

Selbstassemblierende DNA-Netzwerke

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Alexander Huhle

geboren am 01.03.1978 in Dresden

eingereicht an der Fakultät Maschinenwesen

der Technischen Universität Dresden

2008

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. W. Pompe
Technische Universität Dresden

2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. M. Mertig
Technische Universität Dresden

3. Gutachter: Herr Prof. Dr. F. Kremer
Universität Leipzig

Eingereicht am: 30.06.2008

Verteidigt am: 20.02.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Aufbau von DNA	5
2.2	Biegung von DNA	8
2.3	Stabilität von DNA	14
2.4	Modifizierung von DNA	17
2.5	Verzweigungen und Netzwerke aus DNA	20
2.5.1	DNA-Verzweigungen	20
2.5.2	Seeman'sches Konstruktionsprinzip	22
2.5.3	Bausteine und Netzwerke aus DNA	23
2.6	Funktionalisierung und Metallisierung von DNA	32
3	Methoden zum Aufbau von künstlichen DNA-Strukturen	37
3.1	Entwurf von DNA-Bausteinen	37
3.2	Entwurf von DNA-Netzwerken und deren Funktionalisierung	44
3.3	Synthese	48
3.4	Analyse der Strukturen	49
3.4.1	Untersuchung einzelner Bausteine	49
3.4.2	Atomkraftmikroskopie in der Flüssigkeit	55
4	Netzwerke mit DNA	61
4.1	Einfache Verzweigungen als Grundelemente für den Aufbau von Netzwerken	61
4.2	Ein- und zweidimensionale Netzwerke aus DX-Elementen	69
4.3	Gitter und Röhren aus 4x4-Kacheln	72
4.4	Verknüpfung von DX-Elementen zu Dreibeinen	76
5	Einfluß der Basensequenz auf die Bausteingeometrie	85
5.1	Einfluß innerhalb eines Bausteins	86
5.2	Einfluß auf die Verknüpfung von Bausteinen	90
6	Metallisierung	101
6.1	DNA-Netzwerk für die Metallisierung	103

6.2	Aktivierung von DNA in Salzlösungen	105
6.3	Metallisierung der Netzwerke	107
6.4	Metallisierung eines immobilisierten DNA-Netzwerkes	110
7	Zusammenfassung und Ausblick	114
A	Anhang	119
A.1	Gelelektrophorese	119
A.2	DNA-Oligonukleotide	119
A.3	Herstellung der Verzweigungen	122
A.4	Fluoreszenzmikroskopie	127
	Publikationen	128
	Literatur	129
	Danksagung	138

1 Einleitung

Die Miniaturisierung ist in vielen Bereichen ein wesentlicher Aspekt in der technischen Entwicklung. Am deutlichsten ist dies in der Mikroelektronik zu sehen. Bisher dominiert bei der Herstellung von Schaltkreisen das *Top-down*-Verfahren, bei dem die gewünschten Strukturen aus einem größeren Block herausgearbeitet werden. Mit immer kleineren Strukturgrößen, die bei der Mikroelektronik heute im Bereich von einigen 10 nm liegen, wird das Verfahren jedoch immer aufwendiger [1]. Einen anderen Weg, um Strukturen aufzubauen, bietet das *Bottom-up*-Verfahren. Bei diesem Verfahren werden die Strukturen aus molekularen Bausteinen zusammengesetzt. Ausgehend von einigen einfachen Bausteinen erfolgt ein schrittweiser Aufbau zu immer komplexeren Strukturen. Günstig ist es, wenn sich die Strukturen selbst zusammenbauen. Ob eine solche Möglichkeit zur Selbstorganisation besteht, hängt im wesentlichen von den verwendeten Bausteinen ab. Die besten Vorbilder für das *Bottom-up*-Verfahren findet man in der Natur. Hier werden z.B. Aminosäuren zu Proteinen aneinandergereiht, welche sich wiederum zu Proteinkomplexen zusammenlagern können. Bei Lebewesen sind fast alle Proteine, wie z.B. Enzyme und Strukturproteine, aus nur 21 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut. Dieses Beispiel zeigt die große mögliche Vielfalt, die durch Selbstorganisation mit dem *Bottom-up*-Verfahren erreichbar ist. Es ist aber auch erkennbar, daß bei der großen Anzahl an unterschiedlichen Möglichkeiten der Aufbau von Strukturen gezielt erfolgen muß, damit am Ende das gewünschte Ergebnis entsteht.

Bausteine aus der Natur, wie Biomoleküle, sind auch mit dem Ziel einer späteren Anwendung für die Forschung geeignet. Sie bringen die Möglichkeit der Selbstorganisation bereits mit und dienen daher häufig als Vorlage. Solche bereits arbeitenden Systeme können in ihrer Funktionsweise studiert und auf bestimmte Bedürfnisse angepaßt werden. Das ist momentan einfacher als eine komplette Neuentwicklung von selbstorganisierenden Systemen. Große Fortschritte in der Molekularbiologie in den vergangenen Jahren und Jahrzehnten ermöglichen heute die Herstellung und Nutzung einer immer breiter werdenden Anzahl an Biomolekülen. Ein besonders geeignetes Biomolekül ist die Desoxyribonukleinsäure. Die dafür normalerweise verwendete Abkürzung DNA stammt von dem englischen Begriff *deoxyribonucleic acid* ab. Der Durchmesser der Doppelhelix der DNA beträgt ca. 2 nm und liegt damit in einem für die Nanotechnologie interessanten Bereich. Die Länge kann mehrere Millimeter betragen [2]. Der Aufbau der DNA aus komplementären Basen ermöglicht

eine molekulare Erkennung, welche Voraussetzung für die Selbstassemblierung ist. Die Doppelhelix der DNA entspricht einer eindimensionalen Struktur, welche aus nur vier verschiedenen Grundbausteinen (Nukleotiden) besteht. Das ermöglicht im Vergleich zu Proteinen eine relativ einfache Vorhersagbarkeit der Struktur. Ein weiterer Vorteil ist die gute Verfügbarkeit. Durch Nutzung in der Biotechnologie, speziell in der Gentechnik, wurden die Verfahren zur DNA-Herstellung immer weiter entwickelt. So sind heute bis über 100 Basen lange DNA-Oligonukleotide herstellbar. Auch die gezielte Funktionalisierung von einzelnen Basen mit anderen Molekülen ist möglich. Der Basenabstand von 3,4 Å entspricht dabei prinzipiell der möglichen Genauigkeit für die Platzierung von Funktionalisierungen entlang des Moleküls. Eine gezielte Anbindung von DNA an Oberflächen oder anderen Strukturen ist möglich.

In der Natur kommt die DNA vor allem als lineares Molekül vor. Für technische Anwendungen sind mit Netzwerken aus DNA allerdings größere Anwendungsbereiche denkbar. Zum Aufbau von Netzwerken benötigt man jedoch auch Verzweigungen. 1964 wurde die 4-Arm-DNA-Verzweigung von R. Holliday als Zwischenstadium bei genetischem Informationsaustausch in der Hefe postuliert. Diese später nachgewiesene Verzweigung wird deshalb auch als *Holliday Junction* bezeichnet [3]. Für den Aufbau künstlicher Strukturen ist diese natürlich vorkommende Verzweigung nicht geeignet. Sie ist nicht stabil, da der Verzweigungspunkt entlang der Helix wandern kann. Wandert der Verzweigungspunkt ans Ende der Verzweigung, bilden sich zwei separate Doppelhelices [4].

