



Reversible Rekonfiguration von DNA-Origami-Nanosystemen und deren Beobachtung mittels FRET-Einzelmolekülanalyse**

Barbara Saccà,* Yuji Ishitsuka, Rebecca Meyer, Andreas Sprengel, Elisa-Charlott Schöneweiß, G. Ulrich Nienhaus* und Christof M. Niemeyer*

Abstract: Die Methoden der DNA-Nanotechnologie gehören heutzutage zu den am weitesten fortgeschrittenen Verfahren zur räumlich und zeitlich kontrollierten Manipulation chemischer Systeme im Nanometerbereich. In der vorliegenden Arbeit konnten wir durch eine Kombination von DNA-Origami-Strukturen, welche räumlich definiert adressiert werden können, mit schaltbaren und dabei mechanische Bewegung auslösenden DNA-Motiven neuartige dynamisch rekonfigurierbare DNA-Nanokapselsysteme erzeugen. Die Dynamik des Systems wurde dabei durch eine reversible Streckung bzw. Kontraktion der zentralen Kavität in der DNA-Nanostruktur erzeugt und konnte mittels eines distanzabhängigen Energietransfers zwischen zwei in der Struktur integrierten Fluorophoren über FRET-Einzelmolekülanalysen gemessen werden. Interessanterweise zeigten diese Messungen, dass die Kinetik der einzelnen Umlagerungsprozesse stark von den verwendeten Strukturmotiven und/oder Aktuatorsequenzen abhängig war, wodurch eine besondere Eignung von FRET-Einzelmolekülanalysen zur Optimierung der Dynamikeigenschaften großer DNA-Nanostrukturen unterstrichen wird. Dabei glauben wir, dass die hier gezeigten DNA-Nanosysteme in der Zukunft als Modellstrukturen für artifizielle, biomimetische Kompartimente oder Transportsysteme dienen könnten.

DNA-Origami stellt zurzeit eine der leistungsstärksten Methoden zur Kontrolle der räumlicher Organisation chemischer Systeme im Nanometerbereich dar.^[1] Bei diesem Bottom-up-Verfahren wird ein langer DNA-Scaffold mithilfe von vielen komplementären, am Computer entworfenen kurzkettigen „Staple“-Oligonukleotiden in die gewünschte Form „gefaltet“. Da die Sequenz aller eingesetzten Staple-Oligonukleotide eindeutig definiert und ihre Bindeposition

an den Scaffold exakt berechnet werden kann, bieten DNA-Origamis die außergewöhnliche Möglichkeit, eine ca. zehntausend Quadratnanometer umfassende Oberflächenstruktur mit Sub-Nanometerpräzision zu adressieren. Diese Präzision ermöglicht somit neuartige Nanotechnologie-Anwendungen, die vorher nahezu undenkbar waren.^[2] Zur Analyse solcher DNA-Nanostrukturen werden zurzeit häufig moderne Einzelmoleküldetektionsverfahren, im Besonderen fluoreszenzbasierte Untersuchungen, verwendet, da diese Messungen unter zerstörungsfreien Bedingungen mit hohen Zeitaufösungen im Millisekunden-Bereich möglich sind.^[3]

Trotz vieler Fortschritte auf dem Gebiet der Nanotechnologie werden die meisten DNA-Nanostrukturen bisher hauptsächlich als statische Plattformen für die Untersuchung und Manipulation von molekularen Vorgängen eingesetzt.^[4] Insbesondere aus Naturbeobachtungen ist jedoch bekannt, dass eine präzise Kontrolle von zellulären Prozessen meist mittels dynamischer Strukturen erreicht wird. Solche Systeme zeichnen sich durch die Eigenschaft der reversiblen Rekonfiguration aus, wodurch diese z.B. auf wechselnde Umwelteinflüsse reagieren können. Bekannte Beispiele hierfür sind biologische Kompartimentsysteme wie Proteintransportkammern,^[5] virale Kapside,^[6] Lipidvesikel^[7] oder auch bakterielle Mikrokompimente.^[8] Inspiriert durch diese natürlich vorkommenden Systeme wurden daher bereits polyedrische DNA-Nanokammern zur Einkapsulierung oder als Transportsystem von molekularen „Frachten“ entwickelt;^[9] in einigen Fällen verfügten diese auch über die Fähigkeit der reversiblen Konfiguration.^[10] Diesen Konstrukten fehlte jedoch eine der grundlegenden Eigenschaften der DNA-Origami-Systeme, wie z.B. strukturelle Diversität oder anisotrope Adressierbarkeit. Eine Implementierung dyna-

[*] Dr. B. Saccà,^[†] A. Sprengel, E. C. Schöneweiß
Center for Nanointegration Duisburg-Essen (CENIDE) und Zentrum für Medizinische Biotechnologie (ZMB), Fakultät für Biologie, Universität Duisburg-Essen
Universitätsstraße 2, 45117 Essen (Deutschland)
E-Mail: barbara.sacca@uni-due.de

Dr. Y. Ishitsuka,^[‡] Prof. G. U. Nienhaus
Institut für Angewandte Physik
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Wolfgang-Gaede-Straße 1, 76131 Karlsruhe (Deutschland)
E-Mail: uli.nienhaus@kit.edu

