarer Größenordnung ein.

Im allgemeinen ist es sehr schwierig, die bevorzugte Geometrie vorherzusagen, nach der zwei Makromoleküle assoziieren. Umfangreiche Rechnungen sind notwendig, um einen Satz möglicher günstiger geometrischer Wechselwirkungen zwischen zwei Molekülen abzuleiten. Für DNA jedoch reduzieren sich diese Schwierigkeiten auf die Paarungsregeln für die Basen. Zwei komplementäre Stränge werden unter geeigneten Bedingungen bevorzugt gegenüber allen anderen möglichen Wechselwirkungen eine Doppelhelix mit Watson-Crick-Basenpaaren bilden. Dieses Verhalten der DNA ist ein Vierteljahrhundert lang von den Biotechnologen genutzt worden. Zwei Moleküle mit überstehenden Sequenzabschnitten, die zueinander komplementär sind und daher als kohäsive Enden (sticky ends) bezeichnet werden, werden bevorzugt miteinander assoziieren. Diese Zusammenlagerung von DNA-Molekülen über Wasserstoffbrückenbindungen ist in Abbildung 1 dargestellt. Die lokale dreidimensionale Struktur der Region mit Basenpaarung

Nadrian C. Seeman, geboren 1945 in Chicago, erhielt 1966 seinen B.S. in Biochemie an der University of Chicago. 1970 promovierte er an der University of Pittsburgh zum Ph.D. über die Kristallisation biologischer Makromoleküle. Während seiner Postdoktorandendzeit am Massachusetts Institute of Technology und an der Columbia University forschte er über die Kristallisation von Nucleinsäuren. Danach ging er an die State University of New York in Albany und nahm eigene Forschungsarbeiten auf. Bei einem Besuch in der Campus-Kneipe aus Enttäuschung über ein mißlungenes Experiment zur Kristallisation von Makromolekülen erkannte er, daß die Isomorphie zwischen einem sechsarmigen verzweigten DNA-Verbindungselement und der periodischen Anordnung fliegender Fische in der Zeichnung „Depth“ von M. C. Escher zu einem zielgerichteten Vorgehen bei der Kristallisation und zur Kontrolle über Strukturen im Nanometermaßstab führen könnte. Dadurch wurde er zu Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der DNA-Nanotechnologie angeregt, die er in den vergangenen zehn Jahren an der New York University durchgeführt hat. Nadrian Seeman erhielt mehrere Stipendien und Preise wie den Science and Technology Award des Popular Science Magazine (1993), den Feynman Prize in Nanotechnology (1995) und den Emerging Technology Award des Discover Magazine (1997). 1998 wurde er zum Honorarprofessor der Universidad Peruana Cayetano Heredia ernannt. Weitere Informationen über seine Arbeitsgruppe sind im Internet unter <http://seemanlab4.chem.nyu.edu> zu finden.



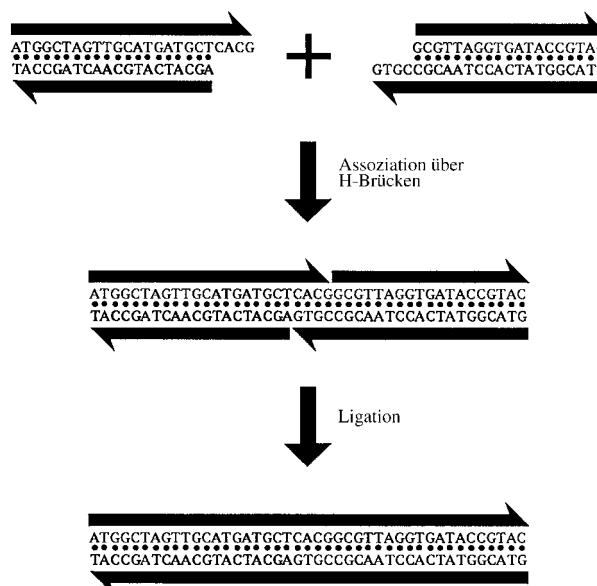


Abb. 1. Assoziation und Ligation über kohäsive Enden. Oben: zwei lineare doppelhelicale DNA-Moleküle. Die antiparallelen Rückgrate sind durch schwarze Linien symbolisiert, die in Pfeilen mit halber Spitze enden. Diese Halbpfeile zeigen die 5' → 3'-Richtungen der Rückgrate an. Das rechte Ende des linken Moleküls und das linke Ende des rechten Moleküls haben einsträngige überhängende Enden (kohäsive Enden), die zueinander komplementär sind. Mitte: Unter geeigneten Bedingungen binden die Stränge über Wasserstoffbrücken spezifisch aneinander. Unten: Durch die richtigen Enzyme und Cofaktoren können die Stränge kovalent miteinander verknüpft (ligiert) werden.

wird B-DNA genannt^[8] und ist die übliche Struktur, die die DNA in Lösung einnimmt. So kann nicht nur die bevorzugte Affinität zwischen DNA-Molekülen programmiert und vorhergesagt werden, sondern auch die lokale Struktur des intermolekularen Komplexes. Abbildung 1 verdeutlicht auch, daß es möglich ist, die beiden Moleküle mit dem Enzym DNA-Ligase miteinander zu verbinden, das die Bildung von Phosphodiesterbindungen im Rückgrat der DNA katalysiert.^[9]

Außer der Einfachheit, mit der ihre Wechselwirkungen gesteuert werden können, hat DNA als Material für Nanostrukturen noch andere Vorteile. Die Anforderungen der Biotechnologie führen zur Entwicklung einer äußerst bequemen, automatisierten Phosphoramidit-Chemie für die Synthese beliebiger Sequenzen.^[10] Außerdem sind viele exotische Phosphoramidite käuflich, was die Derivatisierung, Detektion, Analyse und Reinigung synthetischer DNA-Moleküle vereinfacht. Es ist auch leicht, DNA zu manipulieren, denn es gibt eine große Auswahl an käuflichen DNA-modifizierenden Enzymen. Dazu gehören Restriktionsenzyme, die DNA an spezifischen Sequenzabschnitten spalten, Ligasen, die DNA-Enden verbinden, Exonuclease, die lineare, nicht aber zyklische Stränge abbauen, oder Topoisomerasen, die Operationen katalysieren, bei denen Stränge ineinander vorbeigeführt werden. DNA enthält auch einen externen Code,^[11] der von Proteinen gelesen werden kann. Außerdem ist DNA als Polymer chemisch stabil^[12] und relativ starr und hat unter normalen Bedingungen eine Länge von ca. 500 Å (ca. 150 Basenpaare).^[13] All diese Vorteile sprechen sehr dafür, mit einem natürlichen DNA-Rückgrat zu arbeiten.

statt mit unnatürlichen Derivaten,^[14] die keine Substrate für modifizierende Enzyme sind. Die Schwierigkeiten, die wir bei einem Projekt mit RNA-Molekülen hatten,^[15] bestärkten uns in unserer Bevorzugung von DNA.

2.2. DNA-Verzweigungen

An dieser Stelle mag der Leser denken, daß es vielleicht ganz einfach sei, DNA-Moleküle über kohäsive Enden aneinanderzufügen, doch zu welchem Zweck? Ein langes DNA-Polymer hat offensichtlichen biologischen Nutzen, aber welche möglichen chemischen Anwendungen hat es? Die Antwort findet sich in einem der komplexen Prozesse der Biologie, der genetischen Rekombination. Der grundlegende molekulare Vorgang bei der Rekombination ist die Wechselwirkung von zwei DNA-Stücken in der Weise, daß neues genetisches Material entsteht. Das entscheidende Zwischenprodukt bei der Rekombination ist die Holliday-Junction,^[16] in der vier miteinander verbundene Doppelhelices um einen Verzweigungspunkt herum angeordnet sind. Die Sequenz, die den Verzweigungspunkt einer Holliday-Junction flankiert, weist eine zweifache Symmetrie auf. Dies ermöglicht die Wanderung des Verzweigungspunktes innerhalb des Symmetriebereichs durch eine Isomerisierung, die als „branch migration“ bezeichnet wird.^[17] Zum Glück ist es möglich, synthetische Sequenzen zu entwerfen, denen diese Symmetrie fehlt; so kann man verzweigte Moleküle, die als Verbindungselemente (junctions) bezeichnet werden, mit fixierten Verzweigungsstellen herstellen.^[4]

Die Möglichkeit, DNA-Moleküle mit verzweigten Strukturen gezielt zu synthetisieren, erweitert die Strukturchemie der DNA um ein neues geometrisches Element, die Ecke. Die Helixachsen linearer DNA-Moleküle sind Liniensegmenten in der Geometrie äquivalent. Fügt man sie wie in Abbildung 1 gezeigt zusammen, erhält man längere Linien oder Ringe, vielleicht sogar Knoten und Catenane. Bezieht man jedoch die Ecken mit in die verfügbaren Komponenten ein, werden auch Objekte und Netzwerke^[18] potentielle Zielstrukturen. Diese werden oft als *N*-verbundene Spezies beschrieben,^[18] wobei *N* die Zahl der Kanten bedeutet, die in einer Ecke zusammenlaufen. Die Objekte sind aus Stäben aufgebaute Körper, deren Kanten aus doppelhelicaler DNA bestehen und deren Ecken den Verzweigungsstellen der Verbindungselemente entsprechen. Dieses Konzept ist in Abbildung 2 dargestellt, in der vier vierarmige Verbindungselemente zu einem Viereck zusammengefügt werden. Sie enthalten je vier

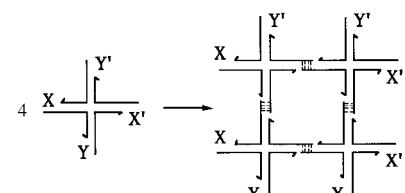


Abb. 2. Bildung eines 2D-Gitters aus einem immobilisierten Verbindungselement mit kohäsiven Enden. X und Y sind kohäsive Enden, X' und Y' sind jeweils zu ihnen komplementär. Die Lücken können von der DNA-Ligase geschlossen werden.

kohäsive Enden: X und das dazu komplementäre X', Y und das dazu komplementäre Y'. Jedes der vier Verbindungselemente bindet über diese kohäsiven Enden an seine Nachbarmoleküle. Außerdem gibt es an den Außenseiten des Vierecks weitere kohäsive Enden, so daß man sich eine unbegrenzte Ausdehnung des Vierecks vorstellen kann, mit der die Ebene „geplastert“ wird.

Wie entwirft man nun DNA-Sequenzen, die sich zu stabilen verzweigten Molekülen zusammenlagern? Die grundlegende Annahme dabei ist, daß unter normalen Bedingungen die lineare Doppelhelix die bevorzugte Struktur der DNA ist.^[4, 19] Bringt man eine Verzweigung in die DNA ein, so muß man dafür Energie aufwenden.^[20] Eine Verzweigung kann sich allerdings dann bilden, wenn die Bildung einer Doppelhelix den Energieaufwand für die Verzweigung aufwieg. Unsere Umsetzung dieses Konzepts ist in Abbildung 3 verdeutlicht. Um eine Wanderung der Verzweigung zu verhindern,^[17] müssen wir zunächst sicherstellen, daß der Ver-

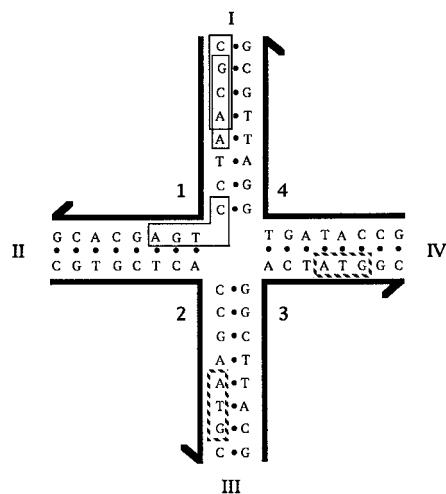


Abb. 3. Ein stabiles DNA-Verbindungselement, das aus vier DNA-Strängen (1–4) besteht. Die Arme des Verbindungselementes sind mit I–IV bezeichnet. Das 3'-Ende jedes Strangs ist durch einen Halbpfeil symbolisiert. Jeder Strang ist mit zwei anderen Strängen zu einem doppelhelicalen Arm gepaart. Es gibt keinen Bereich mit homologer zweifacher Symmetrie in der Sequenz, die den zentralen Verzweigungspunkt flankiert, wodurch dessen Position stabilisiert wird. Tetramere Elemente sind mit durchgezogenen, trimere Elemente mit gestrichelten Linien umrahmt.

zweigungspunkt nicht von einer Sequenz mit zweifacher Symmetrie flankiert wird. Außerdem teilen wir die Sequenz jedes Strangs in eine Serie überlappender Elemente auf. Die gezeigten Elemente sind Tetramere, so daß jeder hexadekamere Strang als Satz von 13 überlappenden Tetrameren behandelt wird. Dabei darf keines dieser Tetramere einem anderen gleichen. Die ersten beiden Tetramere in Strang 1 sind umrahmt (CGCA und GCAA). Außerdem schließen wir Sequenzen aus, die zu denen von Elementen komplementär sind, die in einer Biegung zu liegen kommen: So gibt es kein Element mit der Sequenz TCAG, weil es komplementär zum Tetramer CGAT im Knick von Strang 1 ist. Dadurch können nur Strukturen mit der gewünschten Duplex-Struktur (Arme aus zwei Oktameren, die über Basenpaarungen verbunden sind) konkurrieren, die auf der Basenpaarung von trimeren

Elementen (wie dem gestrichelt umrahmten ATG) beruhen. Prinzipiell könnten diese ATG-Sequenzen zwar mit dem falschen CAT-Element eine Basenpaarung eingehen, doch tritt ein solches Problem in der Praxis nicht auf. Mit dem gewählten Algorithmus lassen sich also die gewünschten Sekundärstrukturen effektiv bilden.

Mit Tetrameren läßt sich ein Vokabular aus 240 nicht-selbstkomplementären Sequenzen (4^4 mögliche minus 16 selbstkomplementäre Sequenzen) erstellen, von denen 52 Elemente ausgewählt werden können, um die beschriebenen Bedingungen zu erfüllen. Bei der Verwendung von trimeren Elementen käme es nur zur Konkurrenz mit Dimeren, doch gäbe es dann nur ein Vokabular aus 64 Elementen (4^3), aus denen die für die Strukturbildung benötigten 56 Elemente gewählt werden müßten, was schwierig wäre. Es ist offensichtlich, daß man für größere Strukturen längere Elemente (der Länge N) verwenden muß. Wenn die Arme des verzweigten Verbindungselements nicht deutlich länger werden, kann die Konkurrenz durch $(N-1)$ mere von Bedeutung sein, z.B. durch Pentamere, wenn hexamere Elemente ($N=6$) verwendet werden. Auch wenn wir es nicht getan haben, kann es nützlich sein, $(2N-1)$ mere auf identische Sequenzabschnitte zu überprüfen: Bei tetrameren Elementen würde der Algorithmus die Ähnlichkeit zwischen ATTGCA und ATTAGCA (6 von 7 Nucleotiden) nicht erfassen. In der Praxis muß man oft Sequenzen in das Zielmolekül einbauen, die diese Regeln verletzen. Beispielsweise sind die Sequenzen der Schnittstellen für Restriktionsenzyme oft symmetrisch. Im allgemeinen bauen wir diese Stellen zuerst ein und konstruieren dann den Rest der Sequenz um sie herum.

Die Zahl der Arme in einem verzweigten DNA-Molekül ist nicht auf vier beschränkt. Wir haben Verbindungselemente synthetisiert, die drei,^[21] fünf und sechs^[22] Arme enthalten. Es gibt keine klare Obergrenze für die Zahl der Arme, die einen Verzweigungspunkt flankieren können.^[23] Je mehr Arme allerdings eingebaut werden, desto länger müssen sie sein, um den Verzweigungspunkt zu stabilisieren.^[22] Ein Grund dafür könnte die Anhäufung negativer Ladungen im Bereich des Verzweigungspunkts sein. Die Zahl der Arme, die einen Verzweigungspunkt flankieren, bestimmt die maximale Konnektivität der Objekte oder der Netzwerke, die daraus konstruiert werden können. Beispielsweise läßt sich aus dreiarmigen Verbindungselementen ein Würfel aufbauen, während für einen Oktaeder vierarmige, für einen Ikosaeder fünfarmige und für ein einfaches kubisches Gitter sechzehnarmige Verbindungselemente benötigt werden.