Erste Forschungsarbeiten zum Aufbau künstlicher Verzweigungen mit DNA wurden von N. C. Seeman durchgeführt. Er entwickelte Verzweigungen mit fixiertem Verzweigungspunkt, deren optimierte Basensequenz er mit einem Computerprogramm berechnete [5]. Es konnten so erstmals künstliche 3-Arm- [6], 4-Arm- [7] sowie 5- und 6-Arm-Verzweigungen [8] experimentell erzeugt werden. Künstliche Verzweigungen lassen sich durch Anbindung von DNA-Doppelsträngen verlängern [9].

Mit künstlichen Verzweigungen ist die Möglichkeit zum Aufbau von Netzwerken gegeben. Ein wesentliches Problem, welches zum Aufbau von regelmäßigen DNA-Netzwerken gelöst werden muß, ist die Erhöhung der Steifigkeit der Doppelhelix. Ein zweites Problem ist die hohe Flexibilität in den Verzweigungspunkten [6]. Eine Lösung der Probleme wurde mit dem *Double Crossover-Element* (DX-Element) erzielt [10]. Mit diesem steifen Element lassen sich ein- [11], zwei- [12] und dreidimensionale [13] DNA-Strukturen aufbauen. Grundprinzipien aus dem Design des

DX-Elementes findet sich in vielen der später hergestellten Bauelemente, wie z.B. TX-Element [14], 4x4-Kachel [15], 3-Helix-Bündel [16] und 6-Helix-Bündel [17] wieder. In den letzten Jahren wurden immer komplexere Bausteine und Netzwerke aufgebaut [18]. Grundlegende Prinzipien des Netzwerkaufbaus sind auch beim Aufbau von molekularen Maschinen und dem "Rechnen mit DNA" einsetzbar.

Ziel dieser Arbeit ist, verschiedene Gestaltungsmöglichkeiten für selbstassemblierende DNA-Netzwerke zu untersuchen. Dazu werden hier bewußt einfach gehaltene Bausteine und Netzwerke verwendet, bei denen eine anschließende Modifizierung leicht möglich ist. Eine methodische Herleitung der zum Aufbau der Netzwerke notwendigen maßgeschneiderten DNA-Oligonukleotide läßt sich über eine schrittweise gedankliche Zerlegung einer vorgegebenen Struktur erreichen. Die Selbstassemblierung der DNA-Oligonukleotide erfolgt über eine Hybridisierung zu Bausteinen, welche wiederum über *sticky ends* verbunden sind. Die Charakterisierung der Netzwerke erfolgt im wesentlichen mittels Atomkraftmikroskopie (*Atomic force microscopy*, AFM) in der Flüssigkeit.

Eine wesentliche Gestaltungsmöglichkeit bei Netzwerken ist eine Modifizierung der Verbindung von Bausteinen, welche am Beispiel der Zusammenlagerung von drei DX-Elementen zu einem Dreibein untersucht wird. Geringe Änderungen können hier zu komplett anderen Strukturen führen, z.B. wird durch das Vertauschen zweier *sticky ends* an einem DX-Element statt eines ein- ein zweidimensionales Netzwerk gebildet. An eine hybridisierte Struktur lassen sich mehrere Mikrometer lange DNA-Doppelstränge anbringen. Dazu werden neben der Hybridisierung Methoden zur Manipulation von DNA mit Enzymen eingesetzt. Die Zusammenlagerung von Bausteinen zu unterschiedlichen Netzwerken läßt sich auch über die Hybridisierung steuern. Dies wird am Beispiel der Bildung von Röhren oder zweidimensionalen Netzwerken mit 4x4-Kacheln untersucht.

Für weitere Gestaltungsmöglichkeiten wird in dieser Arbeit der Blick auf zusätzliche Eigenschaften der Basen gerichtet, wie z.B. die sequenzabhängige Basenstapelung in der Helix. Als neues Element zur Bausteingestaltung wird untersucht, ob man DNA-Sequenzen, welche eine Biegung aufweisen, für den Aufbau von Netzwerken verwenden kann. Untersuchungen an aufgebauten Strukturen zeigen, daß die DNA-Sequenzen Änderungen in den Netzwerken hervorrufen, die Biegung jedoch deutlich geringer als erwartet ist.

Eine Motivation für die Weiterentwicklung der Netzwerke ist es, über das *Bottom-up*-Verfahren später einmal Schaltkreise abbilden zu können. Eine

nachträgliche Metallisierung der Netzwerke ermöglicht leitfähige Strukturen, es müssen allerdings zusätzliche Anforderungen an die Bausteine gestellt werden. In dieser Arbeit wird die Metallisierung eines DNA-Netzwerkes mit zwei bisher für die Metallisierung von λ -DNA verwendeten Methoden [19, 20] untersucht. Mit beiden Methoden lassen sich Cluster unter 10 nm Durchmesser erzeugen, allerdings wird dabei die durch das Netzwerk vorgegebene Struktur häufig geknickt bzw. aufgelöst.

Die Grundlagen zum Aufbau der DNA, der DNA-Biegung sowie der Metallisierung von DNA werden im Kapitel 2 behandelt. Es wird ein Überblick gegeben, welche Bausteine und Netzwerke bereits hergestellt wurden. In Kapitel 3 wird erläutert, wie aus einer vorgegebenen Zielstruktur die zum Aufbau dieser Struktur notwendigen DNA-Oligonukleotide abgeleitet werden können. Es wird außerdem auf die verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Baustein- und Netzwerkcharakterisierung eingegangen. In Kapitel 4 werden die Gestaltungsmöglichkeiten für Netzwerke an konkreten Beispielen untersucht. Die wesentlichen Untersuchungsgegenstände sind der Anbau von Verlängerungen, der Einfluß der Hybridisierung und Modifizierungen im Baustein, welche die Zusammenlagerung beeinflussen. Untersuchungsgegenstand in Kapitel 5 ist die Möglichkeit zum Einbau von gebogenen Abschnitten in DNA-Netzwerke. In Kapitel 6 wird die Metallisierung von DNA-Netzwerken am Beispiel einer eindimensionalen Struktur beschrieben. In Kapitel 7 erfolgen die Zusammenfassung und ein Ausblick.

2 Grundlagen

2.1 Aufbau von DNA

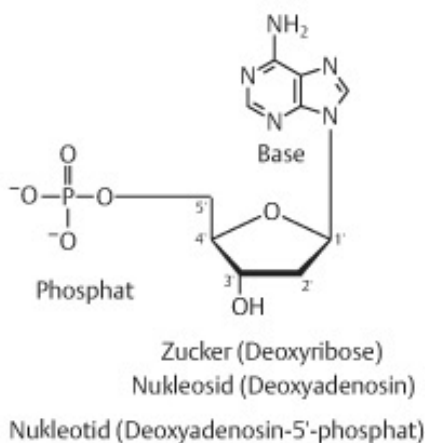


Abbildung 1: Nucleotid, bestehend aus Base, Zucker und Phosphatrest. Die Base hängt am C1'-Atom des Zuckers und der Phosphatrest ist an das C5'-Atom gebunden. Eine Verbindung, welche nur aus Base und Zucker besteht, heißt Nucleosid. *Abb. aus [21].*

Die Grundbausteine der DNA sind die Nucleotide. Diese bestehen aus einem Zucker (Deoxyribose), einem Phosphatrest und einer organischen Base (Abbildung 1). Der Phosphatrest befindet sich am C5'-Atom des Zuckers. Am C1'-Atom des Zuckers ist eine der vier Basen Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin gebunden. Diese werden entsprechend ihren Anfangsbuchstaben (A, C, G und T) abgekürzt.