Dr. R. Meyer, Prof. C. M. Niemeyer
Institut für Biologische Grenzflächen 1 (IBG 1)
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen (Deutschland)
E-Mail: niemeyer@kit.edu

Prof. C. M. Niemeyer
Institut für Toxikologie und Genetik (ITG)
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen (Deutschland)
Prof. G. U. Nienhaus
Department of Physics, University of Illinois at Urbana-Champaign
Urbana, IL 61801 (USA)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde von der Mercator-Stiftung (Pr. 2011-0004, B.S.), der DFG im Rahmen des SFB 1093 (Pr. A6, B.S.) und der Projekte Ni291/9-1 (G.U.N.) und Ni399/10-2 (C.M.N.) und dem KIT im Rahmen des Helmholtz-STN-Programms (G.U.N.) unterstützt. Wir danken Kathrin Jeske für die experimentelle Unterstützung bei den AFM-Imaging-Messungen.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201408941> zu finden.

mischer Elemente innerhalb Origami-basierter Kompartimentsysteme würde also neue Möglichkeiten in der DNA-Nanotechnologie schaffen. Bis heute wurde dieser Ansatz jedoch nur teilweise realisiert, da eine strukturelle Rekonfiguration von Origami-Systemen meist in einer irreversiblen Transformation zwischen topologisch verschiedenen Formen resultierte^[11] oder eine auftretende Konformationsänderung in der DNA-Struktur ohne Konsequenzen für eine molekulare „Fracht“ blieb.^[12] Deshalb stellt die Entwicklung eines biologisch inspirierten DNA-Kompartimentsystems, welches sowohl eine räumlich exakte Adressierung als auch eine reversible Dynamik der Beladung mit einer molekularen „Fracht“ ermöglicht, eine anspruchsvolle Herausforderung dar.

Hier beschreiben wir die Entwicklung eines reversibel rekonfigurierbaren, quasi-planaren DNA-Origami-Nanosystems, welches durch kontrollierte Streckung und/oder Kontraktion schaltbarer Elemente innerhalb der Struktur gesteuert wird. Die durch das Schalten ausgelöste Konformationsänderung bewirkt eine Veränderung der Größe der zentralen Kavität im Origami-Konstrukt, wodurch der Abstand zwischen zwei molekularen „Frachten“ in der Struktur kontrolliert verändert wird. Als molekulare „Frachten“ wurden hierzu zwei internalisierte Fluorophore verwendet, deren über eine Konformationsänderung ausgelöste räumliche Bewegung mithilfe von FRET-Einzelmolekülmessungen erfasst werden konnte. Dabei zeigte sich, dass die Kinetik des Prozesses stark von den eingesetzten Schaltmotiven und/oder Aktuatorsequenzen abhängig war.

Das Origami-Nanosystem wurde aus einer einzelsträngigen DNA des Virus M13mp18 erzeugt, welche in eine rechteckige Geometrie mit 90 nm Länge \times 65 nm Breite und einer inneren Kavität von ca. 20 nm \times 20 nm gefaltet wurde (Abbildung 1). Wie in den meisten planaren DNA-Origami-Konstrukten resultieren die zirkulären Faltungsmuster des Scaffolds in einer zweiteiligen Struktur, welche mittels speziell entworfener Staple-Sequenzen über eine gemeinsame Naht („Seam“) miteinander verbunden werden. In der vorliegenden Arbeit wurden nun die Seam-Sequenzen so konzipiert, dass diese intern eine 15 bp (Basenpaare) lange Hairpin-Region, bestehend aus einem 5 bp langen Stamm (C_5G_5) und einem T_5 -Loop enthielten (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Eine Hybridisierung der Hairpin-Sequenzen der Seam-Region mit einem komplementären DNA-Strang (hier bezeichnet als „Fuel“) führt somit zur Ausbildung einer stabileren, 15 bp langen, doppelsträngigen helikalen Domäne. Die Konformationsänderung der kompakten Hairpin-Struktur (geschlossener Zustand) zu einer ausge dehnten Doppelhelix (offener Zustand) induziert somit eine lineare Streckung der Struktur um ca. 5 nm entlang der helikalen Achse des Origami-Systems, wodurch sich zeitgleich die zentrale Kavität der Nanostruktur vergrößert (Abbildung 1).