2.3. Die Topologie von DNA-Konstruktionen

Aufgrund der Tatsache, daß die DNA eine Doppelhelix- und keine Leiter-Struktur hat, ist es kompliziert, sich das Molekül vorzustellen, was aber kein ernsthaftes Hindernis ist, um damit zu arbeiten. Die Unterschiede zwischen Helix und Leiter bieten jedoch Zugang zu einigen Zielstrukturen, die für die DNA andernfalls nicht besonders geeignet wären. Dennoch müssen die aus der Topologie resultierenden Konsequenzen beim experimentellen Design berücksichtigt werden. In Abbildung 4 sind zwei mögliche Anordnungen für das

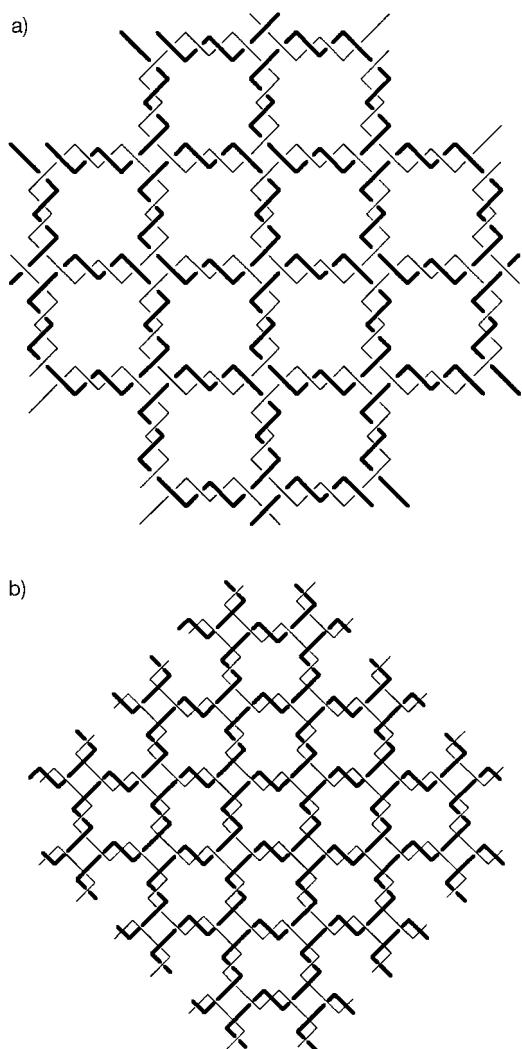


Abb. 4. Topologische Konsequenzen der Ligation von DNA-Molekülen, die in jeder Kante eine gerade oder eine ungerade Zahl von halben DNA-Windungen aufweisen. Die Strukturen haben das gleiche Verknüpfungsmuster wie in Abbildung 2, wobei sie die plectonemische (doppelhelicale) Verdrillung der DNA und ihre Konsequenzen verdeutlichen. Die DNA ist als eine Serie von rechtwinkligen Knicken gezeichnet. a) Jede Kante eines Quadrats besteht aus zwei Windungen der DNA-Doppelhelix. Stränge mit Basenpaarung sind mit abwechselnd dicken und dünnen Linien dargestellt. b) Jede Kante eines Quadrats besteht aus 1.5 Windungen der DNA-Doppelhelix.

Molekül aus Abbildung 2 gezeigt. In Abbildung 4a sind die Verzweigungspunkte der Verbindungselemente durch genau zwei DNA-Windungen voneinander getrennt. Die resultierenden Einzelstränge bilden eine Serie von zyklischen Molekülen, die in einer Art molekularem Kettenhemd miteinander verbunden sind. Solche zyklischen Moleküle, die durch topologische Verbindungen zusammengehalten werden, nennt man Catenane. Das Netz in Abbildung 4b ist nach einem ähnlichen Muster zusammengesetzt, doch sind hier die Ecken nur durch 1.5 DNA-Windungen voneinander getrennt. Die Einzelstränge bilden dadurch keine Ringe, sondern gleichen einem aus Kett- und Schußfäden gewobenem Netzwerk.

Der Unterschied zwischen ganz- und halbzahligen Vielfachen einer Windung als Abstand zwischen den Verbindungs-

elementen taucht regelmäßig bei der Planung von DNA-Objekten auf. In gewissem Sinn ist die halbe Windung der Doppelhelix die Elementareinheit der Topologie einzelsträngiger DNA. Sie entspricht einer Überkreuzung oder einem Knotenpunkt in einem DNA-Catenan oder -Knoten.^[*] Weiter unten wird gezeigt, daß die Äquivalenz zwischen einer halben Windung der Doppelhelix und einem Einheitsknoten sehr hilfreich bei der Konstruktion topologischer Zielstrukturen sein kann. Es scheint möglich, dreidimensionale Moleküle zu entwerfen, deren Ecken durch nicht-ganzzahlige Anzahlen von Windungen getrennt sind.^[25, 26]

2.4. Flexibilität verzweigter DNA-Verbindungselemente

Die Anordnung in Abbildung 2 basiert auf zwei Annahmen: der Kohäsion zwischen den komplementären Enden und der Starrheit der verzweigten DNA-Verbindungselemente. Abbildung 5 macht deutlich, daß ein variabler Winkel

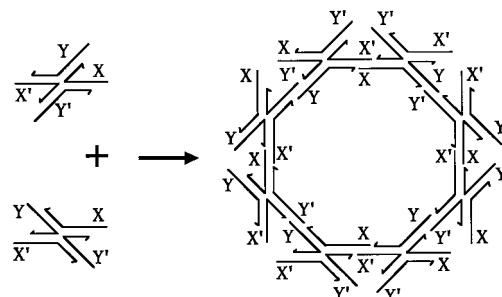


Abb. 5. Konsequenzen variabler Winkel zwischen den Armen eines Verbindungselementes. Das Verknüpfungsmuster entspricht dem in Abbildung 2 gezeigten, aber die Winkel zwischen den Armen sind variabel. Gezeigt ist ein zyklischer Komplex aus acht Molekülen; jeder Komplex aus $4N$ Elementen könnte in diesem System zyklisch sein.

zwischen den Armen zu einem anderen Produkt führen kann: Dieselben kohäsen Enden können hier in zwei Konformationen vorliegen; wenn diese sich im Kreis herum abwechseln, ergibt sich ein oktagonaler Körper. Leider sind die Winkel zwischen den Armen der Verbindungselemente nicht fixiert. Wir haben durch Ligationsexperimente untersucht, wie starr die dreiarmigen^[21] und vierarmigen^[27] Verbindungselemente sowie die dreiarmigen Verbindungselemente mit Ausbuchten^[28] sind. Ein typisches Experiment mit einem dreiarmigen Verbindungselement ist in Abbildung 6 gezeigt. Das Verbindungselement enthält zwei komplementäre kohäsive Enden, die phosphoryliert werden, damit sie ligiert werden können. Das stumpfe Ende kann nicht an der Reaktion teilnehmen, weil es keine Phosphatgruppe trägt. Durch diesen Aufbau des Verbindungselementes ist sichergestellt, daß ein „Reporterstrang“ entsteht. Dies ist ein Einzelstrang, aus

[*] Ein Knotenpunkt („node“ oder „unit tangle“^[24]) ist die Stelle, an der sich zwei Stränge überkreuzen; dies wird sichtbar, wenn die Struktur auf eine Ebene projiziert wird. Ein Knoten („knot“) ist ein geschlossenes zyklisches Moleköl, das Knotenpunkte enthält, die nicht aufgelöst werden können, ohne kovalente Bindungen zu brechen

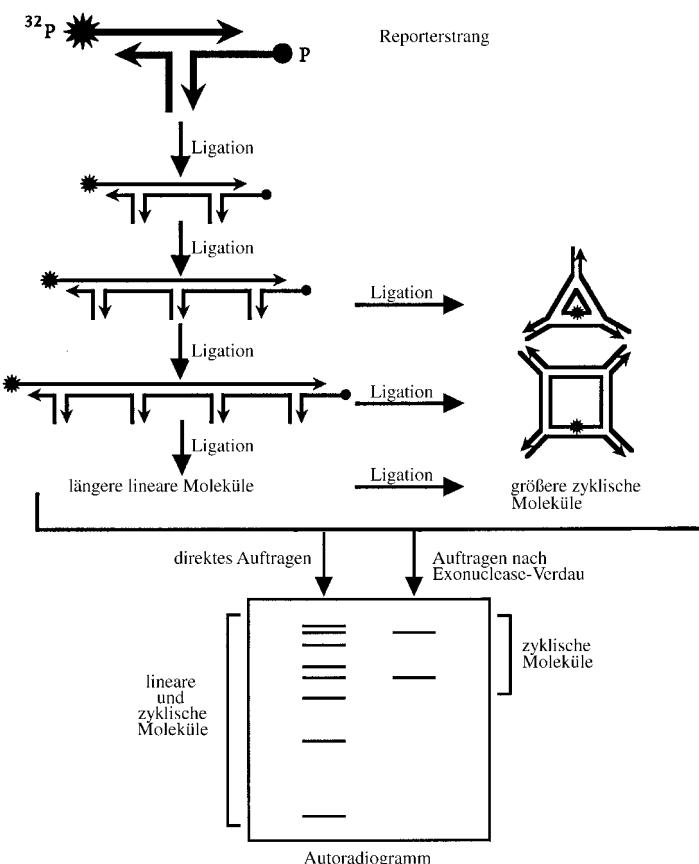


Abb. 6. Der experimentelle Aufbau des Ligations-Assays. Das dreiarmige Verbindungselement, das bei allen Experimenten benutzt wurde, ist in der linken oberen Ecke gezeigt. Die 3'-Enden seiner Stränge sind durch Pfeilspitzen symbolisiert. Das 5'-Ende des oberen Strangs enthält eine radioaktiv markierte Phosphatgruppe (Stern) und das 5'-Ende des rechten unteren Strangs eine nichtmarkierte Phosphatgruppe (ausgefüllter Kreis). Das 5'-Ende des dritten, linken unteren Strangs ist nicht phosphoryliert und steht nicht über, so daß insgesamt ein stumpfes Ende (blunt end) resultiert. Darunter sind die ersten Produkte der Ligation gezeigt, das lineare Dimer, das lineare Trimer und das lineare Tetramer. Auf der rechten Seite sind die ersten zyklischen Produkte dargestellt, das zyklische Trimer und das zyklische Tetramer. Die stumpfen Enden bilden die exozyklischen Arme dieser zyklischen Moleküle. Es ist bemerkenswert, daß der radioaktiv markierte Strang in jedem Fall die gleichen Charakteristika aufweist wie der gesamte Komplex: Er ist ein Oligomer derselben Multiplizität und desselben Cyclisierungssgrades wie der Komplex, weswegen er als Reporterstrang bezeichnet wird. Die Analyse der Reaktionsprodukte ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt (Einzelheiten siehe Text).

dessen Zustand sich der des Komplexes ablesen läßt; seine Größe und seine lineare oder zyklische Form können einfach durch Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen bestimmt werden. Der Reporterstrang in Abbildung 6 ist mit einer radioaktiven Phosphatgruppe markiert. Wenn zwei oder mehr Verbindungselemente ligiert werden, wächst der Reporterstrang entsprechend. Wenn der Komplex zyklisch ist, ist dies auch der Reporterstrang (Abb. 6, rechts). Nach der Ligation werden die Produkte in einem denaturierenden Gel getrennt und autoradiographisch detektiert. In der linken Spur wurden die Reaktionsprodukte direkt auf das Gel aufgetragen; man erkennt lineare und zyklische Reporterstrände. Werden die Produkte allerdings zuerst mit Exonucleasen behandelt (rechte Spur), bleiben nur die zyklischen

Produkte zurück, weil sie gegenüber dem enzymatischen Abbau beständig sind. Unglücklicherweise führen alle einfachen verzweigten Verbindungselemente, die untersucht wurden, zu einer Vielzahl zyklischer Produkte, was darauf hindeutet, daß sie variable Winkel enthalten. Weiter unten werden wir ein starres DNA-System beschreiben, doch das Hauptproblem bei der Kontrolle der Zusammenlagerung von DNA-Objekten und -Netzwerken bleibt die Flexibilität der Winkel zwischen den Armen der verzweigten Verbindungselemente. Wegen dieser Flexibilität ist lediglich eine topologische Kontrolle über die Produkte möglich, nicht aber eine geometrische Kontrolle; dementsprechend sind Nachweise für eine erfolgreiche Synthese topologischer Natur und keine geometrischen Charakterisierungen.

2.5. Charakterisierung ungewöhnlicher DNA-Motive und -Strukturen

Das verzweigte DNA-Verbindungselement ist das erste von einigen ungewöhnlichen DNA-Motiven, die wir hier besprechen werden. Von großer Bedeutung sind dabei die Methoden, die zur Bestimmung der Struktureigenschaften verwendet werden. Konventionelle physikalische Methoden, die normalerweise von Chemikern angewandt werden, z.B. die NMR-Spektroskopie, haben erst vor kurzem interessante Informationen über diese Moleküle geliefert,^[29] und keine dieser Spezies konnte bislang kristallisiert werden. Im allgemeinen charakterisieren wir ein neues Motiv zuerst durch eine Elektrophorese in einem nichtdenaturierenden Gel um festzustellen, ob der Komplex einheitlich gebildet wird und eine entsprechende relative Molekulmasse hat. In nichtdenaturierenden Gelen hängt die Wanderungsgeschwindigkeit eines wasserstoffverbrückten Komplexes von dessen relativer Molekulmasse sowie von Faktoren ab, die mit der Sekundärstruktur des Komplexes, z.B. mit der Größe seiner Oberfläche, zusammenhängen. Banden, die im Gel unterhalb der des apparenten Monomers liegen, deuten auf die Instabilität des Komplexes hin^[22] und Banden oberhalb der Monomer-Bande auf Spannungen im Komplex, die durch die Bildung von Oligomeren verringert werden können.^[30-32] Diskrete Banden deuten auf einen geschlossenen Komplex hin (z.B. bildet bei Verbindungselementen mit vierarmiger Verzweigung Molekül 1 eine Wasserstoffbrückenbindung mit Molekül 2, 2 mit 3, 3 mit 4 und 4 wiederum mit 1). Verbreiterte Banden dagegen können auf einen offenen Komplex ohne diskreten Abschluß hinweisen (1-2-3-4-1-2-3...). Die stöchiometrische Zusammensetzung eines Komplexes wird bestimmt, indem jeder Strang gegen die anderen titriert wird.^[33] Über ein Ferguson-Diagramm^[34] wird die Reibungskonstante des Komplexes und die Abhängigkeit seiner elektrophoretischen Mobilität von der Gelkonzentration bestimmt. Anhand von thermischen Denaturierungsprofilen läßt sich die Stabilität des Komplexes abschätzen.

Die wichtigste Methode zur Strukturaufklärung dieser Komplexe ist das Autofootprinting mit $[Fe^{2+}EDTA]^{2-}$ ^[35] (EDTA = Ethylenediamintetraacetat). Dabei wird das Muster der chemischen Spaltung der DNA durch Hydroxylradikale, die durch das Reagens gebildet werden, sichtbar gemacht.