Durch Verknüpfung des Phosphatrestes mit dem C3'-Atom eines weiteren Zuckers können sich Nucleotide zusammenlagern. Bilden mehrere Nucleotide eine Kette, spricht man von Oligonucleotiden (Abbildung 2). Diese werden auch als DNA-Einzelstränge (ss-DNA: *single-stranded DNA*) bezeichnet. Ein Einzelstrang hat ein 5'- und ein 3'-Ende, welches durch das jeweils freie C5'- oder C3'-Atom des Zuckers definiert ist. Am C3'-Atom des Zuckers befindet sich immer eine OH-Gruppe, am 5'-Ende kann sich eine OH-Gruppe oder ein Phosphatrest befinden.

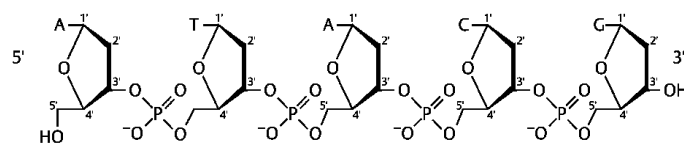


Abbildung 2: Aneinanderreihung von Nucleotiden zu einer Oligonucleotidkette. Die Basen sind durch ihre Anfangsbuchstaben dargestellt. Die Kette entsteht durch die Verbindung der Phosphatreste mit den 3'-Atom des Zuckers des nächsten Nucleotides. *Abb. aus [21].*

Durch die Aneinanderreihung der Nucleotide erhält jeder Einzelstrang eine definierten Basensequenz. Die Schreibweise der Basensequenz für einen solchen Ein-

zelstrang ist immer die 5' → 3' Richtung. Für das in Abbildung 2 dargestellte Oligonukleotid würde sie ATACG lauten. Schematisch kann man den Verlauf eines Einzelstranges auch ohne Angabe einer Basensequenz als Linie mit Pfeil in 3'-Richtung darstellen.

Eine andere Möglichkeit, Nukleotide zusammenzulagern, besteht in der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen. Dadurch kann Adenin mit Thymin bzw. Guanin mit Cytosin eine sogenannte Watson-Crick-Basenpaarung bilden (Abbildung 3). Die Basen, die Watson-Crick-Bindungen eingehen, nennt man auch zueinander komplementäre Basen.

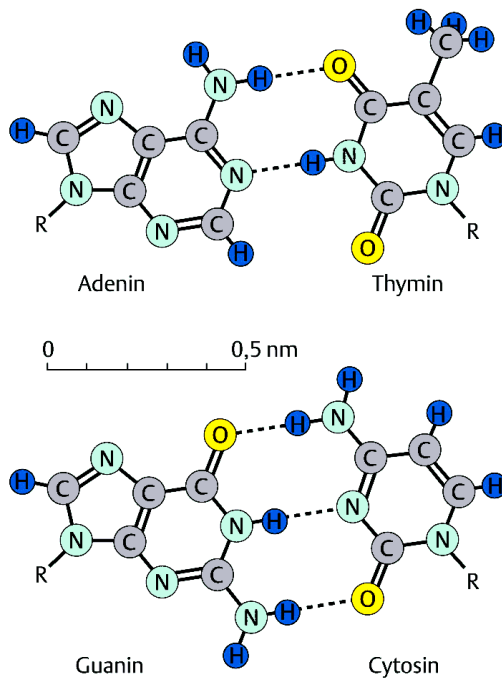


Abbildung 3: Die Watson-Crick-Basenpaarungen von Adenin und Thymin sowie Cytosin und Guanin. Die Watson-Crick-Basenpaarung entsteht durch zwei (A-T) oder drei (G-C) Wasserstoffbrückenbindungen. Diese sind im Bild gestrichelt dargestellt. Durch die zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung ist die GC-Paarung stabiler als die AT-Basenpaarung. Abb. aus [21].

Finden zwei Stränge mit komplementären Basen zusammen, können sich diese unter Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaarungen zu einem Doppelstrang zusammenlagern (ds-DNA: *double-stranded* DNA). In einem Doppelstrang sind die beiden Einzelstränge gegenläufig ausgerichtet (Abbildung 4) [21]. Die Selbsterkennung der komplementären Basen ist das Grundprinzip der Selbstassemblierung von DNA.

Wenn ein Strang mit einem weiteren, identischen Strang hybridisieren kann, ist dieser selbstkomplementär. Ein Beispiel dafür ist die Sequenz AGCT.

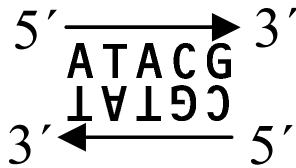


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Doppelstranges. Die Basensequenz entspricht der des Oligonukleotides aus Abbildung 2 mit dem dazugehörigen komplementären Strang. Die 5'- und 3'-Enden sind angegeben.

Das Ende eines Doppelstranges kann ein sogenanntes *sticky end* (klebriges Ende) oder ein *blunt end* (stumpfes Ende) sein. Beim *blunt end* sind die beiden Einzelstränge gleich lang. Beim *sticky end* ist ein Einzelstrang länger. Die überstehenden Basen bilden einen kurzen Einzelstrangabschnitt. Es kann sowohl das 3'- als auch das 5'-Ende überstehen. Man spricht dann von einem 3'- bzw. 5'-*sticky end*. Die Einzelstrangabschnitte zweier *sticky ends* können miteinander hybridisieren, wenn sie zueinander komplementär sind. Diese *sticky end*-Hybridisierung erlaubt eine Verbindung von zwei DNA-Doppelsträngen (Abbildung 5).

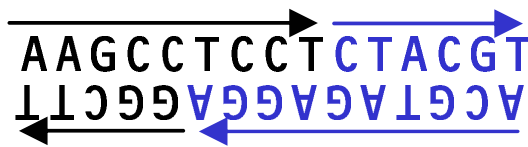


Abbildung 5: *Sticky end*-Hybridisierung: Der Doppelstrang links hat ein *sticky end* mit der Sequenz TCCT. Der blau dargestellte Doppelstrang rechts hat ein komplementäres *sticky end* mit der Sequenz AGGA. Die kurzen, überstehenden einzelsträngigen Abschnitte sind in der Darstellung hybridisiert und verbinden die beiden DNA-Doppelstränge.

Die in einen Doppelstrang vorhandenen Basen sind hydrophob (wasserabweisend), die Zucker und Phosphatreste hingegen hydrophil (wasseranziehend). In einer wässrigen Lösung wird ein energetisch günstiger Zustand durch eine möglichst geringe Kontaktfläche der hydrophoben Basen mit dem Wasser erreicht. Bei der DNA wird das durch die Ausbildung einer Doppelhelix realisiert. Die Basen werden dabei in der Mitte der Helix gestapelt und von den sie umgebenden Zuckermolekülen und den Phosphatresten "abgeschirmt". In Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen und der Basensequenz können sich verschiedene Formen von Doppelhelices ausbilden (Abbildung 6) [2]. Die bekannteste ist die B-Form, welche auch als B-DNA bezeichnet wird. Diese ist unter physiologischen Bedingungen am stabilsten. Die Helix der B-Form ist rechtsdrehend, hat durchschnittlich 10,5 Basenpaare je Windung und einen Basenabstand von 3,4 Å. Daraus ergibt sich eine Windungslänge von 3,6 nm. Der Durchmesser der Doppelhelix beträgt rund 2 nm. Die Phosphat-