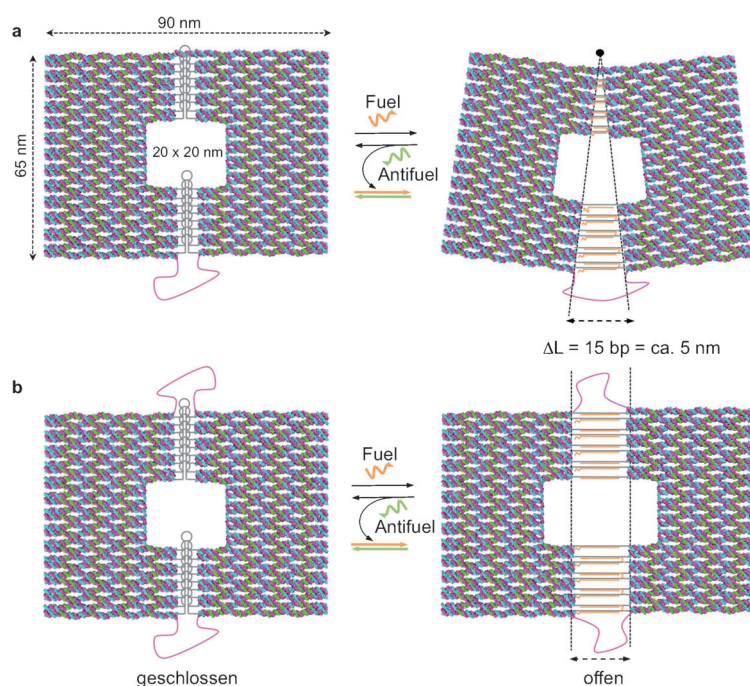


Abbildung 1. Schaltbare DNA-Origami-Systeme: a) Tweezer (Pinzetten) und b) Plug (Stecker). Die beiden Hälften der Konstrukte werden über Hairpin-Motive am Seam (Nahtregion) und über eine lange, ungefaltete Region des Scaffolds an den Enden der Struktur miteinander verbunden. Die An- oder Abwesenheit eines ungepaarten Segments des Scaffolds an der Oberseite der Origami-Struktur definiert die entsprechende Betriebsweise des Konstruktes als Tweezer (a) oder als Plug (b). Die DNA-induzierte Konformationsänderung der Hairpin-Motive in eine Doppelhelix wird durch die Zugabe komplementärer Fuel-Sequenzen (orange) induziert. Dies führt zu einer 5 nm langen Vergrößerung der zentralen Kavität (in Bezug zur helikalen Achse des Systems) (offener Zustand). Das Zurückschalten zum geschlossenen Urzustand wird durch Zugabe einer Hilfssequenz, gefolgt von der Zugabe einer vollständig komplementären Antifuel-Sequenz mit höherer Affinität (grün) erreicht. Die reversible Umschaltung der Konformation führt so zur Bildung von doppelsträngigen „Abfallprodukten“ am Ende jedes Zyklus.

Die vorliegende Studie beschreibt das Design von zwei verschiedenen Nanosystemen, deren Funktionsweisen – trotz eines analogen DNA-Hybridisierungs-basierten Fuel-Mechanismus – einer Tweezer(Pinzetten)- (a) oder einer Plug-(Stecker)-Bewegung (b) ähneln. Der Unterschied in der Betriebsweise der zwei Strukturen wird durch die Abwesenheit (im Falle des Tweezers) oder der Anwesenheit (im Falle des Plugs) einer ungepaarten Region des DNA-Scaffolds an der oberen Seite der Origami-Struktur bewirkt. Beim Tweezer bewirkt eine durchgehende Hybridisierung des Scaffolds mit den Staple-Sequenzen in der ersten helikalen Domäne des Origamis, dass die oberen beiden Hälften des Konstrukts miteinander verbunden bleiben. Die verbleibenden 281 ungepaarten Nukleotide des Scaffolds, die an der unteren Hälfte des Seams lokalisiert sind (magenta-farbende Region in Abbildung 1 a), erlauben demgegenüber eine auseinanderstrebende Bewegung der unteren Hälften nach Zugabe der DNA-Fuels. Dagegen beinhaltet das Plug-System zwei ungepaarte Regionen, die beide an den Enden der Seam-Region der Struktur lokalisiert sind. Diese Anordnung verleiht den zwei Hälften des DNA-Konstrukts einen höheren Bewegungsfreiheitsgrad (140 Basen am oberen bzw. 141 Basen am

unteren Ende der Struktur; Abbildung 1b). Eine reversible Veränderung des Systems lässt sich daher durch das Öffnen der internen Hairpin-Sequenzen durch Zugabe von bestimmten Fuel-Sequenzen (orange in Abbildung 1) bzw. das Schließen durch Zugabe von vollständig komplementären Antifuel-Sequenzen (grün) erreichen. Dabei zeigte sich im Experiment, dass die hierbei durchlaufenen Konformationsänderungen innerhalb einiger konsekutiver Zyklen vollständig reversibel sind (Abbildung 2 sowie Abbildungen S2 bis S4).