Der Schlüssel zur Analyse liegt darin, daß ein radioaktiv markierter Strang zunächst mit seinem nach den Watson-Crick-Regeln komplementären Strang und dann in einem gesonderten Experiment mit den anderen Strängen des Komplexes zu einem Duplex komplexiert wird. Man nimmt an, daß Stränge, deren Bandenmuster im Gel nach der Spaltung bei beiden Experimenten gleich ist, eine doppelhelicale Konformation haben. Nucleotide, die Überkreuzungsbereiche („crossovers“) von Helices flankieren, weisen ein charakteristisches Bandenmuster im Gel auf, das den Schutz vor Spaltung anzeigt. Außer auf verzweigte Verbindungselemente (junctions) wurde diese Art der Analyse auch auf Antijunctions,^[31, 32] Mesojunctions^[31, 32] und Doppel-cross-over-Moleküle angewendet.^[30]

Die komplexeren der hier diskutierten Systeme, ein DNA-Würfel, ein DNA-Oktaederstumpf, Knoten und borromäische Ringe, werden mit denaturierenden Gelen analysiert. Bei diesem System werden Moleküle gleicher Topologie aufgrund ihrer relativen Molekülmasse getrennt; Sekundärstrukturen werden unter denaturierenden Bedingungen zerstört. Verknotete Moleküle werden mit zyklischen Referenzverbindungen verglichen, um ihre Verknüpfungen zu charakterisieren: Je enger ein Strang verknotet ist, desto schneller wandert er durch das Gel. Alle Spezies enthalten Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen. Bei Knoten ist die Beständigkeit gegen Nucleaseabbau einer der Nachweise, daß sich eine Domäne in der Z-Konformation befindet und daher positive Knotenpunkte enthält (siehe unten). Catenan-artige Moleküle werden zu bestimmten grundlegenden Catenan-Typen oder zu Ringen abgebaut, für die unabhängige Referenzverbindungen synthetisiert werden können. Mit der denaturierenden Gelelektrophorese können auch feine topologische Unterschiede erfaßt werden: Zwei Komplexe, die sich nur in der Zahl ihrer Verknüpfungen unterscheiden, werden eindeutig getrennt;^[36] analog lassen sich auch ein lineares und ein zyklisches Catenan derselben relativen Molekülmasse trennen.^[37]

3. Die Konstruktion von DNA-Objekten und DNA-Gittern

3.1. Polyeder und Festphasensynthese

Die Flexibilität von verzweigten DNA-Verbindungselementen ist ein großer Nachteil, wenn es nur ein einziges komplementäres Paar kohäsiver Enden gibt (siehe Abb. 6). Ein finites Polygon oder ein Stabpolyeder dagegen können mit spezifischen Sätzen singulärer kohäsiver Enden hergestellt werden. Will man beispielsweise ein Viereck herstellen, gelangt man mit einem Satz kohäsiver Enden ($\{A, A'\}, \{B, B'\}, \{C, C'\}$ und $\{D, D'\}$) nur zu Vierecken oder deren Vielfachen (Achtecken, Zwölfecken usw.). Wenn die hierfür entworfene Struktur günstig und seine Konzentration in der Lösung geeignet ist, wird sich das zyklische Tetramer intramolekular schließen, bevor größere Ringe gebildet werden. Bei unserem ersten Versuch, ein bestimmtes Zielmolekül herzustellen, erhielten wir ein Viereck, das einfach von den übrigen, nicht erwünschten Reaktionsprodukten getrennt werden konnte.^[38]

Der erste ernsthafte Test für dieses System war die Konstruktion eines Moleküls, dessen Helixachsen die Konnektivität eines Würfels aufweisen;^[39] seine Struktur ist in Abbildung 7 gezeigt. Jede Kante besteht aus zwei Windungen doppelhelicaler DNA. Wie bei einem quadratischen zweidimensionalen Gitter führt eine ganzzahlige Zahl von Windungen pro Kante zu zyklischen Strängen. Jede Fläche entspricht einem zyklischen Strang, der zweimal mit jedem seiner vier Nachbarn verknüpft ist, so daß dieses Objekt einem DNA-Hexacatenan entspricht. Hätten wir eine ungerade Zahl von Strängen verwendet, wäre das Molekül ein Tetracatenan, entsprechend den Projektionen entlang den Raumdiagonalen. Um die Synthese nachweisen zu können, enthält jede Kante eine singuläre Restriktionschnittstelle.

Die Synthese ist in Abbildung 8 gezeigt. Zwei Quadrate wurden zu einem leiterähnlichen Zwischenprodukt kombiniert. Eine grundlegende Lehre, die wir aus diesem Ansatz zogen, war die, daß es nicht möglich ist, unter nichtdenaturierenden Bedingungen Nebenprodukte abzutrennen. Daher mußten wir den Komplex denaturieren und vor der abschließenden Ligation rekonstituieren. Das denaturierte Zwischen-

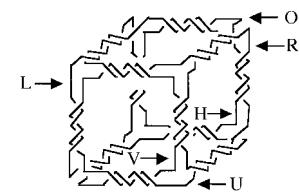


Abb. 7. Ein DNA-Molekül, dessen Helixachsen die Konnektivität eines Würfels aufweisen. Das Molekül besteht aus sechs zyklischen Strängen, die miteinander zu einem Catenan verknüpft sind. Sie sind nach ihrer Position bezeichnet: O, oben; U, unten; V, vorn; H, hinten; L, links; R, rechts. Jede Kante besteht aus 20 DNA-Basenpaaren, so daß wir ihre Länge auf ca. 68 Å schätzen. Aus einem Molekülmodell haben wir abgeleitet, daß der Abstand zweier diagonal gegenüberliegender Achsen einer Würfelfläche ca. 100 Å und das Volumen des Würfels in der gezeigten Konfiguration ca. 1760 nm³ beträgt.

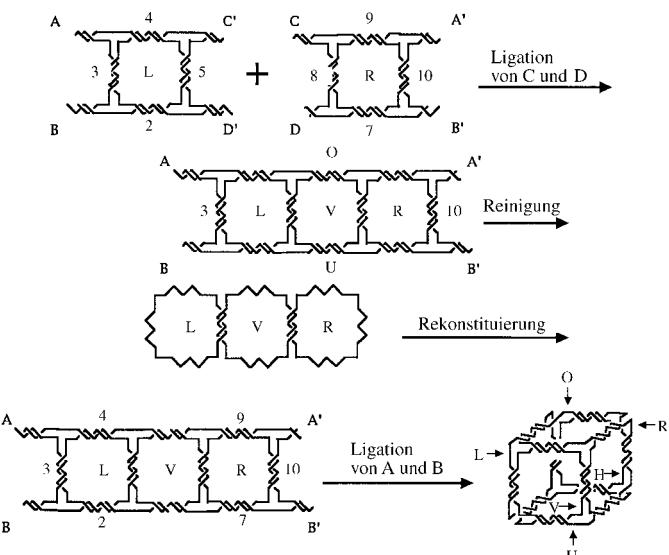


Abb. 8. Synthese eines DNA-Würfels. Das Molekül wird aus 10 chemisch synthetisierten Strängen aufgebaut, zwei 80meren und acht Strängen mit je etwa 40 Nucleotiden. Diese werden im ersten Schritt zu zwei Vierecken hybridisiert. Die beiden Enden C und D werden zu einem gurtähnlichen Molekül ligiert, das zur Abtrennung von Nebenprodukten denaturiert und rekonstituiert werden muß. Anschließend wird das Molekül zum Würfel zyklisiert.

produkt war das lineare [3]Catenan, aus dem die linke (L), vordere (V) und rechte Seite (R) des Würfels entstehen sollten. Einer der aussagekräftigsten Beweise für unsere Synthese war die Spaltung der zwei Kanten, die auch in dem L-V-R-Catenan enthalten sind, unter Bildung des linearen [3]Catenans O-H-U aus der oberen (O), hinteren (H) und unteren Fläche (U) des Würfels. Durch eine Spaltung zur Freisetzung des O- und des U-Strangs ließ sich zeigen, daß das Zielmolekül das tetragonale Prisma ist und nicht ein oktaagonales oder höheres Prisma mit $4N$ Flächen.

Die Synthese des Würfels war ein Meilenstein und eine Enttäuschung zugleich. Er war das erste DNA-Objekt der Konnektivität 3, doch der Denaturierungs-/Rekonstitutionsschritt stand der Idee entgegen, die Kanten gezielt über die Spezifität kohäsiver DNA-Enden zu synthetisieren. Um den ursprünglichen Ansatz wieder aufzunehmen, entwickelten wir eine Festphasensynthese, die sich an derjenigen für Oligonucleotide orientierte.^[10]

Der Hauptvorteil der Festphasensynthese^[39] besteht darin, daß die wachsenden Moleküle auf dem Träger voneinander getrennt werden können, so daß die Einfachheit und Spezifität der Ligation kohäsiver Enden nicht durch die Gegenwart vieler Kopien desselben Moleküls in Lösung gefährdet werden. Die Methode ermöglicht außerdem die gleichzeitige Synthese von individuellen Kanten. Eine Kontrolle erfolgt dabei durch die Restriktionsspaltung von Haarnadelschleifen, die sich an jedem Ende der neuen Kante bilden. Damit wird ein Hauptproblem beim Aufbau des Würfels gelöst, bei dem eine doppelte Ligation im ersten Schritt zu unerwünschten Produkten führt. Diese Strategie ermöglicht auch die getrennte Durchführung von Schritten wie der Addition und der Cyclisierung, die unter verschiedenen Bedingungen optimiert wurden. In jedem Zyklus dieses Prozesses entsteht ein Objekt, das kovalent geschlossen und topologisch mit sich selbst verknüpft ist, so daß eine teilweise Reinigung am Träger stattfinden kann. Wie bei anderen Festphasensynthesen können auch bei dieser Methode Reagentien und Katalysatoren bequem vom wachsenden Produkt abgetrennt werden.

Die Synthesen sind so gestaltet, daß das Paar von Restriktionsschnittstellen, an denen nach der Spaltung kohäsive Enden entstehen, unterschiedliche flankierende Sequenzen hat. Dadurch enthält die fertig zusammengefügte Kante für keines der benutzten Enzyme eine Schnittstelle und kann nicht durch sie abgebaut werden. Ein typisches Paar von Schnittstellen ist

z.B. *Xho*I (C|TCGAG) und *Sal*I (G|TCGAC) (kohäsive Enden durch Fettdruck hervorgehoben). Die resultierende Sequenz wäre CTCGAC (gepaart mit GTCGAG), die gegenüber beiden Enzymen, die vielleicht in Spuren in der Lösung enthalten sein könnten, unempfindlich ist. Für Analysezwecke kann diese Sequenz aber von *Taq*I (TCGA) gespalten werden. Für intramolekulare Ligationsen an fester Phase kann man symmetrische Schnittstellen verwenden, in Lösung sollte man darauf jedoch verzichten, weil man dort nicht kontrollieren kann, ob die Produkte intramolekular oder intermolekular gebildet werden. Prinzipiell sind die besten Enzyme für intermolekulare Ligationsen solche, die asymmetrische kohäsive Enden erzeugen. Diese entstehen durch Restriktionsenzyme, die unterbrochene Erkennungssequenzen haben wie *Bgl*I (GCCnNNN|nGGC), oder durch solche, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden wie *Bbs*I, das 5'NNNNnnGTCTTC als kohäsives Ende zurückläßt. Dabei bezeichnet N ein beliebiges Nucleotid, das Teil des kohäsiven Endes wird, und n ein Nucleotid, dessen Position, nicht aber seine Identität Teil der Erkennungssequenz ist. In der Praxis sind diese Enzyme jedoch oft weniger effektiv und teurer als die Enzyme mit symmetrischer Erkennungssequenz.

In Abbildung 9 ist die Synthese eines Quadrats dargestellt: Ein dreiarmiges verzweigtes Verbindungselement, dessen Arme in Haarnadelschleifen enden, ist an den festen Träger gebunden. An einem der Arme wird durch Restriktionsspaltung ein kohäsives Ende erzeugt. Dieses Moleköl wird mit einem zweiten dreiarmigen Verbindungselement ligiert, das aus zwei Haarnadelschleifen und einem Arm mit dem komplementären kohäsiven Ende besteht. Dieser Prozess wird wiederholt, bis die gewünschte Vorstufe eines Quadrats vorliegt. Es folgt eine abschließende doppelte Restriktionsspaltung und eine intramolekulare Cyclisierung zum quadrat-

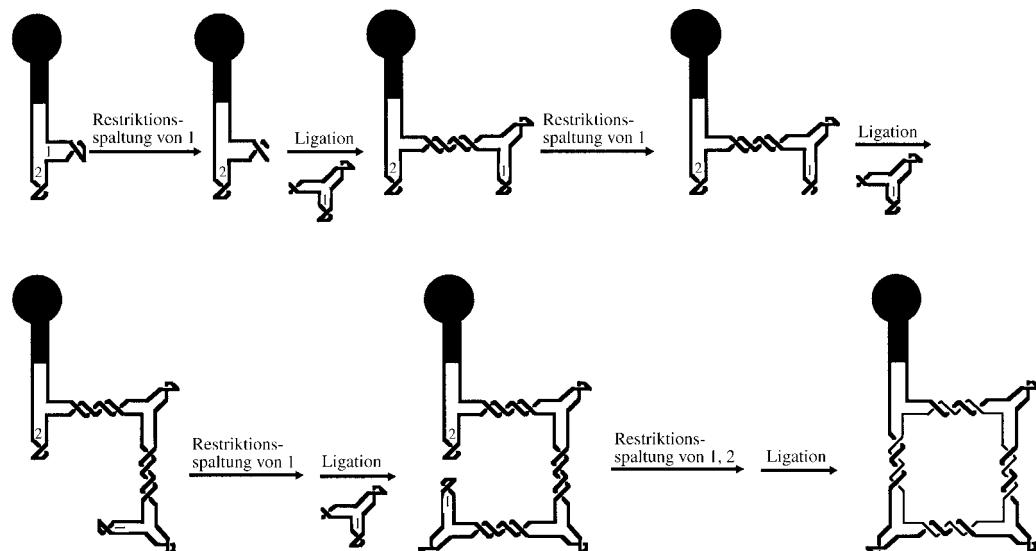


Abb. 9. Synthese eines Vierecks. Zu Beginn befindet sich ein geschlossenes Verbindungselement an der Festphase, das durch abwechselnde Zyklen aus Restriktionsspaltung und Ligation immer an Position 1 verlängert wird. Die Auswahl des gewünschten Produkts (Drei-, Vier-, Fünfeck...) geschieht in dem Augenblick, in dem durch Restriktionsspaltung an Position 2 ein kohäsives Ende freigelegt wird, das komplementär zu dem ist, das durch Restriktionsspaltung an Position 1 erhalten wird. Dies entspricht einem Strangtausch unter Entfernung eines Null-Knotenpunkts (siehe Abb. 14). Dies wird durch die unterschiedliche Linienbreite verdeutlicht, mit der die Stränge des „quadratischen“ Catenans gezeichnet sind.

förmigen Molekül. Dieses wird vom Träger abgespalten und durch Verknüpfen mit einer Haarnadelschleife geschlossen.

Um diese Methode zu testen und zu verfeinern, haben wir einen Oktaederstumpf aus DNA konstruiert.^[40] Dieser archimedische Körper enthält sechs Quadrate, die um die vierzähligen Symmetriechsen angeordnet sind, und acht Sechsecke, die um die dreizähligen Symmetriechsen angeordnet sind. Wie beim Würfel gibt es zwei DNA-Windungen pro Kante, so daß jede der 14 Seiten einem einzelnen zyklischen Strang entspricht und sich als Zielobjekt ein [14]Catenan ergibt. Jede Ecke des Oktaederstumpfs ist mit drei anderen verbunden (Konnektivität 3); da aber das Molekül aus vierarmigen Verbindungselementen konstruiert wurde, trägt folglich jede Ecke noch einen weiteren Arm. Dieser könnte dazu benutzt werden, die Polyeder miteinander zu ligieren (diese Idee wurde bisher noch nicht umgesetzt). Die zusätzlichen Arme sind Haarnadelschleifen, die aus denjenigen Strängen hervorstehen, die den quadratischen Flächen entsprechen. Das Gesamt molekül besteht aus 2550 Nucleotiden und hat eine Molekülmasse von ca. 790 kDa.