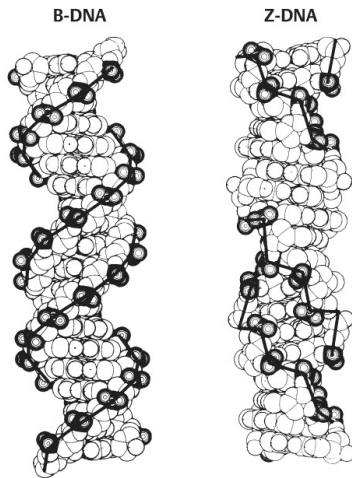


Abbildung 6: Rechtsdrehende B- und linksdrehende Z-Form der DNA. Abb. aus [21].

gruppen sind in Abbildung 6 dunkler dargestellt. Die schwarze Linie, welche durch die Phosphatgruppen verläuft, stellt den Verlauf des Rückgrates der DNA dar. Zwischen dem Rückgrat befinden sich abwechselnd die kleine und die große Furche. Ursache dafür ist die Anbindung des Zuckers an die Basen. In Abbildung 3 sind die Zucker an den mit R gekennzeichneten Stellen angebonden. Sie stehen dadurch auf der unteren Seite des Basenpaares etwas weiter zusammen. Auf dieser Seite befindet sich die kleine Furche, auf der anderen die große Furche. Die linksdrehende Z-DNA bildet sich nur bei bestimmten Basensequenzen, welche abwechselnd aus G- und C-Basen bestehen, sowie Umgebungsbedingungen mit hohem Salzgehalt.

Sie besitzt 12 Basenpaare je Windung.

2.2 Biegung von DNA

Das flexible Verhalten von DNA wird häufig mit dem *Worm-like chain model* beschrieben [22]. In diesem Modell wird ein Molekül als kontinuierlich flexibler Stab aufgefaßt, dessen Steifigkeit über die Persistenzlänge definiert wird. Zur Beschreibung von kurzen DNA-Stücken, die kleiner als die Persistenzlänge von 50 nm sind, kann dieses Modell allerdings nicht mehr angewendet werden. Mit einem Übergang vom globalen Helixparameter Persistenzlänge zu lokalen Parametern lassen sich auch kurze DNA-Stücke beschreiben. Die geometrische Beschreibung der DNA erfolgt dabei über die Lage der Basen zueinander. Eine Definition und Nomenklatur wurde in [23] aufgestellt und ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Aus den jeweils sechs Freiheitsgraden für die Lage der Basen eines Basenpaares zueinander und denen für die Stapelung der Basenpaare zu einem Basenpaarschritt ergeben sich insgesamt zwölf Parameter.

Bei der in Abbildung 6 dargestellten idealisierten B-Form der DNA haben die Parameter aller Basen die gleichen Werte: 36° *Twist* und $3,4 \text{ \AA}$ *Rise*, die anderen Parameter sind Null. Mittels Röntgenspektroskopie und Kernresonanzspektroskopie

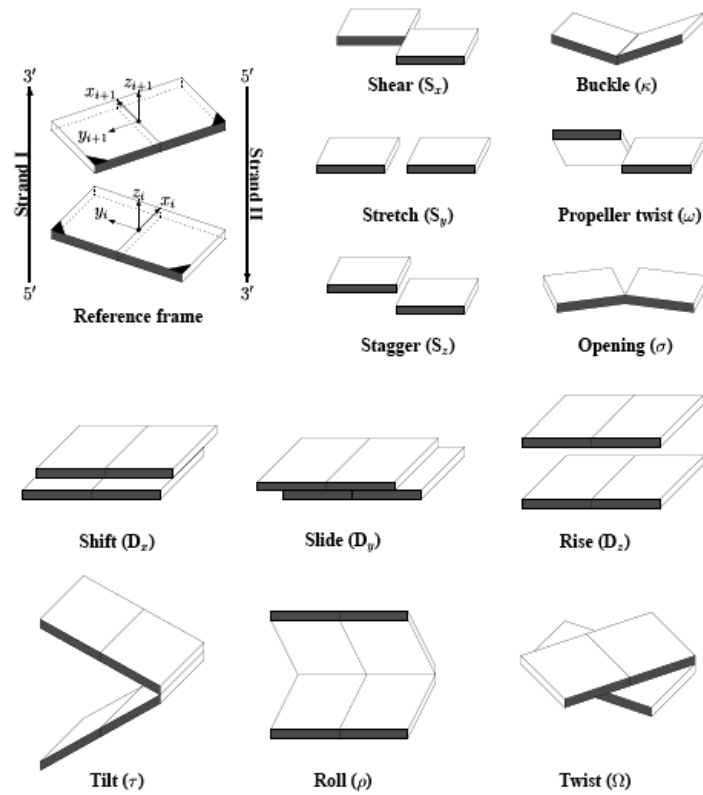


Abbildung 7: Bildhafte Definition der Parameter, welche die Lage der komplementären Basen und der Basenpaare zueinander beschreiben. Die Bilder zeigen positive Werte der jeweiligen Parameter. In der hier verwendeten Darstellung ist jede Base durch einen Quader dargestellt. Die dunkel gefärbte Seite kennzeichnet die kleine Furche. Im oberen Teil sind die sechs Parameter für die Lage zweier Basen eines Basenpaares zueinander dargestellt. Im unteren Teil sind die sechs Parameter für Stapelung zweier Basenpaare dargestellt. *Abb. aus [23].*

durchgeführte Strukturuntersuchungen an DNA zeigen, daß bei realer DNA die Basen unterschiedliche Abstände und Winkel zueinander haben. Eine Sammlung untersuchter DNA-Strukturen ist in [24] zu finden. Die Auswertung dieser Strukturen erlaubt die Angabe von Wertebereichen, in denen die lokalen Parameter der verschiedenen Basenpaare liegen [2]. Neben den Basen selbst haben die Umgebungsbedingungen (angrenzende Basen, Temperatur, pH-Wert sowie Salzkonzentration) einen Einfluß auf die Basenstapelung der DNA. Trotz vielfältiger Untersuchungen zum Einfluß der verschiedenen Größen ist eine genaue Vorhersage der Geometrie aus der Basensequenz der DNA nur in bestimmten Fällen möglich. In diesen Fällen

kann man die Wertebereiche eingrenzen, in denen die lokalen Helixparameter liegen.

Eine Biegung von DNA-Doppelsträngen kann nur durch gegeneinander gekippte Basenpaare erreicht werden. Die dafür relevanten Parameter sind der *Roll*-Winkel und der *Tilt*-Winkel (Abbildung 7). Da der Doppelstrang an den Seiten der Basenpaare durch die Phosphatbrücken zusammengehalten wird, ist eine Kippung in letztere Richtung eingeschränkt. Die möglichen Werte für den *Tilt*-Winkel sind dadurch eingegrenzt. Eine Biegung kann deshalb vor allem über den *Roll*-Winkel erreicht werden. Dieser kann bei B-DNA Werte zwischen -10° und $+20^\circ$ annehmen und liegt bei durchschnittlich $3,3^\circ$ [2].

Für kurze DNA-Abschnitte ist es möglich, die Biegung näherungsweise aus den *Roll*-Winkeln der einzelnen Basenpaarschritte nach [2] zu ermitteln. Neben dem Wert des Winkels läßt sich auch die Richtung der Biegung vorhersagen. Der Einfluß des *Tilt*-Winkels wird in der Rechnung vernachlässigt. Der *Twist*-Winkel Ω ist für alle Basenpaarschritte gleich.