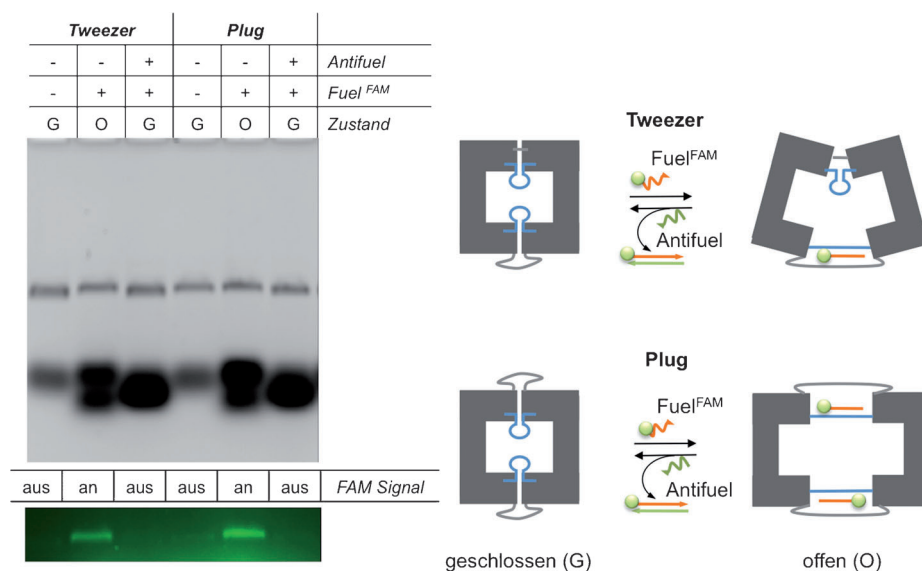


Abbildung 2. Funktionale Charakterisierung durch Gelelektrophorese der Tweezer- und der Plug-Konstrukte mittels Fluoreszenz-markierter Fuel-Sequenzen. Der geschlossene (G) sowie der offene (O) Zustand des Tweezer- (Reihe 1–3) und des Plug-Konstrukts (Reihe 4–6) migrieren als einheitliche und klar definierte Produkte. Dabei zeigen die einzelnen Konstrukte nur marginale Unterschiede in den Migrationsraten (oberes Gel). Die Fluorescein-Markierung der Fuel-Sequenz (Fuel^{FAM}, orange), die das Öffnen des Systems erlaubt, ermöglichte eine Charakterisierung der geöffneten Struktur mittels eines messbaren Fluoreszenzsignals (unteres Gel). Die optische „Aus“-Schaltung wurde durch Zugabe einer passenden Hilfssequenz, gefolgt von der Zugabe einer vollständig komplementären Antifuel-Sequenz (grün) erreicht. Gelparameter: 0.75 % Agarose in 1 × TBEMg, 80 V, 3 h, 4 °C; Detektion über eine Fluoreszenzmessung (Fluorescein-Filtereinstellungen) und UV- Bestrahlung vor und nach Ethidiumbromid-Färbung.

Die so entworfenen Origami-Systeme wurden mittels Gelelektrophorese, Rasterkraftmikroskopie (AFM) und FRET-Einzelmolekülanalyse untersucht. Die Gelelektrophorese-Untersuchungen belegten dabei, dass sowohl geschlossene (G) als auch offene (O) Konstrukte als einheitliche und klar definierte Banden im Gel wandern und die beiden Systeme nur minimale Unterschiede in ihrer elektrophoretischen Mobilität aufweisen (Abbildung 2, oberes Gel). Durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Fuel-Sequenzen konnte des Weiteren der geöffnete bzw. geschlossene Zustand des Systems durch die Anwesenheit bzw. Abwesenheit fluoreszierender Gelbanden eindeutig charakterisiert werden (Abbildung 2, unteres Gel). Dabei konnte die reversible Konfigurationsänderung für beide Systeme, d. h. das Tweezer- sowie das Plug-System, in bis zu drei konsekutiven Zyklen ohne einen ersichtlichen Abfall der Zykleneffizienz der Konstrukte gezeigt werden (Abbildung S2).

Anschließend Rasterkraftmikroskopie (AFM)-Analysen der Strukturen zeigten eine nahezu quantitative Ausbeute der Tweezer- (Abbildung 3a) bzw. Plug-DNA-Strukturen (Abbildung 3d). Bei einer genaueren Betrachtung der Bilder konnten des Weiteren doppelhelikale Bereiche identifiziert werden, welche durch die Zugabe der Fuel-Sequenzen entlang der zentralen Seam-Region entstanden sind (Abbildung 3b,e).

Dabei belegten in Übereinstimmung mit theoretischen Studien die statistischen Analysen der hochauflösenden

AFM-Bilder eine Verlängerung der offenen Strukturen um ca. 5 nm (Abbildung S5). Zur besseren Visualisierung der Anwesenheit der Hybridisierungs-Fuel-Sequenzen innerhalb der Origami-Strukturen wurden Biotin-markierte Fuel-Sequenzen und Streptavidin (STV) als topographische Marker verwendet. Wie erwartet befanden sich die STV-Moleküle, sichtbar als helle Punkte, in der zentralen Seam-Region (Abbildung 3c,f). Das Verschwinden der STV-Marker nach Hinzufügen der Antifuel-Sequenzen bewies dabei die reversible Schaltbarkeit der Struktur (Abbildungen S3 und S4). Die AFM-Analyse zeigte des Weiteren, dass die Ausbeuten des offenen und des geschlossenen Zustands bei beiden Systemen nach den verschiedenen Schaltprozessen und bei unterschiedlichen Fuel/Antifuel-Sequenzen bei annähernd 100 % liegen (Abbildungen S3 und S4).

Anschließend wurde FRET-Einzelmolekülspektroskopie verwendet, um die Funktionsweise des Plugs besser aufzulösen. Hierzu wurde eine 64 bp lange

Duplexsequenz, welche über eine zentrale Hairpin-Struktur mit gleicher Sequenz wie die Hairpin-Sequenzen der Seam-Region verfügt und durch ein Cy3-Cy5-Paar flankiert wurde, in die innere Kavität des Plug-Nanosystems integriert (Abbildung 4a und Abbildung S6 für Details zum Design). Die Länge der Duplexbrücke wurde dabei so gewählt, dass sie exakt mit der Distanz zwischen den zwei gegenüberliegenden inneren Seiten der Kammer übereinstimmte, um die statische Belastung der Struktur möglichst gering zu halten. Diese Anordnung sollte dazu führen, dass die mechanische Antwort des Systems auf die Zugabe der Fuel-Sequenzen auch bei Anwesenheit der Brücke unbeeinflusst bleibt und die innere Fluorophor-markierte Loopstruktur als Reporter für die translationale Bewegung des gesamten Systems verwendet werden kann. Die FRET-Einzelmolekülanalysen wurden mit Proben durchgeführt, welche durch Avidin-Biotin-Interaktionen auf Polyethylenglykol-beschichteten Glasplättchen