Bei dieser Konstruktion sind die Objekte, die an die Festphase gebunden werden, Quadrate und quadratische Gruppierungen (Abb. 10). Das Zielmolekül wurde durch

zwei intermolekulare Additionen an ein trägegebundenes Quadrat konstruiert. Bei der ersten Reaktion wird ein Komplex aus vier Quadraten addiert, im zweiten Schritt dann das letzte Quadrat. Der Komplex aus vier Quadraten wird als Ganzes addiert, weil manche Restriktionsenzyme in Gegenwart des Trägermaterials eine verringerte Aktivität aufweisen. Die in Abbildung 10 links unten gezeigte Verbindung ist ein [7]Catenan aus sechs Quadraten. In diesem Konstrukt sind die Stränge für die Quadrate bereits geschlossen, und die Sechsecke werden alle von den äußeren Strängen abgeleitet. Die Sechsecke entstehen durch aufeinanderfolgende intramolekulare Ringschlüsse der kohäsiven Enden, die sich von den Restriktionschnittstellen-Paaren S1-S1' bis S7-S7' ableiten. Im letzten Schritt wird die Zielverbindung vom Träger abgespalten und mit einer Haarnadelschleife geschlossen. Der Synthesenachweis wird in zwei Schritten geführt: Erstens wird gezeigt, daß alle sechs zyklischen Stränge, die den Quadraten entsprechen, im [7]Catenan enthalten sind; zweitens wird das Endprodukt zu den [4]Catenanen verdaut, die die Quadrate flankieren. Wenn die letzten Ziele dieses Programms erreicht sind, wird es auch möglich sein, solche Zielmoleküle mit physikalischen Methoden, insbesondere der Röntgenstrukturanalyse, zu charakterisieren. Heute erinnert

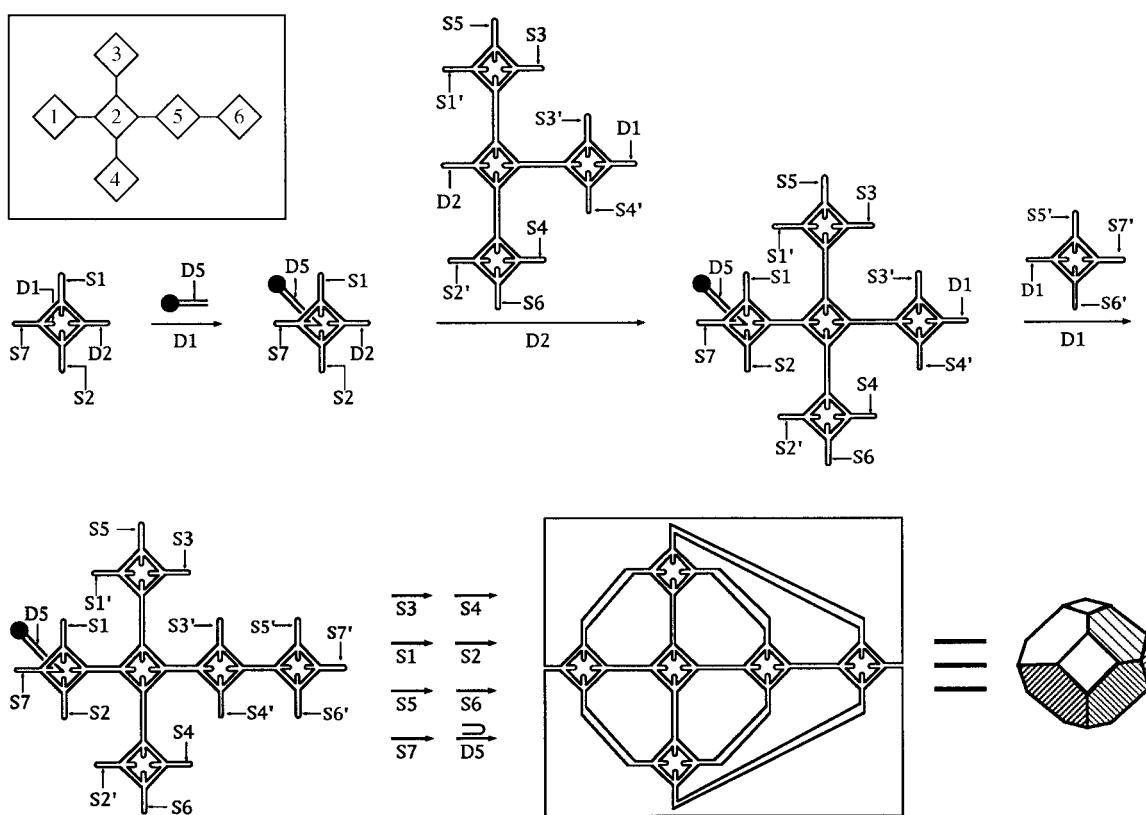


Abb. 10. Synthese eines Oktaederstumpfs an fester Phase. Im Kasten oben links ist die Numerierung der einzelnen Quadrate angegeben, an jedem Quadrat im Rest der Abbildung sind die Restriktionsschnittstellen eingezeichnet. Symmetrische Schnittstellen sind paarweise mit S und S' bezeichnet; Schnittstellen, die distal durch Restriktionsenzyme vom Typ II gespalten werden, erhalten den Buchstaben D; Schnittstellen in den exozyklischen Armen sind nicht angegeben. Die Arme, die im Lauf der Synthese zu Kanten des Objekts kombiniert werden, sind an den Außenseiten, die exozyklischen Arme an den Innenseiten der Quadrate eingezeichnet. Eine Reaktion wird durch einen Pfeil über dem Namen der Schnittstelle symbolisiert: Das bedeutet, daß das Restriktionsenzym (oder das Enzympaar für die S-Schnittstellen) zugegeben wird, die schützenden Haarnadelschleifen entfernt werden und dann die beiden kohäsiven Enden ligiert werden. Das Produkt ist in zwei Darstellungen gezeigt. Links sind die Verknüpfungen S1–S6 als Schnittpunkte von drei Kanten gezeigt, um ihre Herkunft zu betonen; die beiden Stränge der Kante, die durch die Verknüpfung S7 gebildet werden, sind getrennt gezeichnet, um die Symmetrie der Darstellung beizubehalten. Rechts ist eine gedrehte Vorderansicht einer Polyederdarstellung des Oktaederstumpfs ohne die exozyklischen Arme gezeichnet; aus diesem Blickwinkel ist die Symmetrie des idealen Objekts offensichtlich.

die Charakterisierung allerdings an die Zeit der chemischen Strukturaufklärung, bevor die physikalischen Methoden eingeführt wurden: Wir bauen Moleküle zu vorhersagbaren Fragmenten ab, für die wir unabhängige Referenzverbindungen für die Elektrophorese herstellen können. Wie bereits erwähnt sind Charakterisierung und Synthesesteuerung eher topologischer als geometrischer Art.

3.2. DNA-Moleküle mit doppelter Überkreuzung

Ihre Flexibilität ist der größte Nachteil verzweigter DNA-Verbindungselemente als Komponenten von DNA-Nanostrukturen. Wir haben vorher gezeigt, daß die Möglichkeit zur Kontrolle über die Topologie in diesem System groß ist, doch das führt nur zu einer eingeschränkten Kontrolle über die Struktur. Durch die Variation der kohäsiven Enden können besondere, in sich geschlossene Spezies in flexiblen Systemen hergestellt werden, z.B. der Würfel und der Oktaederstumpf. Von ihrer Sequenz her sind dies Strukturen niedriger Symmetrie, denn alle kohäsiven Enden sind singulär. Die Konstruktion periodischer Strukturen erfordert jedoch hochsymmetrische Komponenten, weil die einander gegenüberliegenden Flächen jeder Elementarzelle komplementär sind. Um dieses Problem anzugehen, haben wir neue DNA-Motive gesucht, die sich als starre Komponenten eignen. Zunächst beschäftigten wir uns mit gewölbten verzweigten Verbindungselementen, weil Berichte über ihre starre Struktur aus vorläufigen Experimenten vorlagen.^[28] Bei genauerer Untersuchung erwies sich dieses Motiv für die Zwecke der DNA-Nanotechnologie jedoch als nicht starr genug.^[41] Glücklicherweise sind wir auf ein System gestoßen, das viel starrer erscheint: das doppelt überkreuzte (double crossover) DNA-Molekül (DX).^[30, 42] Diese DNA-Struktur ist ein Intermediat beim genetischen Prozeß der Meiose.^[43] Sie besteht aus zwei vierarmigen Ästen, die über zwei benachbarte Arme verbunden sind.

Es gibt fünf isomere DX-Moleküle (Abb. 11). Drei dieser Isomere enthalten parallele (P) doppelhelicale Domänen. Dies bedeutet, daß die zweizählige Symmetriechse bei DPE, DPOW und DPON in der Papierebene liegt, parallel zur Helixachse der Domänen. Dadurch sind mit gleicher Linienbreite gezeichnete Stränge symmetrieverwandt. Die beiden anderen Isomere DAE und DAO enthalten antiparallele Helices, so daß die Symmetriechse senkrecht zur Helixachse verläuft. Bei DAE steht die Symmetriechse senkrecht auf der Papierebene und ist durch den Strangbruch („nick“) unterbrochen. Bei DAO liegt sie horizontal in der Papierebene; hier sind mit unterschiedlicher Linienbreite gezeichnete Stränge symmetrieverwandt. Der dritte Deskriptor im Namen dieser Isomere, E oder O, besagt, daß die Überkreuzungen durch eine gerade (E, even) oder ungerade Zahl (O, odd) von halben Doppelhelixwindungen voneinander getrennt sind. Die DPO-Isomere unterscheiden sich weiterhin dadurch, ob durch die zusätzliche halbe Windung eine zusätzliche große (W, wide) oder kleine Furche (N, narrow) in den trennenden Zwischenraum eingebracht wird. Zwischen den Überkreuzungen kommen sich die Stränge der beiden Domänen sehr nahe. Wegen der elektrostatischen Abstoßung

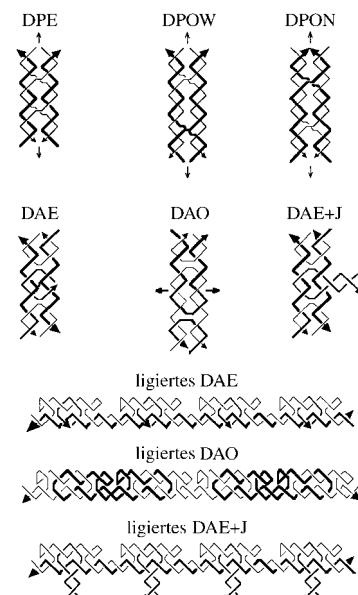


Abb. 11. Moleküle mit doppelt überkreuzter Struktur und ihre Ligationsprodukte. Die Pfeilspitzen symbolisieren das 3'-Ende der Stränge. Weitere Erklärungen siehe Text.

zwischen den negativ geladenen Strängen sind parallele Isomere nicht stabil, wenn der Abstand zwischen den Überkreuzungen zu kurz ist; solche Verbindungen werden hier nicht weiter behandelt. Dennoch sind sie bei Untersuchungen von an der Rekombination beteiligten Komponenten^[36, 44] ebenso eingesetzt worden wie antiparallele DX-Moleküle.^[44, 45]

Das auf der rechten Seite der mittleren Reihe von Abbildung 11 gezeigte Isomer DAE + J ist eine Variante des DAE-Moleküls. Es entsteht, wenn der Strangbruch in einem konventionellen DAE-Molekül (der schwer zu schließen ist, wenn die Überkreuzungen nur durch eine einzige Windung voneinander getrennt sind) durch ein Verbindungselement mit einer Ausbuchtung ersetzt wird. Es ist auch möglich, Moleküle herzustellen, bei denen aus dem zentralen Teil eines Moleküls mit doppelter Überkreuzung mehrere Arme herausragen: Winfree hat DAO + 2J-Moleküle konstruiert, und wir selbst haben DAE + 2J-Moleküle hergestellt.^[48] In beiden Fällen sind die zusätzlichen Helices senkrecht zur Ebene der übrigen Helixachsen ausgerichtet.

Im unteren Teil von Abbildung 11 ist verdeutlicht, wie die Topologie beeinflußt wird, wenn man eine Domäne dieser Moleküle durch Ligation oligomerisiert. In den Ligationsprodukten wurde jeweils eine Domäne durch eine Haarnadelschleife geschlossen. Oligomerisiert man DAE oder DAE + J, entsteht ein Reporterstrang. Die Oligomerisierung von DAO liefert dagegen ein Polycatenan. Weil Polycatenane schwierig zu charakterisieren sind, haben wir uns auf die starren Strukturen von DAE und DAE + J beschränkt.^[42] In beiden Fällen entstehen lange Reporterstränge. Bei DAE + J kommt es nur in geringem Ausmaß zur Cyclisierung, bei DAE gibt es hierfür keine Anzeichen. DAO-Moleküle bilden schneller als DAE-Moleküle geschlossene Strukturen, weil sie nicht den zyklischen zentralen Strang enthalten, der in DAE-Molekülen meist offen bleibt. Es ist anzunehmen, daß

DAO-Moleküle wegen des Fehlens dieses unterbrochenen Stranges starr sind. Daher glauben wir, daß antiparallele DX-Moleküle Komponenten für DNA-Konstruktionen sind, die die hierfür erforderliche Starrheit aufweisen.

3.3. DNA-Gitter

Die Mindestanforderungen an eine Komponente, die zum Aufbau einer periodischen Struktur benutzt werden soll, sind 1) vorhersagbare intermolekulare Wechselwirkungen, 2) vorhersagbare lokale Strukturen des Produkts und 3) die Integrität der Strukturen.^[28] Die Bedingung 1 ist von größter Bedeutung, weil die lokalen Wechselwirkungen auch unter Kristallisierungsbedingungen vorhanden sein müssen, die Bedingung 2 ist für die Konstruktion des Gitters notwendig, und die Bedingung 3 muß erfüllt sein, wenn das System translationssymmetrisch sein soll. Prinzipiell kann man mit vielen unterschiedlichen kohäsiven Enden einen Pseudokristall aufbauen (gleiches Rückgrat, unterschiedliche Sequenzen), der mit der gleichen Spezifität zusammengehalten wird wie der Würfel oder der Oktaederstumpf. Die Herstellung solcher Komponenten wäre allerdings viel zu teuer; ein konventioneller Kristall ist die billigste Möglichkeit, makroskopische Materialien mit präziser Struktur zusammenzulagern. Wir haben weiter oben ausgeführt, daß die Spezifität der DNA leicht zu entwerfen ist und daß die lokale Struktur an einem überhängenden kohäsiven Ende die einer B-DNA ist.^[8] Eine bekannte lokale Struktur ist eine komplexe aber entscheidende Eigenschaft bei der Zusammenlagerung jedes spezifischen geometrischen Bausteins; beispielsweise wäre die Struktur einer kohäsiven Verbindung, die durch überhängende Enden zusammengehalten wird, unterschiedlich, wenn die überhängenden Nucleotide eine exotische Struktur, etwa die einer parallelen DNA, einnehmen würden.^[46] Im letzten Abschnitt haben wir ein DNA-Motiv vorgestellt, welches das letzte Kriterium erfüllt, die Starrheit des Moleküls. So finden wir bei der DNA alle Eigenschaften, die für die Bildung periodischer Strukturen notwendig sind.

Wie kann man antiparallele DX-DNA-Moleküle in den oben beschriebenen Prozeß der Selbstorganisation einbringen? Zumindest zwei Wege erscheinen aussichtsreich. Ein Weg ist der, Gitter aus DX-Molekülen zusammenzulagern. Winfree hat vier unterschiedliche Topologien antiparalleler DX-Gitter identifiziert,^[47] die in Abbildung 12 gezeigt sind.

Die Gitter bestehen aus DAE- oder DAO-Molekülen, die durch eine gerade (DAE-E und DAO-E) oder eine ungerade Zahl (DAE-O und DAO-O) halber Windungen der Doppelhelix getrennt sind. Die Topologie von DAE-E gleicht einem molekularen Kettenhemd. DAE-O enthält in horizontaler (gerader Verlauf) und vertikaler Richtung (zickzackförmiger Verlauf) Reporterstränge. Beide DAO-Gitter enthalten nur in vertikaler Richtung Reporterstränge. In unserem Labor haben wir DAE-O-Gitter hergestellt und dies mit Reportersträngen, Streptavidin-Gold-Markierung von Präparaten und Untersuchung durch Kraftmikroskopie (AFM, atomic force microscopy) sowie den Einbau von DAE + 2J-Komponenten nachgewiesen; die 2J-Haarnadelschleifen fungieren dabei als topographische Markierung. Winfree et al. wiesen die Zusammenlagerung der DAO-E-Gitter durch Reporterstränge und mit topographischen DAO + 2J-Markierungen in der AFM nach.^[48] Wir haben gezeigt, daß eine Veränderung der Komponenten zu einer vorhersagbaren Änderung der AFM-Aufnahmen führt.^[48]

Ein zweiter Weg, DX-Moleküle in periodisch aufgebaute Materialien einzubringen, besteht darin, sie als Kanten von Verbindungen, die aus Dreiecken aufgebaut sind, zu verwenden. Dies sind Dreiecke bei zweidimensionalen Verbindungen und Deltaeder (Polyeder, deren Flächen ausschließlich Dreiecke sind) bei dreidimensionalen Verbindungen. Dreiecke und konvexe Deltaeder sind starre Spezies, unabhängig von der Flexibilität der Winkel zwischen ihren Kanten.^[49] Abbildung 13a zeigt ein Molekül, das wir kürzlich hergestellt haben. Es ist ein Dreieck, bei dem zwei Seiten aus DAE-Molekülen bestehen. Die Ligation in einer Dimension führt zu einem Reporterstrang, der bei der Untersuchung durch Gelelektrophorese oder durch AFM keine Anzeichen von Cyclisierung aufweist. Abbildung 13b zeigt einen möglichen

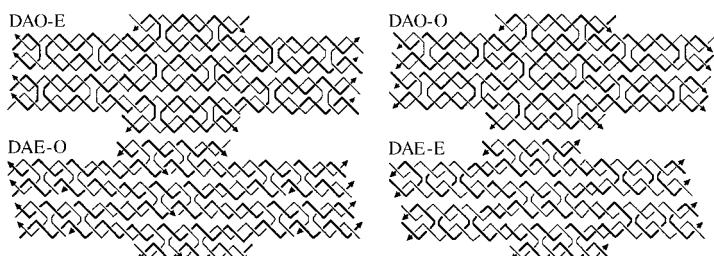


Abb. 12. Topologien zweidimensionaler antiparalleler DX-Gitter. Die Pfeilspitzen symbolisieren das 3'-Ende der Stränge. Diese sind der Übersichtlichkeit halber mit unterschiedlichen Linienbreiten gezeichnet. Näheres siehe Text.