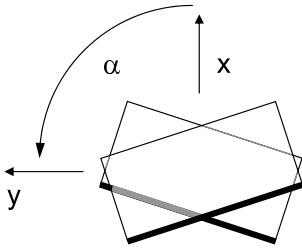


Abbildung 8: Die Lage des ersten Basenpaarschrittes im Koordinatensystem. In dieser Darstellung stellt ein Rechteck ein Basenpaar dar. Die Seite der kleinen Furche ist dicker gezeichnet. Es sind die Richtungen für x und y sowie für den Richtungswinkel der Biegung α eingezeichnet. Weitere Basenpaarschritte verlaufen aus der Bildebene heraus.

Der DNA-Abschnitt wird gedanklich in ein Koordinatensystem gelegt. In Abbildung 8 ist die Lage des ersten Basenpaarschrittes in dem Koordinatensystem dargestellt. Die Berechnung erfolgt über eine Zerlegung der *Roll*-Winkel in die Anteile in x- und y-Richtung (k_{xi} , k_{yi}). Diese Winkel können dann zu K_x und K_y , den Anteilen der Biegung in x- und y-Richtung für den gesamten DNA-Abschnitt, aufsummiert werden. Daraus können der Winkel der Gesamtbiegung K und der Winkels α , welcher die Richtung der Gesamtbiegung bezogen auf das xy-Koordinatensystem angibt, berechnet werden.

Die Zählung der Basenpaarschritte beginnt bei $i=0$ für den ersten Schritt. Die durch den i -ten Basenpaarschritt erzeugte Biegung berechnet sich zu

$$k_{xi} = \rho_i \cos(\Omega i) \quad (1)$$

für den Anteil in x-Richtung und

$$k_{yi} = \rho_i \sin(\Omega i) \quad (2)$$

für den Anteil in y-Richtung. Dabei sind ρ_i der *Roll*-Winkel des Schrittes und Ωi die Gesamtdrehung des Basenpaarschrittes, bezogen auf den ersten Basenpaarschritt. Zur Berechnung der gesamten Biegung werden jeweils die Anteile von allen Basenpaarschritten in x- und y-Richtung addiert. Die Biegung in x-Richtung der einzelnen Basenpaarschritte wird mit der Formel

$$K_x = \sum_i \rho_i \cos(\Omega i) \quad (3)$$

aufsummiert. Die Biegung senkrecht zu dieser läßt sich mit der Formel

$$K_y = \sum_i \rho_i \sin(\Omega i) \quad (4)$$

berechnen. Aus K_x und K_y kann die Gesamtbiegung bestimmt werden:

$$K = \sqrt{K_x^2 + K_y^2} \quad (5)$$

Die Winkel für die Richtung, in der die Biegung bezogen auf den ersten Schritt verläuft, läßt sich mit der Formel

$$\alpha = \arctan\left(\frac{K_y}{K_x}\right) \quad (6)$$

ermitteln¹. Daraus kann man den Basenpaarschritt ermitteln, dessen Biegerichtung des *Roll*-Winkels diesem Winkel entspricht:

$$s = \alpha / \Omega \quad (7)$$

Über den Basenpaarschritt kann man die Richtung der Biegung unabhängig vom Koordinatensystem angeben.

Zur Erläuterung werden im folgenden zwei Beispiele betrachtet, welche in Abbildung 9 dargestellt sind. Es soll die Biegung einer Windung der DNA berechnet werden. Für diese wird eine idealisierte DNA mit zehn Basen je Windung angenommen. Daraus ergibt sich ein *Twist*-Winkel von $\Omega=36^\circ$ je Basenpaarschritt in

¹Der Arcustangens liefert Werte von -90° bis 90° . Bei negativen k_x muß zum Ergebnis 180° , bei negativem k_y und positivem k_x 360° addiert werden.

der Helixachse. Daraus resultieren zehn Basenpaarschritte, welche von $i=0$ bis $i=9$ indexiert werden. In Abbildung 9a ist der Index für den ersten und den letzten Basenpaarschritt eingezeichnet. Das letzte dargestellte Basenpaar ist für den letzten Basenpaarschritt notwendig, gehört aber schon zur nächsten Windung. In dem ersten Beispiel betragen die *Roll*-Winkel für alle Basenpaarschritte $3,3^\circ$ und sind somit gleich. Daraus ergibt sich eine Gesamtbiegung von $K=0^\circ$, d.h. die DNA weist nach einer Windung in dieselbe Richtung. Das ist auch in der Abbildung 9a sichtbar. Das erste Basenpaar dieser Windung weist in dieselbe Richtung wie das erste Basenpaar der nächsten Windung.

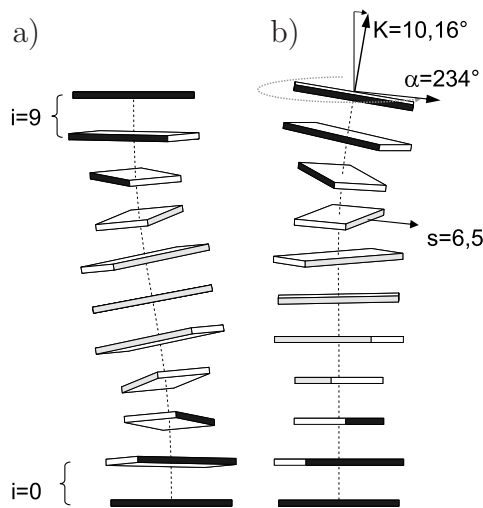


Abbildung 9: Einfluß der *Roll*-Winkel auf die Biegung von DNA. Jedes Basenpaar wird schematisch durch einen Block dargestellt. Die Seite der kleinen Furche ist schwarz gefärbt. Die hier dargestellte, idealisierte DNA hat eine Windungslänge von 10 Basenpaaren. Das erste Basenpaar liegt unten. Das oberste Basenpaar gehört zur nächsten Windung. (a) Bei gleichen *Roll*-Winkeln für alle Basenpaarschritte ist das erste Basenpaar einer Windung in der selben Richtung wie das erste der nächsten Windung orientiert. (b) Durch unterschiedliche *Roll*-Winkel innerhalb einer Windung entsteht eine Biegung. Die nächste Windung "startet" in einer anderen Richtung. Die Richtungen für K , α und s sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Modelle wurde mit den Programmen 3DNA [25] und Rasmol [26] erstellt.