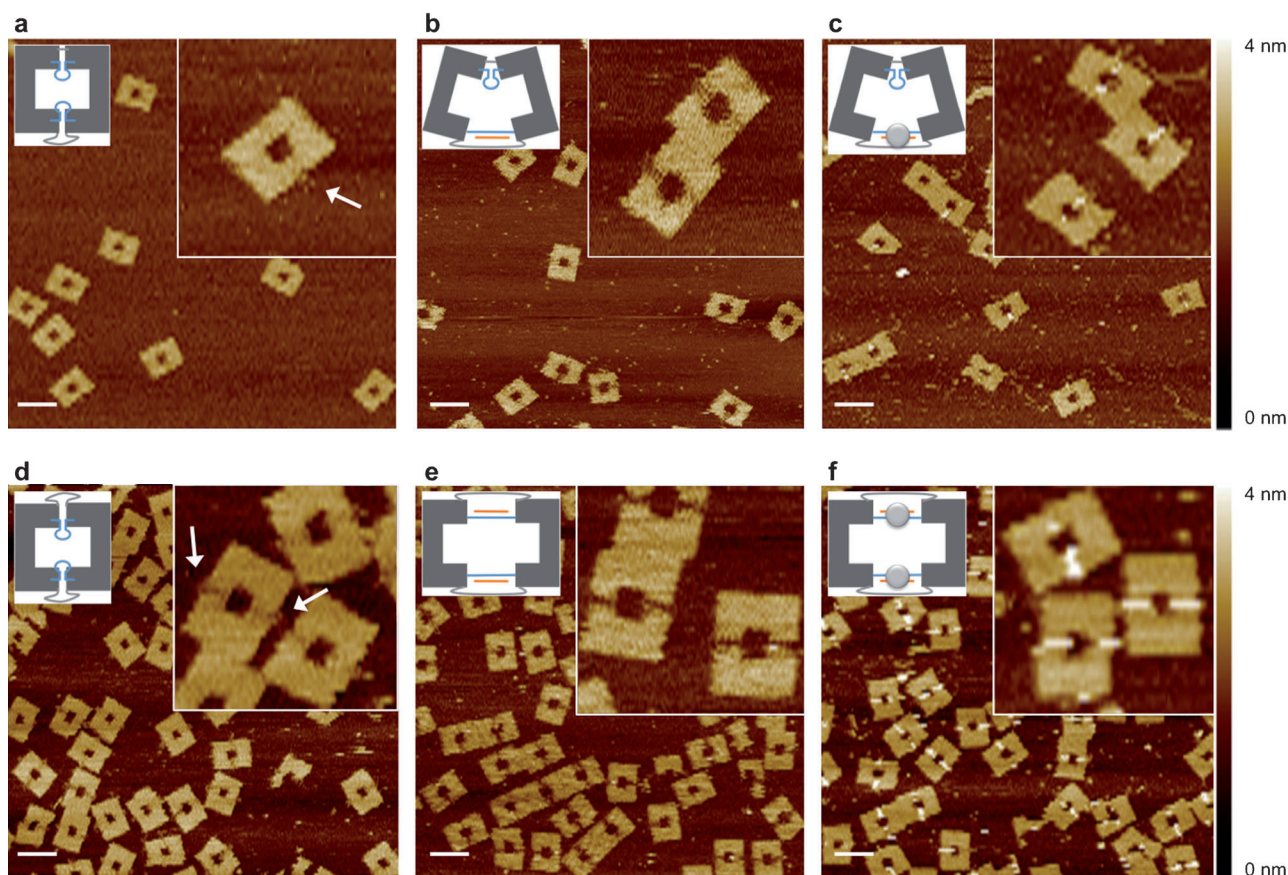


Abbildung 3. Rasterkraftmikroskopie (AFM)-Charakterisierung der Tweezer- (a–c) und der Plug-Struktur (d–f). Dabei sind die ungepaarten Regionen des DNA-Scaffolds auf einer oder auf beiden Seiten der geschlossenen Strukturen (weiße Pfeile in a und d) gut erkennbar. Die Zugabe der Fuel-Sequenzen zum ursprünglich geschlossenen Zustand (a für das Tweezer- und d für das Plug-System) löst ein Öffnen der Struktur (b bzw. e) aus. Die Verwendung von Biotin-modifizierten Fuel-Sequenzen, gefolgt von der direkten Zugabe des Proteins Streptavidin auf die Proben-tragende Glimmeroberfläche belegt dabei die erfolgreiche Hybridisierung der Fuel-Sequenzen an die Hairpin-Motive innerhalb der Seam-Region. Das Auftreten hellerer Stellen (Streptavidin-Bindung), welche hauptsächlich an einer (c) oder zwei (f) Seiten in der inneren Kavität auftritt, belegt die Zugänglichkeit der Seam-Sequenzen und die damit verbundenen Tweezer- bzw. Plug-Eigenschaften beider Strukturen. Zur Verdeutlichung ist zusätzlich noch ein Schema der bevorzugten Konformation an der Seam-Region durch einen Loop für eine geschlossene (G) bzw. ein Paar paralleler Segmente für eine offene (O) Konformation dargestellt. Eine Bindung von Streptavidin an die Biotin-markierten Fuel-Sequenzen wird durch einen grauen Kreis gekennzeichnet. Details über die topographischen Eigenschaften der Strukturen werden in der Vergrößerung deutlich. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 100 nm.