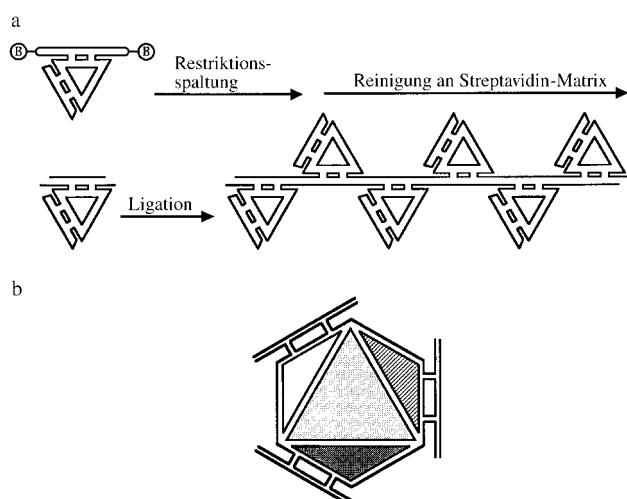


Abb. 13. DNA-Strukturen mit doppelter Überkreuzung. a) DX-Moleküle, die in die Kanten eines Dreiecks eingebaut sind. Zwei Kanten eines Dreiecks enthalten DAE-Moleküle. Die Oligomerisierung wird an den Kanten stattfinden, die Biotin (B) enthalten, nachdem die Haarnadelschleifen durch Restriktionsspaltung entfernt worden sind. b) Ein Oktaeder, das DX-Moleküle enthält. Gezeigt sind die oberen vier Flächen des Oktaeders. Drei Kanten, die einen dreidimensionalen Raum aufspannen, enthalten DX-Moleküle. Das System kann über die zusätzlichen Domänen der DX-Moleküle ligiert werden.

Weg zur Erweiterung dieses System auf drei Dimensionen unter Verwendung unterschiedlicher Komponenten: Dargestellt ist ein Okateder, bei dem in drei Kanten DX-Moleküle eingebaut sind. Auch wenn es in der Zeichnung so aussieht, sind diese Kanten nicht coplanar, sondern spannen einen dreidimensionalen Raum auf. Eine Aneinanderlagerung über kohäsive Enden entlang der äußeren Domänen würde zu einem rhomboedrischen Gitter führen. Zu beachten ist, daß die Ecken des Oktaeders vierarmige verzweigte Verbindungs-elemente sind, weil der Oktaeder ein Objekt mit der Konnektivität 4 ist. Für zukünftige Konstruktionen von Polyeder-gittern in Lösung^[41] kann man sich vorstellen, topologisch geschlossene komplexe Objekte wie das Oktaeder an einem festen Träger aufzubauen, sie in Lösung freizusetzen und sie dann zu schließen. Sie könnten dann unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden, die für diesen Zweck am besten geeignet sind. Nach der Reinigung könnten sie in Lösung mit Restriktionsenzymen gespalten werden und sich nach Behandlung mit Streptavidin zur Entfernung der Haarnadelschleifen zusammenlagern.

4. Topologische Konstruktionen

4.1. DNA- und RNA-Knoten

Die Bedeutung der Topologie in der Chemie ist spätestens seit den Arbeiten von Wasserman und Frisch^[50] bekannt, und viele Forscher haben wertvolle experimentelle Beiträge zu diesem Gebiet geleistet.^[51] Die in Lit. [51] zitierten Arbeitsgruppen haben eine Fülle von topologischen Zielstrukturen aus kleinen Molekülen hergestellt, darunter verschiedene Knoten und Catenane. Dies erforderte viel chemisches Geschick, wohingegen die Herstellung von einzelsträngigen topologischen Zielstrukturen aus DNA relativ einfach und geradlinig durchführbar ist.

Es gibt drei Gründe, weshalb die Arbeit mit geometrischen DNA-Objekten zur Konstruktion von topologischen DNA- und RNA-Zielstrukturen geführt hat: 1) Geometrische DNA-Objekte sind Catenane, die relativ eng mit Knoten verwandt sind. 2) Eine halbe Windung der Nucleinsäure-Doppelhelix ist ein ohne Aufwand verfügbarer Knotenpunkt und die Grundkomponente aller Knoten- und Catenan-Strukturen. 3) Knoten eröffnen einen möglichen Zugang zur biologischen Produktion von DNA-Polyedern. Jeder dieser Punkte bedarf einer detaillierten Erläuterung.

Knoten und Catenane können durch die in Abbildung 14a gezeigte Transformation ineinander überführt werden. Links ist ein Knoten mit fünf Knotenpunkten dargestellt, wobei die Polarität des Strangs durch die Pfeilspitzen (3'-Ende) symbolisiert ist. Im mittleren Molekül wurde ein Knotenpunkt aufgelöst. Um zu verstehen, wie dies geschieht, muß man jeden Strang in einen Teilstrang vor und einen zweiten hinter dem Knotenpunkt aufteilen, dabei aber die Polarität jedes Teilstrangs beibehalten. Der Knotenpunkt wurde aufgelöst, indem die Anhänger des Unterstrangs vertauscht wurden, während ihre Polarität erhalten blieb. Am Ende dieser Operation ist der Knoten in ein Catenan überführt worden. Wenn man die gleiche Operation auf das Catenan anwendet,

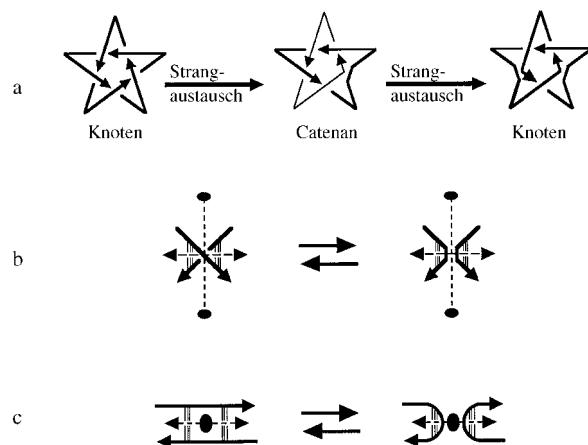


Abb. 14. „Null-Knoten“-Operationen. Näheres siehe Text.

erhält man einen Knoten mit drei Knotenpunkten (Abb. 14a, rechts). Die gezeigte Transformation, also die Auflösung eines Knotenpunkts, wird manchmal als Umwandlung eines positiven oder negativen Knotenpunkts in einen „Null-Knotenpunkt“ (zero node) beschrieben.^[52] Es ist sinnvoll, diese Operation im Zusammenhang mit der DNA zu betrachten.^[53] Dies ist in Abbildung 14b an einem einzelnen Knotenpunkt gezeigt. Der horizontale gestrichelte Doppelpfeil deutet die DNA-Helixachse an, die vertikale gestrichelte Linie mit den beiden Ellipsen die zweizählige Symmetriechse des DNA-Rückgrats, die senkrecht zur Helixachse steht. Die Stränge sind als Pfeile dargestellt, um ihre Polarität zu verdeutlichen; sie sind durch sechs Nucleotidpaare verbunden. Die Bildung des Null-Knotenpunkts durch einen Strangtausch unter Erhalt der Polarität führt zur auf der rechten Seite dargestellten Struktur. In Abbildung 14c ist der gleiche Vorgang im selben System dargestellt, nur daß die DNA um 90° um die Helixachse gedreht ist, so daß man entlang der zweizähligen Symmetriechse blickt. Aus diesem Blickwinkel wird klar, daß die beiden Stränge gespalten werden und dabei zwei gegenüberliegende Haarnadelschleifen entstehen. Überträgt man diese Operation von der Topologie auf die Chemie, muß man den nach rechts gerichteten Pfeil durch ein Paar von Reaktionspfeilen ersetzen. Der Pfeil nach rechts zeigt die analytische Operation an, die von Mathematikern durchgeführt wird, um eine Topologie zu analysieren, die Knoten enthält.^[52] Der Pfeil nach links dagegen zeigt eine synthetische Operation an, wie sie bei der Zusammenlagerung von DNA-Objekten diskutiert wurde. Beim Vergleich von Abbildung 14c mit dem letzten Schritt aus Abbildung 9 sieht man, daß die Kombination von zwei intramolekularen kohäsiven Enden durch Restriktionsspaltung und Ligation einen Knoten (der triviale Fall eines Knotens ist hier ein Ring) in ein Catenan umwandelt; die beiden Stränge in Abbildung 9 sind mit unterschiedlicher Linienbreite gezeichnet, um diesen Punkt zu betonen.

Die fundamentale Einheit der Topologie der Verknüpfungen und Knoten ist der Knotenpunkt.^[24] Jeder Knoten oder jede Verknüpfung ist durch die Zahl und die relativen Positionen ihrer Knotenpunkte charakterisiert. Abbildung 15a zeigt, daß eine halbe Windung der Doppelhelix dem Knotenpunkt entspricht, wodurch die Verbindung von

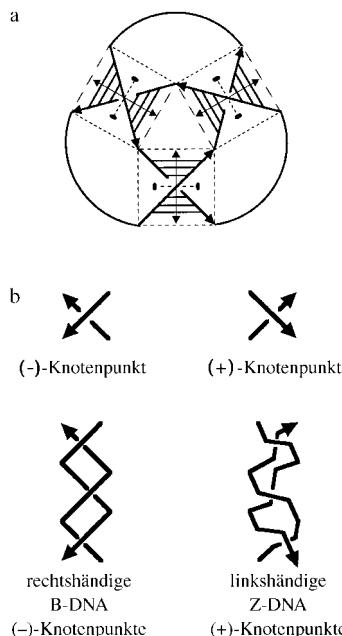


Abb. 15. DNA-Topologie. Die Verwandtschaft zwischen einer halben Windung der Doppelhelix und einem Knotenpunkt sowie die unterschiedlichen Chiralitäten von Knotenpunkten sind dargestellt. Näheres siehe Text.

Windung der Doppelhelix zwischen den antiparallelen Strängen flankieren. Der Rest des Knotens kann aus unstrukturierten Oligo-Desoxythymidin(dT)-Einheiten aufgebaut werden. In Abbildung 15 b ist verdeutlicht, daß die Knotenpunkte eine von zwei entgegengesetzten Chiralitäten aufweisen können. Negative (–) Knotenpunkte sind in rechtsdrehender B-DNA enthalten, der üblichen Struktur der DNA. Es ist aber auch möglich, positive (+) Knotenpunkte mit linkshändiger Z-DNA herzustellen, die eine Zickzack-Form aufweist.^[54] Z-DNA ist nicht von der Geometrie, sondern von der Topologie her enantiomorph zu B-DNA.

Indem wir die Verwandtschaft zwischen den doppelhelicalen halben Windungen und den Knotenpunkten nutzen, haben wir eine Reihe verschiedener topologischer Spezies hergestellt. In jedem Fall wird ein vollständiger DNA-Strang synthetisiert, aber die letzte Ligation zur Cyclisierung des Moleküls wird enzymatisch durchgeführt. Wir haben kleeblattförmige Knoten aus zwei B-DNA-Motiven,^[55, 56] einen Knoten mit der Form der Zahl Acht aus einem Strang mit zwei negativen (B-DNA) und zwei positiven Knoten (Z-DNA)^[57] sowie einen kleeblattförmigen Knoten mit positiven Knotenpunkten hergestellt.^[58] Der 8-förmige Knoten ist topologisch gesehen eine Art Gummihandschuh,^[59] d. h. eine Struktur, deren molekulare Darstellung zu ihrem Spiegelbild deformiert werden kann, nicht aber zu einer symmetrischen Form.

Zwei Bedingungen müssen erfüllt sein, um ein DNA-Segment aus B-DNA in Z-DNA zu überführen: 1) Die Sequenz muß für die Bildung einer Z-DNA-Struktur geeignet sein. 2) Das Molekül muß unter Bedingungen gelöst sein, die den B → Z-Konformationsübergang begünstigen, wie hoher Ionenstärke oder der Anwesenheit spezieller kationischer

der Topologie zur Chemie der Nucleinsäuren hergestellt ist. Ein kleeblattförmiger Knoten ist mit dicken Linien dargestellt, wobei die Pfeilspitzen seine Trajektorie anzeigen. Die Helixachsen und die zweizähligen Symmetriechsen sind eingezeichnet. Ein gestricheltes Quadrat ist so um jeden Knotenpunkt gezeichnet, daß die Stränge des Knotens die zugehörigen Diagonalen sind. Die Diagonalen teilen das Quadrat in vier Sektoren, zwei davon liegen zwischen parallelen und zwei zwischen antiparallelen Strängen. Der Übergang von der Topologie zur Chemie wird durch die sechs Basenpaare hergestellt, die eine halbe

Effektoren wie $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$.^[54] So kann der gleiche Strang benutzt werden, um verschiedene Knoten herzustellen; dies hängt von den Bedingungen ab, unter denen die abschließende Ligation durchgeführt wird. Ein Beispiel dafür, wie wir einen einzelnen Strang durch die Kontrolle der Ligationsbedingungen in vier verschiedene Topologien überführt haben, ist in Abbildung 16 gezeigt. Die Regionen X und X' sind ebenso komplementär zueinander wie die Regionen Y und Y'. Beide Regionen können sich über Basenpaarungen zusammenlagern und dabei eine einzelne DNA-Windung bilden, und beide können den B → Z-Übergang durchlaufen, obwohl die Y-Y'-Doppelhelix eine größere Neigung zeigt, die Z-DNA-Konformation einzunehmen als die X-X'-Doppelhelix. Die Ligation bei sehr niedriger Ionenstärke liefert nur einen Ring. Steigert man die Ionenstärke, bildet sich ein kleeblattförmiger Knoten mit negativen Knotenpunkten, weil beide Domänen die B-DNA-Struktur einnehmen. Bei noch höherer Ionenstärke geht die Y-Y'-Domäne in die Z-DNA-Form über, so daß ein 8-förmiger Knoten entsteht. Bei Zusatz von $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ geht auch die X-X'-Domäne in die

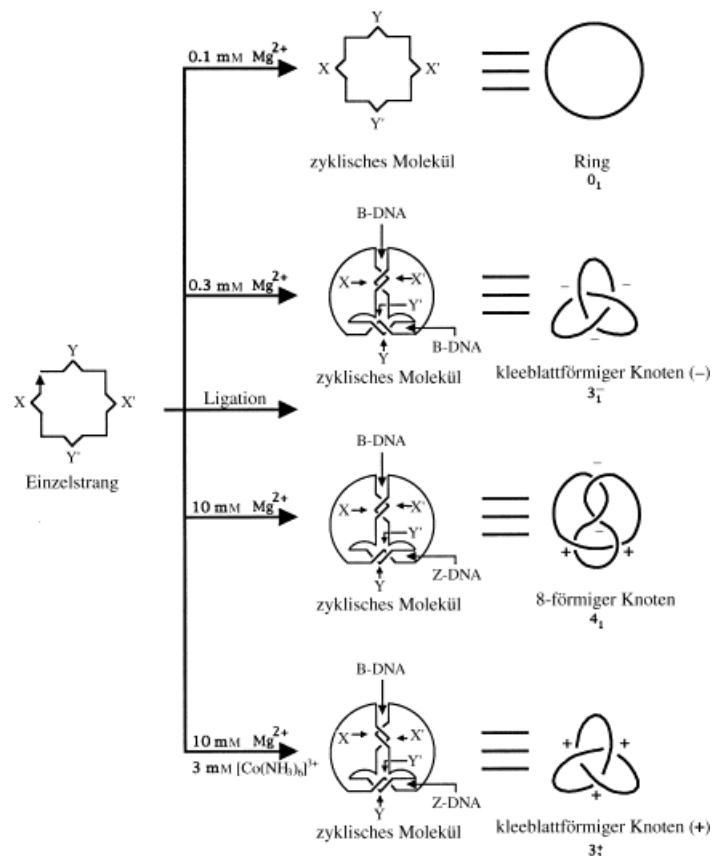


Abb. 16. Synthese von vier Strukturen unterschiedlicher Topologie aus einem zirkulären DNA-Strang. Links ist das Molekül gezeigt, aus dem die Zielprodukte hergestellt werden. Die vier Regionen, die Basenpaarungen eingehen können, X und Y sowie komplementär dazu X' und Y', sind durch die Ausbuchungen des Quadrats angegeben. Das 3'-Ende des Moleküls ist durch die Pfeilspitze markiert. Rechts neben der Ausgangsstruktur sind vier unabhängige Bedingungen angegeben, unter denen die gewünschten Zielstrukturen in Lösung hergestellt wurden. Das Basenpaarungsmuster und die erwartete Händigkeit der Helix sind für jeden Fall rechts neben den Reaktionsbedingungen gezeigt, ganz rechts außen ist die Molekültopologie der Produkte dargestellt. Für die Erklärung der topologischen Symbole K_i siehe Abschnitt 4.3.