Um eine Biegung zu erhalten, sind unterschiedliche *Roll*-Winkel innerhalb einer Windung notwendig. In Abbildung 9b betragen die ersten vier *Roll*-Winkel 0° und die restlichen sechs $3,3^\circ$. Daraus ergibt sich eine rechnerische Gesamtbiegung von $K=10,16^\circ$ für diese Windung. Der Winkel für die Richtung in der x - y -Ebene beträgt $\alpha = 234^\circ$. Das entspricht mit $s=6,5$ einer Richtung, in welche ein aus den Basenpaarschritten $i=6$ und $i=7$ gemittelter *Roll*-Winkel biegen würde. Anders ausgedrückt ist das die Richtung, in welche die große Furche des achten Basenpaares zeigt. Dies ist in der Abbildung mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Es gibt bestimmte Sequenzen, die eine Biegung in der DNA verursachen können: den A-Trakt und den G-Trakt. Ein A-Trakt, welcher eine deutlich messbare Biegung

erzeugt, besteht aus einem mindestens vier Basen langen Abschnitt. Dieser besteht aus aufeinander folgenden Adeninbasen, es ist aber auch ein Wechsel zu Thyminbasen möglich, so daß z.B. eine Sequenz AATT entsteht. Eine allgemeine Darstellung für die Sequenz des A-Traktes ist A_xT_y mit $x+y>3$. Die AA-Schritte beim A-Trakt weisen einen relativ niedrigen *Roll*-Winkel von 0° auf [2]. Auch AT-Schritte weisen einen niedrigen *Roll*-Winkel auf. Der *Roll*-Winkel beim AT-Schritt beträgt etwa 2° . Die *Roll*-Winkel beim A-Trakt sind kleiner als der durchschnittliche Wert von DNA von $3,3^\circ$. Dadurch erfolgt die Biegung in Richtung der kleinen Furche. Als Ursachen für den niedrigen *Roll*-Winkel wurden ein hoher *Propellertwist*, der durch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Adenin und benachbartem Thymin in der großen Furche begünstigt wird [2], und CH/ π -Interaktion des Thymins gefunden [27]. Die Basenreihenfolge TTAA hingegen erzeugt keine Biegung. Ursache dafür ist, daß der TA-Schritt flexibel ist und hohe *Roll*-Winkel annehmen kann.

Für einen A-Trakt mit einer Folge von sechs Adeninbasen wurden Werte für die Biegung zwischen 11° und 45° gefunden. Die Werte sind abhängig vom Verfahren zur Bestimmung des Winkels, der Ionenkonzentration, der Temperatur und der A-Trakt-Sequenz. Bei einem Puffer mit 3,9 mM Mg^{2+} -Ionen ist die Biegung 12° höher als ohne Mg^{2+} -Ionen [28]. Weiterhin wurde ein monotones Abnehmen der Biegung bei einem Anstieg der Temperatur von $5^\circ C$ nach $60^\circ C$ beobachtet [29]. Für einen A-Trakt mit vier Adeninbasen wurden eine Biegung 9° ohne und 18° mit Mg^{2+} Ionen gefunden [28]. Eine Studie, bei der die Biegung von auf Glimmer immobilisierter DNA mit A-Trakten untersucht wurde, ergab eine mittlere Biegung von $13,5^\circ$ je A-Trakt [30]. Die Messung wurde in einem Puffer mit 4 mM Hepes (pH 7.4), 10 mM NaCl und 2 mM $MgCl_2$ bei Raumtemperatur durchgeführt.

Der G-Trakt kann aus den Sequenzen GGCC und GGGCCC bestehen. Bei GC-Schritten wird ein hoher *Roll*-Winkel von 5° bis 10° bevorzugt. Dadurch entsteht eine Biegung in Richtung der großen Furche, was einer Biegung genau entgegengesetzt der des A-Traktes entspricht. Um eine Biegung zu erreichen, sind zweiwertige Ionen in der Lösung notwendig [31]. Die Sequenz GGGCCC weist einen bevorzugten Biege Winkel von $20-24^\circ$ auf. Der maximale Biege Winkel beträgt 30° . Beim Tetramer GGCC wurde mittels Röntgenkristallographie ein Winkel von 23° gemessen [32].

Liegen mehrere gebogene Abschnitte hintereinander, können sich die einzelnen Biegungen aufsummieren oder aufheben. Entscheidend dafür ist die Lage der Zentren der Biegungen zueinander. Liegen die Zentren von Biegungen gleicher Richtung, z.B. eine Abfolge von A-Trakten, im Abstand von ganzen Windungen auf

einem DNA-Strang, summieren sich die einzelnen Biegungsanteile zu einer Gesamtbiegung auf. Der A-Trakt und die Sequenz GGGCCC sind in entgegengesetzte Richtungen gebogen. Damit sich diese Anteile aufsummieren, müssen die Biegungszentren von A-Trakt und der Sequenz GGGCCC um 180° gedreht auf der DNA liegen. Das entspricht einem Abstand von einer halben Windung.

2.3 Stabilität von DNA

Für die Stabilität der DNA-Doppelhelix sind die Watson-Crick Bindungen und die Stapelung der Basen wesentlich. Sie wird durch die DNA-Konzentration, das umgebende Medium (pH-Wert, Salzkonzentration, Hydrophobizität) und die Temperatur beeinflusst. Bei einer Temperaturerhöhung kommt es zu thermischen Fluktuationen, die zum Aufbrechen von Bindungen führen können. Wenn die thermische Energie hoch genug ist, wird die DNA einzelsträngig (Abbildung 10a). Dieser Prozeß wird als Aufschmelzen der DNA bezeichnet.

Der umgekehrte Weg, die Zusammenlagerung komplementärer DNA-Doppelstränge, wird als Hybridisierung bezeichnet. Im ersten Schritt einer Hybridisierung finden ein oder mehrere komplementäre Basenpaare an einer Stelle der DNA zusammen. Das "Finden" einer komplementären Base ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Im zweiten Schritt lagern sich die benachbarten komplementären Basen in einer Art Reißverschluß-Prinzip zusammen. Das verläuft im Vergleich zum ersten Schritt sehr schnell und wird so lange fortgesetzt, wie komplementäre Basen vorliegen. Die Anzahl der komplementären Basen bestimmt die Länge des sich bildenden Doppelstrangabschnittes. Ob der gebildete Doppelstrangabschnitt stabil ist, hängt von der Temperatur ab. Ist die thermische Energie hoch genug, ist der ausgebildete Doppelstrangabschnitt nicht stabil und wird aufschmelzen, d.h. es bilden sich wieder Einzelstränge [33]. Durch langsames Abkühlen während der DNA-Hybridisierung wird erreicht, daß sich nur die jeweils stabilsten Doppelstrangabschnitte ausbilden können (Abbildung 10b). Bei schnellem Abkühlen hingegen werden niedrige Temperaturen erreicht, bevor sich die stabilsten Doppelstrangabschnitte bilden können. Es können nun auch weniger stabile Abschnitte hybridisieren, welche bei den niedrigen Temperaturen nicht wieder aufschmelzen. Diese sind in Bezug auf das gesamte Oligonukleotid fehlgepaarte Abschnitte (Abb. 10c). Da die DNA-Hybridisierung eine reversibler Prozeß ist, kann eine solche Fehlpaarung durch Aufschmelzen und anschließendes langsames Abkühlen entfernt werden. Eine

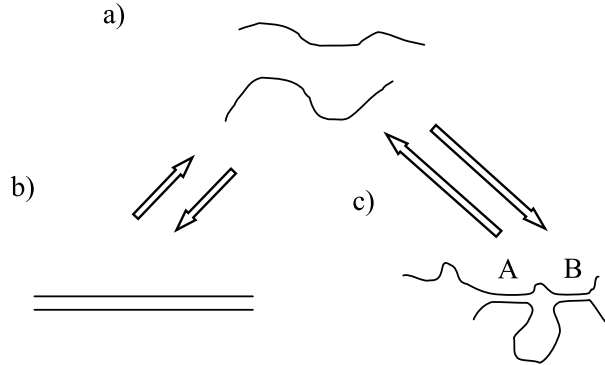


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufschmelzens und der Hybridisierung von DNA. Die möglichen Übergänge sind durch Pfeile gekennzeichnet. (a) Bei hoher Temperatur liegt einzelsträngige DNA vor. (b) Beim langsamen Abkühlen bildet sich ein Doppelstrang aus den komplementären Einzelsträngen. Es ist der stabilste Zustand. (c) Beim schnellen Abkühlen können sich Fehlpaarungen bilden. Im Schema haben sich zwei kurze Doppelstrangabschnitte bei A und B gebildet.

solche Strategie wird bei dem Verfahren der Hybridisierung von DNA-Netzwerken angewandt. Die DNA-Oligonukleotide sind am Anfang in einem nicht definiertem Zustand, welcher Fehlpaarungen, wie z.B. *Hairpins* oder zufällig miteinander hybridisierte Stränge, aufweisen kann. Im ersten Schritt wird die DNA aufgeschmolzen. Dabei werden alle DNA-Oligonukleotide zu Einzelsträngen und somit auch die Fehlpaarungen aufgebrochen. Im zweiten Schritt erfolgt über eine langsame Abkühlung die eigentliche Hybridisierung des Netzwerkes.