immobilisiert wurden. Hierzu wurden Biotin-Einheiten in die linke Seite der Origami-Strukturen eingebracht, sodass eine translationale Bewegung entlang der X-Achse des Origami nicht beeinträchtigt wird (Abbildung 4a). Die Experimente wurden insgesamt an vier Plug-Systemen durchgeführt (Abbildung 4b, Abbildungen S7–S9): Neben dem ursprünglichen Konstrukt (I, Abbildung 4b) wurden dabei drei weitere Konstrukte verwendet, um den Effekt der Loop-Länge (II, Abbildung S7) und der unterschiedlichen Fuel-Sequenzen (III und IV, Abbildung S8 und S9) auf die Kinetik des Öffnungs-/Schließ-Prozesses zu untersuchen.

Für alle analysierten Systeme belegte eine Auswertung der FRET-Populationsverteilung, welche nach ausgewählten Zeitintervallen bestimmt wurde, eine homogene Antwort der Nanostruktur. Dies bedeutet, dass fast alle Strukturen dazu in der Lage waren, sich schnell strukturell zu rekonfigurieren, was z.B. durch den großen und relativ schmalen Peak bei jedem Messpunkt verdeutlicht wird (Abbildung 4b und Ab-

bildung S7–S9). Darüber hinaus belegte diese Analyse, dass der Übergang vom geschlossenen zum offenen Zustand vollständig unter einer ca. 60 %-igen Veränderung der FRET-Effizienz ablief, entsprechend einem Ausgangswert von 0.67 ± 0.07 (geschlossen; Abbildung 4b, linke Teilabbildung) und einem Endwert von 0.12 ± 0.10 (offen; Abbildung 4b, mittlere Teilabbildung und Abbildungen S7a–S9a). Die damit verbundene Distanzverschiebung des Donor-Akzeptor-Cy3-Cy5-Fluorophorenpaars (Förster-Radius $R_0 = 5.6$ nm)^[13] lag bei ca. 4 nm (ca. 12 bp), was sehr gut mit der berechneten translationalen Änderung während der Loop-zu-Duplex-Umlagerung korreliert. Erfreulicherweise war bei allen analysierten Konstrukten die Konformationsänderung reversibel, wie durch den hohen FRET-Effizienz-Peak von ca. 0.7 nach Wiederherstellung des geschlossenen Stadiums durch Zugabe der Antifuel-Sequenzen ersichtlich wurde (Abbildung 4b, rechtes Panel und Abbildungen S7b–S9b). Die volle Umkehrbarkeit des Prozesses konnte über drei konsekutive

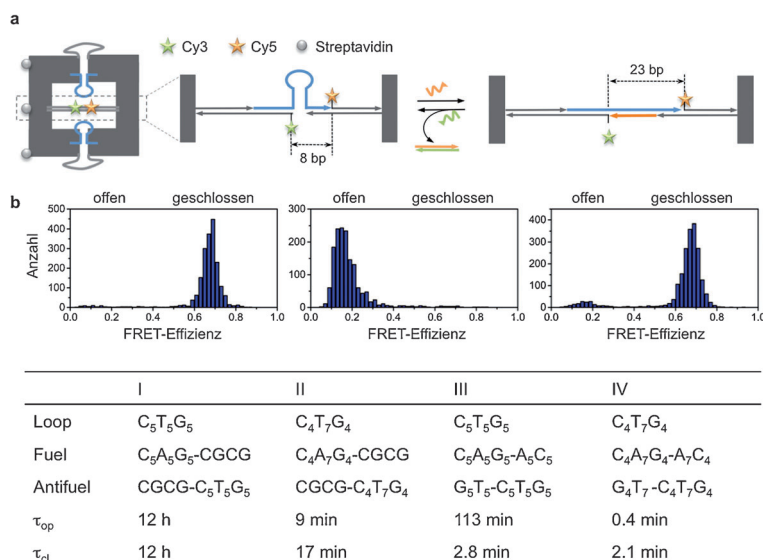


Abbildung 4. FRET-Einzelmolekül-Charakterisierung des Plug-Systems. Die translationale Bewegung der Struktur entlang der X-Achse wird als eine Änderung des FRET-Signals zwischen dem Donor (Cy3)- und Akzeptor (Cy5)-Fluorophorenpaar gemessen, welche innerhalb der zentralen Kavität positioniert sind (a). Die repräsentativen FRET-Histogramme des geschlossenen (b, linke Teilabbildung), offenen (b, mittlere Teilabbildung) und dem wieder geschlossenen Zustand (b, rechte Teilabbildung) des DNA-Origamis (Konstrukt I) belegen dabei eine homogene, mechanische Antwort der Proben sowie die Vollständigkeit und Reversibilität des Prozesses. Vier verschiedene Plug-Konstrukte (bezeichnet als I, II, III und IV) mit identischer Markierungsposition innerhalb der zentralen Kavität der Kammer (wie in a) und mit verschiedenen Sequenzen in der Loopsequenz und/oder den Fuel/Antifuel-Sequenzen wurden insgesamt untersucht (siehe Tabelle). Die dazugehörigen Geschwindigkeitskoeffizienten für den Öffnungs- (τ_{op}) und den Schließprozess (τ_{cl}) wurden dabei aus den kinetischen Analysen erhalten (Abbildungen S7–S9).