Z-Konformation über, so daß der positive kleeblattförmige Knoten entsteht.

Wir haben gezeigt, daß jede Spezies aus Abbildung 16 durch die DNA-Topoisoerasen I oder III aus *E. coli* in eine andere überführt werden kann.^[60] Es ist möglich, einen Knoten unter bestimmten Bedingungen zu ligieren und diese dann so zu ändern, daß die Bildung einer anderen topologischen Spezies begünstigt wird. Auch wenn eine neue Spezies begünstigt ist, verhindert der kovalente Ringschluß des Moleküls, daß dieses die andere Topologie einnimmt. Ein 8-förmiger Knoten (der eine Z-DNA-Domäne enthält) kann unter Bedingungen, die für eine Z-DNA-Struktur ungünstig sind, nicht in einen kleeblattförmigen Knoten übergehen, ohne daß Bindungen gebrochen werden. Allerdings können DNA-Topoisoerasen vom Typ I, die Substratspezifität für Einzelstränge aufweisen, diese Umwandlung katalysieren, weil sie das Aneinandervorbeiführen der Stränge erleichtern.

Die effiziente Katalyse des Aneinandervorbeiführens der Stränge in diesen Knoten durch die DNA-Topoisoerasen legte nahe, daß Knoten ein nützliches Substrat sein könnten, um eine andere biologische Aktivität zu entdecken, die einer RNA-Topoisoeras. Insbesondere versuchten wir, die postulierte Aktivität der DNA-Topoisoeras III aus *E. coli* als RNA-Topoisoeras^[61] zu bestätigen. Wir konstruierten einen einsträngigen RNA-Knoten und einen Ring mit derselben Sequenz. Die *E. coli*-DNA-Topoisoeras III war in der Lage, die Umwandlung dieser Spezies ineinander zu katalysieren;^[15] außerdem katalysierte das Enzym in geringem Ausmaß die Bildung von RNA-Catenanen. Die Instabilität der RNA und das Fehlen effektiver modifizierender Enzyme (es sind keine Restriktionsenzyme für RNA bekannt, alle Exonucleaseen enthalten Endonuclease-Verunreinigungen, und die Ligation durch DNA-Ligasen ist ineffektiv) machten aus einem relativ geradlinigen Experiment jedoch ein technisch schwieriges Projekt. Obwohl die Probleme, auf die wir bei der Entdeckung der RNA-Topoisoeras gestoßen sind, nur indirekt mit der Nucleinsäure-Nanotechnologie zusammenhängen, hatten sie einen großen Einfluß darauf, daß wir bei unserer Arbeit wieder die Verwendung von Molekülen mit Standard-DNA-Rückgraten bevorzugten.

DNA-Knoten unterscheiden sich etwas von DNA-Polyedern: Polyeder enthalten keine ungepaarten Nucleotide, in Knoten dagegen befinden sich zwischen den über Basenpaarung verbundenen Domänen lange einsträngige Abschnitte (Linker-Bereiche). Die Strukturen, die von einsträngiger DNA eingenommen werden können, lassen sich kaum vorhersagen. Eine mögliche Lösung für dieses Problem ist die vorübergehende Zugabe von einsträngiger DNA, die komplementär zu den Linker-Bereichen ist. Damit lassen sich deren Wechselwirkungen während der Ligation kontrollieren. Da diese Moleküle topologisch nicht an das Zielmolekül gebunden sind, können sie bei der Reinigung des Produkts einfach entfernt werden. Diese Idee ist für ein Catenan in Abbildung 17 verdeutlicht. Wir konnten zeigen, daß dieses Verfahren für Catenane beliebiger Sequenz effektiv ist.^[36] Kurioserweise war der topologische Schutz bei Knoten erfolglos, obwohl das Konzept gerade für diese Anwendung entwickelt worden war. Tatsächlich haben Versuche mit topologisch geschützten Verbindungen oft zu größeren Men-

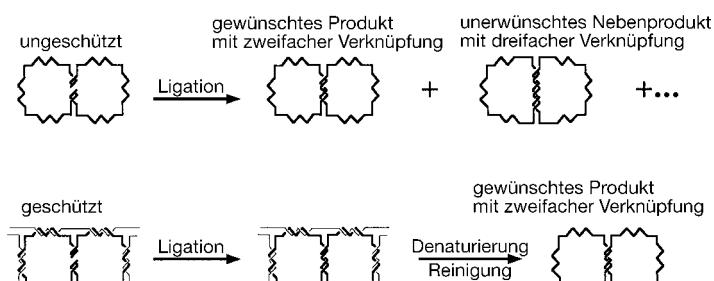


Abb. 17. Topologischer Schutz von Catenanen. Die Abbildung zeigt zwei Reaktionen zur Herstellung von Catenanen: Bei der oberen Synthese werden zwei Stränge ohne topologische Schutzgruppen ligiert, dagegen sind bei der unteren Ligation topologische Schutzgruppen eingebaut. Diese Schutzgruppen sind im Vergleich zu den Molekülen, die miteinander verbunden werden sollen, mit dünneren Linien dargestellt. In beiden Fällen hat das gewünschte Catenan zwei nach den Watson-Crick-Regeln komplementäre Windungen, die im zentralen Duplex zu sehen sind, wo sie miteinander hybridisiert sind. Oben ist das gewünschte zweifach verknüpfte Catenan als Produkt gezeigt, doch außerdem entsteht ein weiteres Catenan mit einer weiteren, zufälligen Verknüpfung. Bei den Produkten der unteren Reaktion sind alle Nucleotide der nichtkomplementären DNA mit ihren Watson-Crick-Gegenstücken gepaart und werden bei der Denaturierung entfernt.

gen unerwünschter Produkte geführt.^[56] Wir schreiben diesen Mißerfolg den oligo(dT)-Sequenzen in den Linkern zu, da die komplementäre Sequenz oligo(dA) Tripelhelices bilden kann, an denen gleichzeitig zwei Linker beteiligt sind, so daß diese verbunden werden.

Wir äußerten weiter oben die Vermutung, daß Knoten einen Zugang zur biologischen Synthese von DNA-Polyedern eröffnen können. Wie könnte das funktionieren? In Abbildung 18a sieht man, daß die Replikation einer stabilen

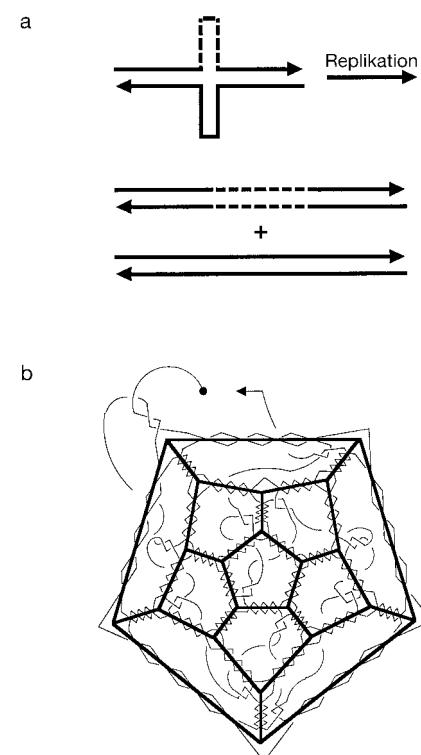


Abb. 18. Das Klonieren von Verzweigungen. Näheres siehe Text.

Verzweigung durch DNA-Polymerasen nicht möglich ist: Die Heteroduplex-Regionen, die in der ersten Generation der Moleküle enthalten sind, würden in der zweiten Generation eliminiert, falls die DNA intrazellulär oder durch PCR repliziert wird. Es wäre aber vielleicht möglich, die Moleküle in Form eines langen Einzelstrangs herzustellen (Abb. 18b).^[62] Gezeigt ist ein Schlegel-Diagramm eines pentagonalen Dodekaeders. Jede Kante besteht aus zwei DNA-Windungen; somit entspricht jede Fläche einem zyklischen Strang. An jedem Ring wurde ein exozyklischer helicaler Arm angefügt, und diese exozyklischen Arme wurden miteinander verbunden, so daß ein langer Einzelstrang entsteht. Die Produktion dieses Objektes auf biologischer Basis könnte ablaufen, indem der Strang durch Replikation hergestellt wird, dieser sich – wahrscheinlich in Gegenwart von DNA-Topoisomerasen des Typs I – faltet und dann durch Restriktionsspaltung der Arme die verbindenden Stränge entfernt werden. Es entsteht ein Polyeder, das über die durch Restriktionsspaltung gebildeten kohäsiven Enden mit anderen Polyedern verbunden werden kann. Die mögliche Faltung des Strangs müßte natürlich sehr sorgfältig geplant sein und dann genau kontrolliert werden, möglicherweise über die Temperatur.

4.2. Borromäische Ringe aus DNA

Um auszuloten, wie weit sich die topologische Kontrolle bei Nucleinsäuren ausweiten läßt, haben wir mit unserem System borromäische Ringe konstruiert.^[63] Dies ist eine große Familie topologischer Strukturen,^[64] deren einfachstes Mitglied eine Dreiring-Verknüpfung ist (Abb. 19, oben links), die sich im Wappen der in der italienischen Renaissance berühmten Familie Borromeo findet. Die besondere Eigenschaft borromäischer Ringe ist die, daß die Spaltung eines beliebigen Gliedes dazu führt, daß auch die anderen Glieder auseinanderfallen. In Abbildung 19 ist dies offensichtlich, weil kein Paar von Ringen miteinander verbunden ist. Im oberen rechten Teil der Abbildung ist verdeutlicht, daß es keine Obergrenze für die Zahl von Ringen gibt, die man unter Erhalt der borromäischen Eigenschaft verbinden kann.

Bei der dreigliedrigen Ringverknüpfung haben die drei äußeren und die drei inneren Knotenpunkte entgegengesetzte Vorzeichen. Jeder dieser Knotenpunkte könnte durch eine halbe Windung einer DNA-Doppelhelix gebildet werden. Um die Konstruktion zu vereinfachen, ersetzen wir jede der halben DNA-Windungen durch drei halbe Windungen, da die Struktur dann stabiler wird. Da es sich um eine topologische Struktur handelt, ist es möglich, sie um eine Kugel zu wickeln. Wenn dies geschehen ist, entsprechen die drei inneren Helices einem dreiarmigen verzweigten B-DNA-Verbindungselement, das den Nordpol der Kugel flankiert, und die drei äußeren Helices entsprechen einem dreiarmigen verzweigten Z-DNA-Verbindungselement, das den Südpol flankiert. Wir fügen Haarnadelschleifen am „Äquator“ ein, um Stellen für die Ligation zu erhalten (Abb. 19, unten). Diese Haarnadelschleifen enthalten auch Restriktionsschnittstellen, so daß die Ringe einzeln gespalten werden können. Wenn dies auch aus

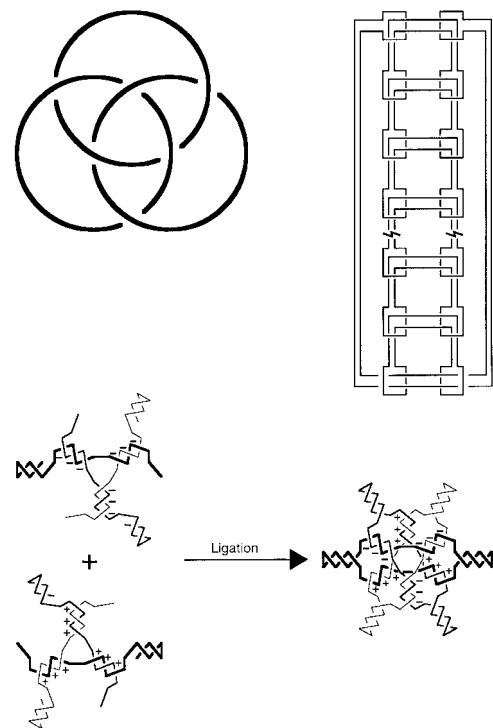


Abb. 19. Borromäische Ringe. Links oben sind traditionelle borromäische Ringe dargestellt, bei denen keine zwei Ringe miteinander verbunden sind. Eine beliebige Zahl von Ringen kann zu einer borromäischen Anordnung zusammengefügt werden, so daß die Spaltung eines jeden Rings zur Auflösung des gesamten Komplexes führt (rechts oben). Im unteren Teil der Abbildung ist die Synthese von borromäischen Ringen aus DNA gezeigt. Ein verzweigtes B-DNA-Verbindungselement (oben) und ein Z-DNA-Verbindungselement (unten) mit je 1.5 Windungen pro Arm sind gezeigt, die Vorzeichen der Knotenpunkte sind angegeben. Die drei Stränge sind mit unterschiedlich breiten Linien gezeichnet. Am Ende eines jeden Strangs befinden sich Teile von Haarnadelschleifen (eine ist nahezu vollständig, eine ergänzt den Teil, der bei der anderen unvollständigen Schleife fehlt). Bei der Ligation unter Bedingungen, die die Bildung einer Z-Helix begünstigen, wird die borromäische Anordnung gebildet (rechts).

der Abbildung nicht hervorgeht, hatten die Haarnadelschleifen leicht unterschiedliche Längen, so daß die drei Ringe einfach durch Gelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen getrennt werden konnten. Der Nachweis der Synthese besteht darin, jeden Ring einzeln zu spalten und dann zu zeigen, daß das Produktgemisch nur noch aus den beiden anderen, einzelnen Ringen besteht, ohne daß Dicatenane enthalten sind.