Da die DNA-Netzwerke bei Raumtemperatur untersucht werden sollen, müssen sie bei dieser Temperatur auch stabil sein. DNA-Netzwerke bestehen aus verhältnismäßig kurzen Oligonukleotiden, welche abschnittsweise miteinander hybridisieren. Ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Stabilität ist die Schmelztemperatur. Die Schmelztemperatur T_M ist definiert als die Temperatur, bei der 50% der DNA einzelsträngig, der Rest doppelsträngig vorliegt. Mit dem "Modell der nächsten Nachbarn" von Breslauer et al. [34] ist die Schmelztemperatur eines Oligonukleotides aus den Basenpaarschritten berechenbar. Die Schmelztemperatur in °C läßt sich mit der Formel

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln\left(\frac{C_T}{4}\right)} - 273,15 \quad (8)$$

berechnen. Dabei sind ΔH die Enthalpie, ΔS die Entropie, R die allgemeine Gaskonstante und C_T die DNA-Konzentration. Die Werte für ΔH und ΔS wurden in [34]

für jeden der 10 möglichen Basenpaarschritte der DNA bestimmt. Zur Bestimmung von ΔH und ΔS eines Oligonukleotides werden die jeweiligen Werte für jeden Basenpaarschritt aufsummiert. Die Formel ist genau für kurze Sequenzen, wie sie beim Aufbau von DNA-Netzwerken verwendet werden. Für lange Sequenzen hingegen ist sie nicht akkurat.

Für die Berechnung der Schmelztemperatur in $^{\circ}\text{C}$ von langen Sequenzen kann man die Formel

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log(C_{Na^+}) + 0,41 \% (G + C) - 675 / \text{Basenanzahl} \quad (9)$$

nach Baldino et al. [35] verwenden. Dabei sind (C_{Na^+}) die Natriumionenkonzentration in mMol und $\% (G + C)$ der GC-Gehalt der DNA in $\%$ ².

Die UV-Vis-Spektroskopie bietet eine Möglichkeit, die Schmelztemperatur von DNA experimentell zu bestimmen. Die DNA hat ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, welches durch die π -Elektronen der aromatischen Ringe verursacht wird. In der Basenstapelung der Doppelhelix sind die aromatischen Ringe der Basen in sich überlappenden Schichten angeordnet. Dadurch ist die Anzahl der für die π -Elektronen zur Verfügung stehenden Energieniveaus eingeschränkt, und die Absorption der DNA ist geringer. Da bei einzelsträngiger DNA eine solche Basenstapelung nicht existiert, stehen den π -Elektronen mehr freie Energieniveaus zur Verfügung, und es kann mehr Energie absorbiert werden. Das ist in den Absorptionsspektren für einzel- und doppelsträngige DNA in Abbildung 11a sichtbar. Dieses als hypochromischer Effekt bekannte Verhalten kann man auch zur Erzeugung von Schmelzkurven verwenden [36]. Eine DNA-Schmelzkurve erhält man, indem man die Absorption bei 260 nm über der Temperatur aufträgt (Abb. 11b). Bei niedrigen Temperaturen existiert ein Plateau, bei dem die DNA doppelsträngig ist. Dann folgt ein Temperaturbereich, in dem die DNA schmilzt und die Absorption ansteigt. Bei hohen Temperaturen existiert ein Plateau, bei dem die DNA einzelsträngig ist. Aus einer solchen Schmelzkurve läßt sich die Schmelztemperatur ermitteln. Der Wert der Absorption, bei dem 50% der Doppelhelix geschmolzen ist, wird über die Bildung des Mittelwertes der Absorption von einzel- und doppelsträngiger DNA ermittelt. Die Temperatur, bei der die Schmelzkurve diesen Wert erreicht, ist die Schmelztemperatur.

²Diese Formel ist auch für andere einwertige Ionen anwendbar.

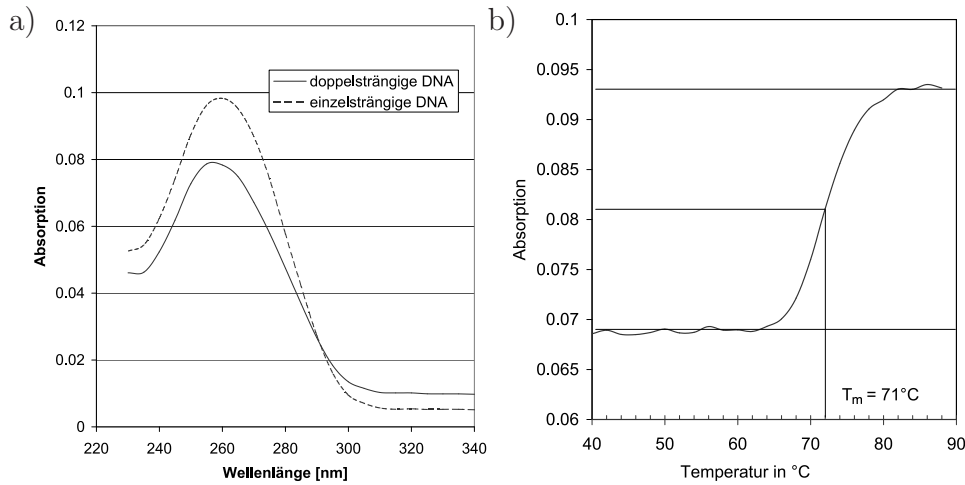


Abbildung 11: (a) Absorptionsspektren von einzel- und doppelsträngiger DNA mit einer Konzentration von $3,5 \mu\text{g/ml}$. Die doppelsträngige DNA absorbiert weniger Strahlung. (b) Aus der Schmelzkurve von DNA läßt sich die Schmelztemperatur ermitteln.

2.4 Modifizierung von DNA

Aus der Molekularbiologie sind viele Prozesse zur Veränderung von DNA-Molekülen bekannt. Die in vorliegender Arbeit verwendeten werden in diesem Abschnitt vorgestellt. Lange DNA-Fragmente lassen sich durch Reinigungsverfahren aus Zellen oder Viren gewinnen. Die dabei erhaltenen DNA-Mengen sind allerdings nicht sehr hoch. Die Entwicklung der Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) im Jahr 1987 [37] ermöglichte es, DNA-Doppelstränge oder Abschnitte daraus rationell zu vervielfältigen. Für die Vervielfältigung wird nur sehr wenig DNA als Ausgangsmaterial benötigt.