Zyklen für das Konstrukt IV (Abbildung S10) beobachtet werden. Nur ca. 11 % der offenen Systeme schalteten nicht wieder in den geschlossenen Zustand. Dieser Befund lässt sich z.B. durch eine sterische Unzugänglichkeit der ganzen Fuel-Sequenzen oder der Teilbereiche, welche für die Anlagerungen der Antifuel-Sequenzen notwendig sind, erklären. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch erhalten, wenn das Fluorophorenpaar an leicht abweichende Positionen innerhalb der inneren Brücke angebracht wurde oder bei Ersatz der zentralen Brückensequenz durch eine willkürliche DNA-Sequenz (Abbildung S11), die nicht komplementär zur Fuel-Sequenz ist (Abbildung S12). FRET-Populationsverteilungen aus frei diffundierenden Origami-Konstrukten^[14] zeigten auch vergleichbare Histogramme wie oberflächenimmobilisierte Proben (Abbildung S13). Diese Messungen liefern somit deutliche Hinweise dafür, dass die Veränderung der beobachteten FRET-Effizienz bei allen analysierten Systemen nicht nur von der lokalen Konformationsänderung der zentralen inneren Brücke verursacht wird, sondern durch eine globale Strukturänderung des gesamten DNA-Origami-Systems in Lösung oder auf der Oberfläche bewirkt wird.

Interessanterweise zeigten zeitabhängige FRET-Untersuchungen jedoch, dass die Kinetik des Öffnungs- bzw. des Schließprozesses der vier analysierten Konstrukte stark voneinander abwich. Das Öffnen des Konstruktes I konnte erst nach 12 h Inkubation bei Raumtemperatur nach Anlagerung

der Fuel- bzw. Antifuel-Sequenzen bei mittlerer Temperatur erreicht werden (Abbildung 4b). Eine Verringerung der Stabilität der Hairpin-Motive durch eine Erhöhung des AT- gegenüber dem GC-Basenpaargehalt bewirkte dabei eine deutliche Beschleunigung des Schaltprozesses. Unter diesen Bedingungen konnte eine volle Ausdehnung der Struktur bereits nach einer Stunde erreicht werden (II, Abbildung S7). Zudem konnte eine Konformationsänderung auch bei Raumtemperatur unter Verwendung der Loop-Sequenz C₅T₅G₅ (wie in I) erreicht werden, wenn die Fuel-Sequenz um eine leicht längere Stützsequenz („toehold sequence“) verlängert wurde (III, Abbildung S8). Die verlängerte Sequenz bewirkte dabei eine Destabilisierung des Hairpin-Motivs und unterstützt somit die Loslösung in der Struktur interagierender Loops (Abbildung S14).^[15] Diese beiden Designs konnten miteinander kombiniert werden (Konstrukt IV, Abbildung S9), wodurch eine 23-fache bzw. 283-fache Beschleunigung der Öffnungsrate verglichen mit Konstrukt II bzw. III erreicht wurde. Der Prozess des erneuten Schließens der Struktur führte zu ähnlichen Ergebnissen, auch wenn die Effekte insgesamt weniger deutlich waren. Zusammengefasst demonstrieren diese Ergebnisse deutlich, dass nur minimale Änderungen im Design der Umschaltmotive und/oder der Aktuatorsequenzen der Seam-Region großen Einfluss auf die freie Energiebarriere des Öffnungs- bzw. Schließprozesses nehmen und somit auch ihre Kinetik beeinflussen. Somit kann eine Feineinstellung dieser Sequenzen eine interessante

Strategie zur Optimierung veränderbarer Nanokammern darstellen.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass ein zyklisches, paralleles Schalten an mehreren Sequenzstellen eine präzise Bewegung großer DNA-Origami-Strukturen ermöglicht. Dieser Prozess kann nicht nur für eine kontrollierte und reversible Schaltung eines Systems verwendet werden, sondern kann auch auf eine molekulare „Fracht“ übertragen werden, wie in dieser Arbeit durch eine Veränderung des distanzabhängigen Energietransfer zwischen zwei in die Struktur eingebrachten Fluorophoren gezeigt werden konnte. In noch vorläufigen Studien konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die zentrale Kavität der Nanokammer individuell in ihrer Größe und einer räumlich definierten Anbringung von Liganden für Proteinbindungen angepasst werden kann (Abbildung S15 und S16). Verglichen mit vorhergehenden statischen Systemen bieten die rekonfigurierbaren Konstrukte somit z.B. neue Optionen für die dynamische Reorganisation von Proteinen.^[16] Eine Erweiterung des gezeigten Designprinzips auf 3D-Strukturen (Abbildung S17) würde des Weiteren die Entwicklung komplexerer DNA-Nanosysteme ermöglichen, die nicht nur über die charakteristische molekulare Adressierbarkeit von DNA-Origamis, sondern auch die angepassten dynamischen Eigenschaften kleiner DNA-Motive verfügen. Es wird erwartet, dass solche Strukturen für die Konstruktion dynamischer DNA-Protein-

Nanosysteme verwendet werden können, welche z.B. zur Simulation und Erkundung komplexer biologischer Prozesse in lebenden Systemen Einsatz finden könnten.