4.3. DNA-Antijunctions und -Mesojunctions

Die Arbeit mit Knoten hat zu einer verallgemeinerten Sicht der verzweigten Verbindungselemente geführt. Wenn man einen Knoten nach dem im letzten Abschnitt beschriebenen Prinzip synthetisiert, kann durch die Anordnung der Knotenpunkte eine Reihe von Substrukturen entstehen. Im Knoten 9_{49} (Abb. 20a) ist jeder Knotenpunkt als doppelhelikale halbe Windung zwischen antiparallelen Strängen dargestellt. (In der Bezeichnung K_i für einen Knoten steht K für die Zahl der Knotenpunkte in einer möglichst planaren

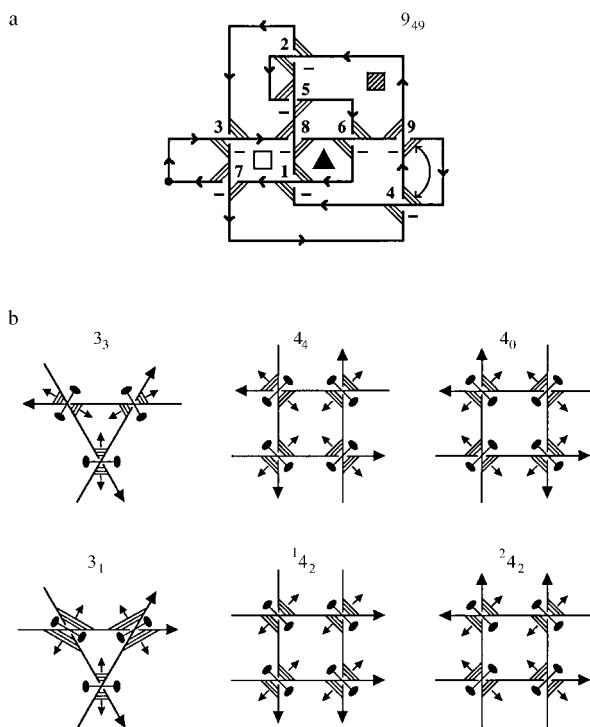


Abb. 20. Antijunctions und Mesojunctions. a) Ein 9₄₉-Knoten aus DNA. Näheres siehe Text. b) Schematische Darstellung von drei- und viersträngigen Verbindungselementen, Antijunctions und Mesojunctions. Sie sind als Anordnungen von Helices gezeichnet, die ein Dreieck oder ein Quadrat flankieren können. Jedes Polygon wird von DNA-Strängen gebildet, die über die Ecken hinaus in jede Richtung weiterlaufen. Die Pfeilspitzen markieren die 3'-Enden der Stränge. Die Ecken entsprechen den Knotenpunkten, die durch eine halbe Windung doppelhelicaler DNA gebildet werden. Basenpaarungen werden durch Linien zwischen antiparallelen Strängen angezeigt. Somit ergibt sich eine ähnliche Notation wie in Abbildung a), bei der jeder Satz von sechs Basenpaaren eine halbe Windung doppelhelicaler DNA darstellt. Allerdings sind die halben Windungen ausführlicher bezeichnet: Dünne Pfeile, die senkrecht auf den Basenpaaren stehen und von diesen wegzeigen, stellen die Helixachse jeder halben Windung dar; die Linien, die senkrecht auf diesen Helixachsen stehen und in Ellipsen enden, symbolisieren die zweizähligen Symmetriechsen. Die Komplexe 3₃ und 4₄ entsprechen konventionellen verzweigten Verbindungselementen, deren Helixachsen (Pfeile, die senkrecht auf den Basenpaaren stehen) zum Zentrum des Dreiecks oder des Quadrats hin orientiert sind. Der Komplex 4₀ ist eine viersträngige Antijunction, deren Helixachsen peripher zum Quadrat ausgerichtet sind und deren zweizählige Symmetriechsen zum Zentrum des Quadrats hin weisen. Die Komplexe in der unteren Reihe sind Mesojunctions, die eine Mischung aus den beiden Orientierungen der Helixachsen enthalten.

Darstellung des Knotens, und i dient zur Unterscheidung verschiedener Knoten mit identischem K-Wert.^[52] Die Polarität des Knäuels lässt sich am Verlauf der Pfeile ablesen. Einige der eingeschlossenen Regionen enthalten weitere Symbole, die beschreiben, wie die Doppelhelices angeordnet sind: Ein ausgefülltes Dreieck besagt, daß diese Position von drei Doppelhelices flankiert wird, die wie die Arme eines dreiarmigen verzweigten Verbindungselementen angeordnet sind, weil ihre Helixachsen zum Inneren der Region hin orientiert sind. Rechts davon sind zwei Helices durch einen gebogenen Doppelpfeil verbunden, weil die beiden halben Windungen zu einer vollen Windung einer DNA-Duplex kombiniert sein können. Links vom ausgefüllten Dreieck befindet sich eine andere Fläche, die ein offenes Quadrat

enthält. Vier halbe Windungen flankieren diese Region, aber sie stehen nicht in der gleichen Beziehung zueinander wie die Arme eines verzweigten Verbindungselements, da die Helixachsen peripher orientiert sind und nicht in Richtung des Zentrums weisen. Dies ist eine neue Topologie, die als „Antijunction“ bezeichnet wird.

Die Beziehung zwischen einem Verbindungselement (junction) und einer Antijunction ist in Abbildung 20b deutlicher gezeigt. Hier wird das normale vierarmige Verbindungselement mit 4₄ und die vierarmige Antijunction mit 4₀ bezeichnet, wobei der tiefgestellte Index die Zahl der radial ausgerichteten Arme angibt. Die Helixachsen des verzweigten Verbindungselementes sind zur Mitte des Quadrats hin orientiert, während bei der Antijunction die lokalen zweizähligen Symmetriechsen in Richtung des Zentrums zeigen. Es ist möglich, die Orientierung von Paaren von Doppelhelices umzukehren, ohne daß dabei topologische Mehrdeutigkeiten entstehen: Dabei erhält man „Mesojunctions“. Die beiden vierarmigen Mesojunctions werden mit 1⁴₂ und 2⁴₂ bezeichnet, wobei der tiefgestellte Index wiederum die Zahl der radialen Helixachsen angibt; der hochgestellte Index ist ein Zählindex, um die beiden Spezies zu unterscheiden. In Abbildung 20b sind auch ein dreiarmiges verzweigtes Verbindungselement (3₃) sowie die einzige mögliche dreiarmige Mesojunction (3₁) gezeigt.

Wir haben die in Abbildung 20b gezeigte Antijunction und die Mesojunctions konstruiert. Die Stabilität dieser Spezies ist eine Funktion der Zahl von halben Windungen in den angrenzenden Domänen. Wir haben versucht, diese Verbindungen mit zwei und mit drei halben Windungen je Domäne herzustellen.^[31, 32] Sie sind jedoch nicht handhabbar und viel instabiler als konventionelle verzweigte Verbindungselemente. Außer bei sehr niedrigen Konzentrationen bilden Mesojunctions diskrete, geschlossene Multimere des Zielkomplexes. Antijunctions bilden oft offene Komplexe (z.B. Komplexe des Typs 1-2-3-4-1-2-3..., wobei die Zahlen die verschiedenen Moleküle eines bestimmten numerierten Strangs bezeichnen); im Unterschied zu geschlossenen Komplexen findet man hier keine wohldefinierten zyklischen Spezies.

Eine Untersuchung der Antijunctions und Mesojunctions bestärkt die Beobachtung, daß die Stapelwechselwirkungen der Basen das Schlüsselement sein könnten, das es beim Entwurf einer DNA-Sekundärstruktur zu beachten gilt. Strukturen, in denen maximale Stapelwechselwirkungen möglich sind, erscheinen bei diesen Systemen begünstigt zu sein, wenn sie mit den Verdrillungen kompatibel sind, die im Molekül vorkommen. Betrachtet man den Ursprung von Antijunctions und Mesojunctions in Nucleinsäureknoten, ist es nicht überraschend, daß sie eng mit den Pseudoknoten verwandt sind, die man in zellulären RNA-Strukturen findet. Im allgemeinen ist die schwierige Handhabbarkeit von Antijunctions und Mesojunctions ein wichtiger Grund, diese bei topologischen Konstruktionen zu vermeiden. So war es möglich, borromäische Ringe als Summe von entweder zwei 3₁-Mesojunctions oder zwei gewöhnlichen 3₃-Verbindungselementen zu entwerfen; die Entscheidung für die beiden konventionellen Verbindungselemente fiel dabei nicht schwer.

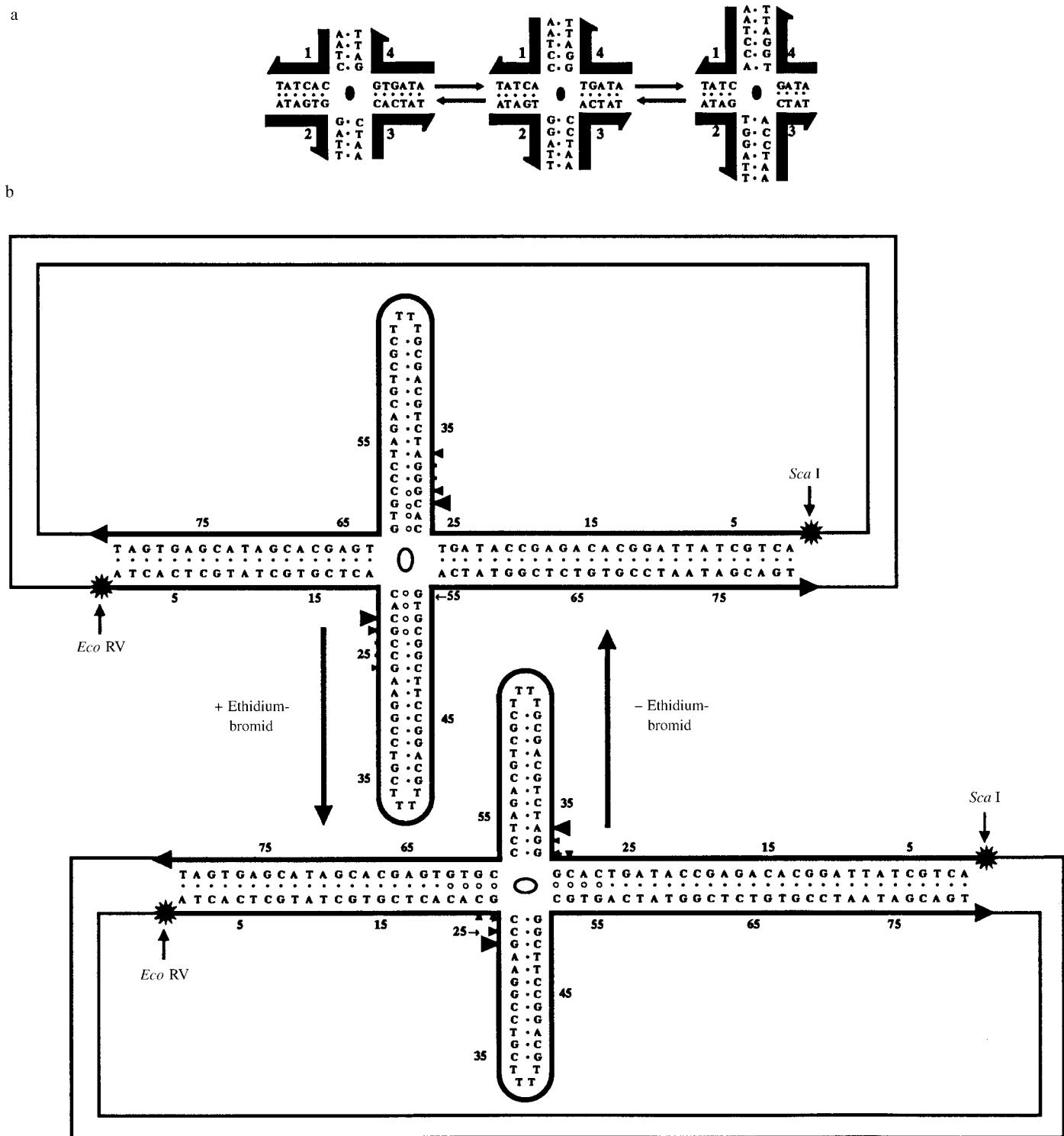


Abb. 21. Steuerung der Wanderung eines Verzweigungspunkts. a) Wanderung eines Verzweigungspunkts. Gezeigt ist ein vierarmiges verzweigtes Verbindungselement mit zweifacher Sequenzsymmetrie um den Verzweigungspunkt herum. Von links nach rechts ist die Bewegung von Basenpaaren von den horizontalen in die vertikalen Arme gezeigt. b) Ein System zur Steuerung der Wanderung eines Verzweigungspunkts. Das gezeigte Molekül enthält vier bewegliche Nucleotidpaare (die im Unterschied zu den anderen Basenpaaren nicht durch ausgefüllte, sondern durch offene Kreise verbunden sind), und die horizontalen Arme sind miteinander verbunden, so daß ein Ring entsteht. Im oberen Molekül befinden sich die beweglichen Basenpaare in den vertikalen Armen, was durch die Orientierung der Ellipse im Verzweigungspunkt angedeutet ist. Im unteren Molekül haben sie sich in die horizontalen Arme umgelagert (die Ellipse hat sich gedreht), ausgelöst durch die positive Superspiralisierung, die der Zusatz von Ethidiumbromid bewirkt hat. Primäre Spaltstellen für Endonuklease VII sind durch die großen und kleinen Pfeilspitzen markiert. Man beachte, daß diese sich relativ zur Sequenz, nicht aber relativ zum Verzweigungspunkt bewegen. Markierte Restriktionsschnittstellen für die Analyse sind eingezeichnet, und die Numerierung der Basen innerhalb der Fragmente ist angegeben.

5. Nanomechanische Funktionseinheiten

Es ist wünschenswert, die architektonischen Eigenschaften der DNA mit ihren dynamischen Eigenschaften zu verknüpfen, um nanomechanische Funktionseinheiten herzustellen. Es gibt zwei bedeutende Konformationsumwandlungen, die für diesen Zweck genutzt werden können. Die erste ist die Wanderung eines Verzweigungspunktes (Abb. 21 a).^[17] Im allgemeinen kann diese Umwandlung in beide Richtungen verlaufen. Bei einem kleinen System wird sich das vierarmige Verbindungssegment in zwei Duplexmoleküle auflösen. Dieser Übergang kann jedoch kontrolliert werden, indem man auf ein Paar gegenüberliegender Arme ein Drehmoment ausübt.^[65] Sind die horizontalen Arme negativ superspiralisiert („supercoiled“), werden die vertikalen Arme herausgedrückt; sind die horizontalen Arme positiv superspiralisiert, werden die vertikalen Arme zurückgezogen.

Abbildung 21 b zeigt ein System, in dem dieses Prinzip angewendet wurde.^[66] Die horizontalen Arme sind durch einen Ring verbunden, um ein gerichtetes Drehmoment auszuüben. Die vier zentralen Nucleotidpaare sind symmetrisch, wodurch der Umfang der möglichen Verschiebung des Verzweigungspunktes vorgegeben ist. Das Drehmoment wird durch die Zugabe von Ethidiumbromid ausgeübt. Dadurch verschieben sich die vier Nucleotidpaare aus den vertikalen in die horizontalen Arme. Diese Umordnung wird durch Spaltung mit Endonuclease VII nachgewiesen, die am Verzweigungspunkt spaltet, und dann durch Restriktionsspaltung mit *ScaI* und *EcoRV*, um das gespaltene Fragment zu analysieren.^[66] Dieses System funktioniert, aber es ist schwerfällig.

Ein aussichtsreicheres System greift auf den Übergang zwischen B- und Z-DNA zurück, um eine Rotation zwischen zwei Objekten zu erzeugen. Dazu haben wir zwei DAO-Moleküle über einen DNA-Linker miteinander verknüpft, der lang genug ist, um den B → Z-Übergang durchlaufen zu können (proto-Z-DNA; Abb. 22). Wenn die äußeren Bedingungen die B-Konformation begünstigen, liegen die beiden DAO-Domänen auf gegenüberliegenden Seiten der Verbindungsdomäne. Wird die Z-Konformation begünstigt, befinden sie sich auf derselben Seite. Der Übergang wird anhand des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) zwischen zwei Farbstoffmolekülen verfolgt. Das System kann zwischen den beiden Zuständen hin- und hergeschaltet werden, wodurch die Struktur der Moleküle verändert wird.^[75] Obwohl dies ein relativ einfaches Konzept ist, dauerte es sieben Jahre, bis es Früchte getragen hat, denn für diese Funktionseinheit benötigt man starre Komponenten, die die proto-Z-Region flankieren. Erst als die starren DX-Moleküle etabliert waren,^[42] war es möglich, diese Vorrichtung zu konstruieren und nachzuweisen, daß sie funktioniert.

6. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Aufsatz sollte gezeigt werden, daß die Rolle der Nucleinsäuren nicht nur auf biologische Systeme beschränkt sein muß. Gerade die Eigenschaften, die im Verlauf der natürlichen Selektion dieses Molekül so sehr für seine Rolle

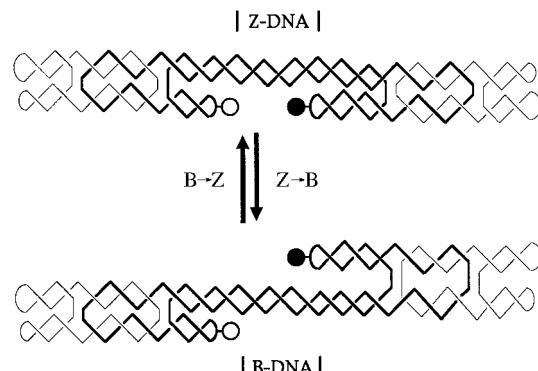


Abb. 22. Eine nanomechanische Funktionseinheit, die auf dem B → Z-Konformationsübergang beruht. Das Molekül besteht aus zwei DAO-Domänen, die durch ein Segment aus proto-Z-DNA verbunden sind. Es besteht aus drei zyklischen Strängen, von denen die endständigen mit einer dünnen Linie, der mittlere mit einer dicken Linie gezeichnet sind. Das Molekül enthält ein Paar von fluoreszierenden Farbstoffmolekülen, deren räumliche Trennung durch FRET nachgewiesen wird. Eines ist als ausgefüllter Kreis, das andere als leerer Kreis dargestellt. Im unteren Molekül liegt das proto-Z-Segment in der B-Konformation vor, und die Farbstoffmoleküle befinden sich auf gegenüberliegenden Seiten der zentralen Doppelhelix. Im oberen Molekül liegt das proto-Z-Segment dagegen in der Z-Konformation vor, und die Farbstoffmoleküle liegen auf derselben Seite der zentralen Doppelhelix. Die Länge der proto-Z-DNA und ihre Konformation sind oben und unten durch die vertikalen Striche angedeutet, die die Konformationsbezeichnung flankieren.

als genetisches Material prädestinierten, eröffnen der DNA auch eine potentiell wertvolle Rolle in der Nanotechnologie. Die komplementäre Beziehung zwischen den gegenüberliegenden DNA-Strängen ermöglicht es uns, die Wechselwirkungen so zu programmieren, daß sich Moleküle in der gewünschten Weise zusammenlagern. So können wir Moleküle mit vorhersagbaren topologischen Eigenschaften herstellen. Es gelang bereits, Strukturen aufzubauen, die die Konnektivität eines Würfels oder eines Oktaederstumpfs haben. Weiterhin ist die Topologie, nach der sich DNA-Moleküle verknüpfen, eine ihrer verlässlichsten Eigenschaften. Die geometrischen Konstruktionen sind präzise, es resultieren Catenane aus zyklischen DNA-Einzelsträngen. In gleicher Weise ermöglichte die topologische Kontrolle die Konstruktion von kleblattförmigen Knoten, von Knoten in Form der Zahl Acht sowie von borromäischen Ringen.

Welche Zukunft hat dieses Projekt? Es gibt noch mehrere Schlüsselprobleme, die gelöst werden müssen. Das erste davon ist die Konstruktion periodisch aufgebauter Verbindungen. Die vor kurzem gelungene Zusammenlagerung von zweidimensionalen Netzwerken ist ein sehr ermutigender Schritt in diese Richtung. Der Beweis, daß dies auch auf dreidimensionale Systeme ausgedehnt werden kann, steht jedoch noch aus. Außerdem sind die gegenwärtig erfolgreichen Zusammenlagerungen auf einfache DX-Moleküle beschränkt. Es ist uns zwar gelungen, DX-Moleküle in die Kanten von Dreiecken einzubauen, doch wurden diese Dreiecke noch nicht zu periodischen Gittern zusammengefügt. Der größte Nutzen dieses Systems ist sicher von Netzwerken auf der Basis von Dreiecken oder Deltaedern zu erwarten. Diese können höchstwahrscheinlich große Gastmoleküle einlagern, wodurch es zu einer Steuerung der Orientierung der Gastmoleküle innerhalb der Wirtsarchitektur kommt.

Die zweidimensionalen Felder, die aufgebaut wurden, haben keine regelmäßigen Ränder. Für Anwendungen, bei denen solche Komponenten zur organisierten Speicherung von Information genutzt werden sollen, muß auf bestimmte Positionen innerhalb eines Feldes gezielt zugegriffen werden können. Wohldefinierte Ränder sind dabei wahrscheinlich hilfreich. Reif hat vorgeschlagen, Rahmen aus singulären Molekülen zu verwenden, um dies zu erreichen.^[67] Solche Materialien sind wahrscheinlich sehr teuer, weil jede Komponente des Rahmens singulär sein muß.

Einige der Ziele, die für die DNA-Nanotechnologie definiert wurden, beinhalten auch die räumliche Organisation anderer Moleküle, wobei die architektonischen Eigenschaften der DNA genutzt werden. Man kann sich leicht chemische Szenarien vorstellen, die zu diesem Ergebnis führen, doch wurden bei der Umsetzung bislang nur wenige konkrete Fortschritte erzielt. Die vielleicht bemerkenswerteste programmierte Anheftung eines Proteins an DNA gelang Smith et al., die spezifische Cytosinmethylasen rund um ein DNA-Molekül anordneten.^[68] Weitere Fortschritte müssen bei der kovalenten Anknüpfung organischer Moleküle oder Polymere an das DNA-Rückgrat gemacht werden.

Viele Arbeitsgruppen untersuchen die Eigenschaften von DNA und entwickeln Systeme, mit denen sie für bioanalytische Zwecke hybridisiert oder zu Catenanen verbunden werden kann, doch es gab wenige Aktivitäten im Hinblick auf strukturelle Fragestellungen. Zum Glück ändert sich die Situation gegenwärtig. Mirkin et al.^[69] haben vor einiger Zeit für diagnostische Anwendungen^[70] DNA-Moleküle an kolloidales Gold gebunden, um damit Nanopartikel in eine makroskopische Matrix einzubetten. In ähnlicher Weise haben Alivisatos et al.^[71] DNA benutzt, um Goldnanokristalle organisiert anzurordnen. Niemeyer et al.^[72] hatten schon früher die Spezifität der DNA genutzt, um Proteinnetzwerke herzustellen. Shi und Bergstrom^[73] haben DNA-Einzelstränge an organische Linker gebunden, und Nielsen et al.^[74] arbeiten an DNA-Dendrimeren.

Die DNA-Nanotechnologie ist ein anwendungsorientiertes Gebiet. Die Festphasensynthese ist eine leistungsfähige Methode, um Polyeder-Objekte aus DNA zusammenzufügen. Wahrscheinlich ist DNA das einfachste System, um Zielmoleküle unter topologischen Gesichtspunkten zu konstruieren. Obwohl individuelle verzweigte Verbindungselemente flexibel sind, scheint das DX-Molekül ein DNA-Motiv mit genügender Strukturintegrität zu sein, um als Basis für periodisch aufgebaute Materialien zu dienen. Jüngste Erfolge bei der Herstellung zweidimensionaler periodischer Materialien bestätigen diese Annahme. Außerdem wird durch den Einsatz von DX-Molekülen in einer einfachen nanomechanischen Funktionseinheit bestätigt, daß dies die langgesuchten starren Komponenten sind, die benötigt werden, um die Eigenschaften der DNA so zu nutzen, wie sie es verdienen. Man kann hoffen, daß das neu verfügbare starre Motiv zusammen mit den schon früher genutzten nützlichen Eigenschaften schnelle Fortschritte auf diesem Gebiet ermöglichen. Zusammen mit den zunehmenden Aktivitäten aus anderen Labors lassen diese Entwicklungen vermuten, daß von der DNA-Nanotechnologie wesentliche Beiträge für das 21. Jahrhundert ausgehen werden.

Diese Arbeit wurde vom Office of Naval Research (N00014-98-1-0093), von den National Institutes of Health (GM-29554), von der National Science Foundation (NSF-CCR-97-25021) und vom Air Force Research Laboratory (F30602-98-C-0148) gefördert. Die in diesem Beitrag zusammengefaßten experimentellen Arbeiten wurden in unserem Labor an der New York University von Junghuei Chen, Yuwen Zhang, John Mueller, Shouming Du, Hui Wang, Tsu-Ju Fu, Yinli Wang, Xiaojun Li, Xiaoping Yang, Jing Qi, Bing Liu, Hangxia Qiu, Furong Liu, Chengde Mao, Weiqiong Sun, Ruojie Sha, Lisa Wenzler, Zhiyong Shen, Hao Yan, Man Hoi Wong, Phiset Sa-Ardyen und Siwei Zhang durchgeführt. Außerdem habe ich über Ergebnisse von Erik Winfree vom California Institute of Technology berichtet. Ihnen allen möchte ich für ihre Mitarbeit danken.

Eingegangen am 2. Januar 1998 [A268]
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] R. P. Feynman in *Miniatrization* (Hrsg: H. D. Gilbert), Reinhold Publishing, New York, **1961**, S. 282–296.
- [2] T. A. Jung, R. R. Schlittler, J. K. Gimzewski, H. Tang, C. Joachim, *Science* **1996**, *271*, 181–184.
- [3] M. D. Struthers, R. P. Cheng, B. Imperiali, *Science* **1996**, *271*, 342–345.
- [4] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237–247.
- [5] B. H. Robinson, N. C. Seeman, *Protein Eng.* **1987**, *1*, 295–300.
- [6] R. Saiki, T. L. Bugawan, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Ehrlich, *Nature* **1986**, *324*, 163–166.
- [7] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [8] H. Qiu, J. C. Dewan, N. C. Seeman, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 881–898.
- [9] S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, R. B. Helling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 3240–3244.
- [10] M. H. Caruthers, *Science* **1985**, *230*, 281–285.
- [11] N. C. Seeman, J. M. Rosenberg, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 804–808.
- [12] T. Lindahl, *Nature* **1993**, *362*, 709–715.
- [13] P. J. Hagerman, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1988**, *17*, 265–286.
- [14] P. E. Nielsen, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1995**, *24*, 167–183.
- [15] H. Wang, R. J. DiGate, N. C. Seeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 9477–9482.
- [16] R. Holliday, *Genet. Res.* **1964**, *5*, 282–304.
- [17] P. Hsieh, I. G. Panyutin in *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol. 9 (Hrsg.: F. Eckstein, D. M. J. Lilley), Springer, Berlin, **1995**, S. 42–65.
- [18] A. F. Wells, *Three-dimensional nets and polyhedra*, Wiley, New York, **1977**.
- [19] N. C. Seeman, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1990**, *8*, 573–581.
- [20] M. Lu, Q. Guo, L. A. Marky, N. C. Seeman, N. R. Kallenbach, *J. Mol. Biol.* **1992**, *223*, 781–789.
- [21] R.-I. Ma, N. R. Kallenbach, R. D. Sheardy, M. L. Petrillo, N. C. Seeman, *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 9745–9753.
- [22] Y. Wang, J. E. Mueller, B. Kemper, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5667–5674.
- [23] N. C. Seeman, N. R. Kallenbach in *Molecular Structure: Chemical Reactivity and Biological Activity* (Hrsg.: J. J. Stezowski, J.-L. Huang, M.-C. Shao), Oxford University Press, Oxford, **1988**, S. 189–194.
- [24] D. W. Sumners, *Math. Intelligencer* **1990**, *12*, 71–80.
- [25] N. C. Seeman, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1985**, *3*, 11–34.
- [26] N. C. Seeman, *J. Mol. Graphics* **1985**, *3*, 34–39.
- [27] M. L. Petrillo, C. J. Newton, R. P. Cunningham, R.-I. Ma, N. R. Kallenbach, N. C. Seeman, *Biopolymers* **1988**, *27*, 1337–1352.
- [28] B. Liu, N. B. Leontis, N. C. Seeman, *Nanobiology* **1994**, *3*, 177–188.
- [29] S. M. Miick, R. S. Fee, D. P. Millar, W. J. Chazin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 9080–9084.
- [30] T.-J. Fu, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3211–3220.

- [31] S. M. Du, S. Zhang, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1992**, *31*, 10955–10963.
- [32] H. Wang, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1995**, *34*, 920–929.
- [33] N. R. Kallenbach, R.-I. Ma, N. C. Seeman, *Nature* **1983**, *305*, 829–831.
- [34] D. Rodbard, A. Chrambach, *Anal. Biochem.* **1971**, *40*, 95–134.
- [35] T. D. Tullius, B. Dombroski, *Science* **1985**, *230*, 679–681; M. E. A. Churchill, T. D. Tullius, N. R. Kallenbach, N. C. Seeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 4653–4656.
- [36] T.-J. Fu, Y.-C. Tse-Dinh, N. C. Seeman, *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 91–105.
- [37] J. Chen, N. C. Seeman, *Nature* **1991**, *350*, 631–633; J. Chen, N. C. Seeman, *Electrophoresis* **1991**, *12*, 607–611.
- [38] J.-H. Chen, N. R. Kallenbach, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6402–6407.
- [39] Y. Zhang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2656–2663.
- [40] Y. Zhang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1661–1669.
- [41] J. Qi, X. Li, X. Yang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6121–6130.
- [42] X. Li, X. Yang, J. Qi, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6131–6140.
- [43] A. Schwacha, N. Kleckner, *Cell* **1995**, *83*, 783–791.
- [44] T.-J. Fu, B. Kemper, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3896–3905.
- [45] S. Zhang, T.-J. Fu, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1993**, *32*, 8062–8067; S. Zhang, N. C. Seeman, *J. Mol. Biol.* **1994**, *238*, 658–668; X. Li, H. Wang, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1997**, *36*, 4240–4247.
- [46] E. M. Everts, K. Rippe, T. M. Jovin, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3293–3303.
- [47] E. Winfree in *DNA Based Computing* (Hrsg.: E. J. Lipton, E. B. Baum), American Mathematical Society, Providence, RI, USA, **1996**, S. 199–219.
- [48] E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, N. C. Seeman, *Nature* **1998**, *394*, 539–544.
- [49] J. Kappraff, *Connections*, McGraw-Hill, New York, **1990**, S. 273.
- [50] H. L. Frisch, E. Wasserman, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 3789–3795.
- [51] J.-P. Sauvage, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 319–327; D. M. Walba, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 3161–3212; D. B. Amabilino, J. F. Stoddart, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2725–2828; R. Jäger, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 966–980; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 930–944; M. Fujita, F. Ibukuro, K. Yamaguchi, K. Ogura, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4175–4176; A. S. Lane, D. A. Leigh, A. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11 092–11 093, zit. Lit.
- [52] J. H. White, K. C. Millett, N. R. Cozzarelli, *J. Mol. Biol.* **1987**, *197*, 585–603.
- [53] N. C. Seeman, J. Chen, S. M. Du, J. E. Mueller, Y. Zhang, T.-J. Fu, H. Wang, Y. Wang, S. Zhang, *New J. Chem.* **1993**, *17*, 739–755; N. C. Seeman, *Mol. Eng.* **1992**, *2*, 297–307.
- [54] A. Rich, A. Nordheim, A. H.-J. Wang, *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 791–846.
- [55] J. E. Mueller, S. M. Du, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6306–6308.
- [56] S. M. Du, N. C. Seeman, *Biopolymers* **1994**, *34*, 31–37.
- [57] S. M. Du, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9652–9655; H. Wang, S. M. Du, N. C. Seeman, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1993**, *10*, 853–863.
- [58] S. M. Du, B. D. Stollar, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1194–1200.
- [59] E. Flapan, N. C. Seeman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 2249–2250.
- [60] S. M. Du, H. Wang, Y.-C. Tse-Dinh, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1995**, *34*, 673–682.
- [61] R. J. DiGate, K. J. Marians, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 20532–20535.
- [62] N. C. Seeman, *DNA Cell Biol.* **1991**, *10*, 475–486.
- [63] C. Mao, W. Sun, N. C. Seeman, *Nature* **1997**, *386*, 137–138.
- [64] C. Liang, K. Mislow, *J. Math. Chem.* **1994**, *16*, 27–35.
- [65] M. K. Gellert, K. Mizuchi, M. H. O'Dea, H. Ohmori, N. Tomizawa, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1978**, *43*, 33–40.
- [66] X. Yang, A. V. Vologodskii, B. Liu, B. Kemper, N. C. Seeman, *Biopolymers* **1998**, *45*, 69–83.
- [67] J. Reif, vorgetragen auf dem Third Annual DIMACS Workshop on DNA Based Computers, University of Pennsylvania, Philadelphia, **1997**.
- [68] S. S. Smith, L. Niu, D. J. Baker, J. A. Wendel, S. E. Kane, D. S. Joy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2162–2167.
- [69] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607–609.
- [70] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science* **1997**, *277*, 1078–1081.
- [71] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, Jr., P. G. Schultz, *Nature* **1996**, *382*, 609–611.
- [72] C. M. Niemeyer, T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5530–5539.
- [73] J. Shi, D. E. Bergstrom, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 70–72; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 111–113.
- [74] T. W. Nilsen, J. Grayzel, W. Prensky, *J. Theor. Biol.* **1997**, *187*, 273–284.
- [75] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1998**, im Druck.