Eingegangen am 9. September 2014,
veränderte Fassung am 12. November 2014
Online veröffentlicht am 29. Januar 2015

Stichwörter: DNA-Origami · Einzelmolekül-FRET-Messungen · Rasterkraftmikroskopie · Selbstassemblierung · Strukturelle Rekonfiguration

- [1] a) P. W. Rothemund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302; b) S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Hogberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **2009**, *459*, 414–418; c) W. M. Shih, C. Lin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 276–282; d) T. Tørring, N. V. Voigt, J. Nangreave, H. Yan, K. V. Gothelf, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5636–5646; e) B. Saccà, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 58–66; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 60–69.
- [2] A. Rajendran, M. Endo, H. Sugiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 874–890; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 898–915.
- [3] a) R. Tsukanov, T. E. Tomov, M. Liber, Y. Berger, E. Nir, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1789–1798; b) R. Tsukanov, T. E. Tomov, R. Masoud, H. Drory, N. Plavner, M. Liber, E. Nir, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 11932–11942; c) M. B. Scheible, G. Pardatscher, A. Kuzyk, F. C. Simmel, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 1627–1633; d) A. Johnson-Buck, N. G. Walter, *Methods* **2014**, *67*, 177–184; e) R. Jungmann, C. Steinhauer, M. Scheible, A. Kuzyk, P. Tinnefeld, F. C. Simmel, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 4756–4761; f) G. P. Acuna, F. M. Moller, P. Holzmeister, S. Beater, B. Lalkens, P. Tinnefeld, *Science* **2012**, *338*, 506–510; g) D. Koirala, P. Shrestha, T. Emura, K. Hidaka, S. Mandal, M. Endo, H. Sugiyama, H. Mao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8251–8254; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 8391–8395; h) T. E. Tomov, R. Tsukanov, M. Liber, R. Masoud, N. Plavner, E. Nir, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11935–11941; i) J. Fu, Y. R. Yang, A. Johnson-Buck, M. Liu, Y. Liu, N. G. Walter, N. W. Woodbury, H. Yan, *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9*, 531–536.
- [4] a) M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1592–1597; b) M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9412–9416; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9602–9606; c) J. Fu, M. Liu, Y. Liu, N. W. Woodbury, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5516–5519; d) S. Yamamoto, D. De, K. Hidaka, K. K. Kim, M. Endo, H. Sugiyama, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 2286–2292.
- [5] a) E. C. Theil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 304–311; b) C. M. Soto, B. R. Ratna, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 426–438.
- [6] A. J. Douglas, J. A. Young, *Nature* **1998**, *393*, 152–155.
- [7] S. M. Nomura, K. Tsumoto, T. Hamada, K. Akiyoshi, Y. Nakatani, K. Yoshikawa, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1172–1175.
- [8] C. A. Kerfeld, S. Heinhorst, G. C. Cannon, *Annu. Rev. Microbiol.* **2010**, *64*, 391–408.
- [9] a) A. Banerjee, D. Bhatia, A. Saminathan, S. Chakraborty, S. Kar, Y. Krishnan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6854–6857; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6992–6995; b) R. Crawford, C. M. Erben, J. Periz, L. M. Hall, T. Brown, A. J. Turberfield, A. N. Kapanidis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2284–2288; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2340–2344.
- [10] R. P. Goodman, M. Heilemann, S. Doose, C. M. Erben, A. N. Kapanidis, A. J. Turberfield, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 93–96.
- [11] a) D. Han, S. Pal, Y. Liu, H. Yan, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 712–717; b) A. Kuzuya, Y. Sakai, T. Yamazaki, Y. Xu, M. Komiyama, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 449; c) S. M. Douglas, I. Bachelet, G. M. Church, *Science* **2012**, *335*, 831–834.
- [12] a) M. Marini, L. Piantanida, R. Musetti, A. Bek, M. Dong, F. Besenbacher, M. Lazzarino, G. Firrao, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 5449–5454; b) R. M. Zadegan, M. D. Jepsen, K. E. Thomsen, A. H. Okholm, D. H. Schaffert, E. S. Andersen, V. Birkedal, J. Kjems, *ACS Nano* **2012**, *6*, 10050–10053; c) E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, J. Kjems, *Nature* **2009**, *459*, 73–76.
- [13] a) C. R. Sabanayagam, J. S. Eid, A. Meller, *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 061103; b) R. Roy, S. Hohng, T. Ha, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 507–516.
- [14] R. Rieger, G. U. Nienhaus, *Chem. Phys.* **2012**, *396*, 3–9.
- [15] J. S. Bois, S. Venkataraman, H. M. Choi, A. J. Spakowitz, Z. G. Wang, N. A. Pierce, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4090–4095.
- [16] a) Y. Suzuki, M. Endo, Y. Katsuda, K. Ou, K. Hikada, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 211–218; b) Y. Suzuki, M. Endo, C. Cañas, S. Ayora, J. C. Alonso, H. Sugiyama, K. Takeyasu, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 7421–7428.