Die Vervielfältigung bei der PCR-Reaktion verläuft in sich zyklisch wiederholenden Schritten. In Abbildung 12 sind die ersten drei Zyklen einer PCR dargestellt. Im ersten Zyklus sind die einzelnen Schritte, das Aufschmelzen des Doppelstranges, die Primeranlagerung und die Primerverlängerung zu sehen. Im ersten Schritt wird der Doppelstrang in die beiden Einzelstränge aufgeschmolzen. Dies geschieht bei Temperaturen um 95°C . Im nächsten Schritt findet die Primeranlagerung statt. Primer sind DNA-Oligonukleotide, welche im allgemeinen 18 bis 22 Basen lang sind. Die Basensequenz ist so gewählt, das sie jeweils an einer genau definierten Stelle an die DNA hybridisieren. Die Hybridisierungstemperatur der Primer liegt meist zwischen 50 und 60°C . Für eine PCR werden im allgemeinen zwei Primer

benötigt. Einer hybridisiert an den ersten Einzelstrang ("Vorwärts-Primer"), der andere an den zweiten Einzelstrang ("Rückwärts-Primer"). Die beiden Primer sind in Abbildung 12 unterschiedlich gestrichelt dargestellt. Die Polymerase kann am 3'-Ende der Primer Basen anlagern. Die bei der PCR verwendeten Polymerasen arbeiten bei ca. 70°C. Als Vorlage, welche Base angelagert wird, dient der bereits vorhandene Einzelstrang. Mit der Bildung des dabei entstehenden komplementären Stranges ist ein Zyklus abgeschlossen.

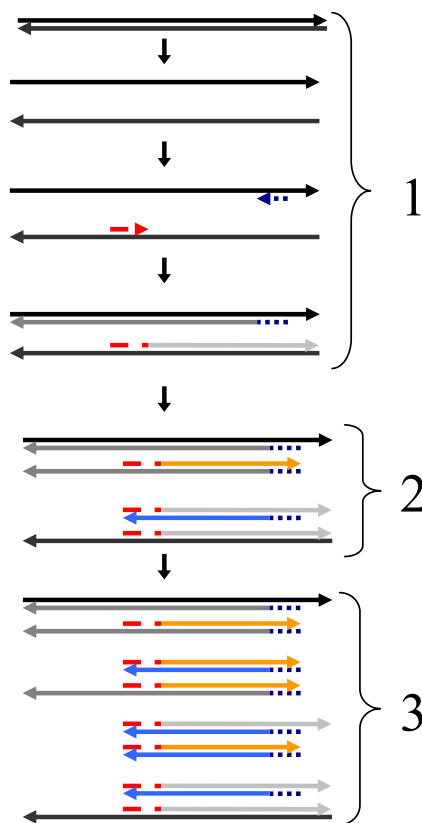


Abbildung 12: Schematische Darstellung der ersten drei Zyklen der DNA-Vervielfältigung bei einer PCR. Für den ersten Zyklus sind die einzelnen Schritte angegeben, für den zweiten und dritten Zyklus die am Ende vorhandenen DNA-Stränge.

In Abbildung 12 wird mit der PCR ein Abschnitt der DNA herauskopiert. Die nach dem ersten und zweiten Zyklus vorhandenen DNA-Doppelstränge sind länger als der zu kopierende Abschnitt. Erst im dritten Zyklus entstehen die ersten Doppelstränge mit der richtigen Länge. In den weiteren Zyklen steigt die Anzahl der zu langen Doppelstränge linear, die Anzahl der Doppelstränge mit richtiger Länge hingegen exponentiell. Nach n Zyklen sind für jeden am Anfang vorhandenen Doppelstrang $2n$ zu lange Doppelstränge und $2^n - 2n$ Doppelstränge mit richtiger Länge vorhanden. Bei einer bei der PCR üblichen Zyklenzahl von 20 oder mehr, kann die Anzahl zu langer Doppelstränge gegenüber den Doppelsträngen mit korrekter Länge vernachlässigt werden.

Ein weiteres Verfahren zur DNA-Manipulation ist das Schneiden von DNA. Die Enzyme, welche die DNA zerschneiden, nennt man Restriktionsenzyme. Jedes Enzym schneidet die DNA an einer bestimmten Stelle, welche durch die Basensequenz vorgegeben wird. Die Restriktionsenzyme können an der Schnittstelle ein *blunt end* oder ein *sticky end* hinterlassen. Die wichtigste Nutzung von Restriktionsenzymen besteht darin, an vorgegebenen Stellen der DNA definierte *sticky ends* zu erzeugen.

Das in der Arbeit verwendete *Hind*III Enzym hat die selbstkomplementäre Erkennungssequenz AAGCTT. Findet es diese auf einem DNA-Doppelstrang, trennt es die Phosphatrückgrat zwischen den beiden Adeninbasen. Da die Sequenz selbstkomplementär ist, ist sie auch auf dem anderen Strang vorhanden. Hier wird ebenfalls das Phosphatrückgrat zwischen den beiden Adeninbasen getrennt. Nach dem Schneiden besitzen die beiden DNA-Stücke ein 5'-*sticky end* mit der Sequenz AGCT (Abbildung 13).

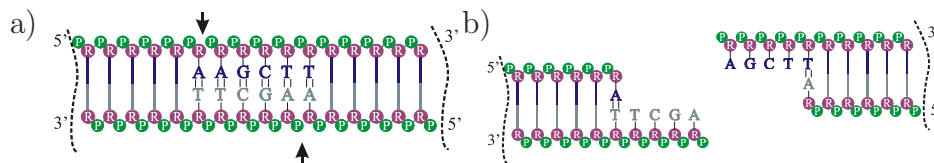


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Schneidens von DNA mit dem *Hind*III-Enzym. (a) Ausschnitt aus der DNA mit der Erkennungssequenz des Enzyms. Die Pfeile zeigen die Stellen, an denen das Phosphatrückgrat getrennt wird. (b) Nach dem Schneiden liegen zwei DNA-Stücke mit selbstkomplementären *sticky ends* vor.

Neben dem Auffüllen eines kompletten Stranges mit Basen zum Doppelstrang, wie bei der PCR, ist auch das Auffüllen einzelner Basen möglich. In dieser Arbeit wird dies erreicht, indem in der Lösung nur die aufzufüllende Base vorhanden ist (Abbildung 14). Zum Auffüllen wurde das *Klenow-Fragment* der DNA-Polymerase I verwendet.

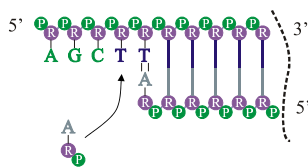


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Auffüllens einer Base an einem *sticky end*.

Um DNA-Fragmente miteinander ligieren zu können, müssen die 5'-Enden eine Phosphatgruppe besitzen. Im Normalfall besitzt ein 5'-Ende eine Phosphatgruppe. Bei künstlich hergestellten DNA-Oligonukleotiden besitzt das 5'-Ende jedoch eine OH-Gruppe. Das bei der Phosphorylierung verwendete Enzym ist eine Polynukleotid-Kinase. Es katalysiert die Anlagerung einer Phosphatgruppe an die 5'-Enden der DNA. Dazu benötigt es Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP).

Über eine Ligation lassen sich DNA-Doppelstränge verbinden. Es ist sowohl möglich *blunt ends* als auch komplementäre *sticky ends* zu ligieren. Nicht komple-

mentäre *sticky ends* werden nicht ligiert. Das bei der Ligation verwendete Enzym, eine Ligase, katalysiert die Ausbildung einer Phosphordiesterbindung zwischen einer Phosphatgruppe am 5'-Ende und einer OH-Gruppe am 3'-Ende der DNA und schließt dadurch das Phosphatrückgrat. Dazu wird Energie in Form von Adenosin-triphosphat (ATP) oder Nicotinamidadenindinukleotid ($\text{NADH} + \text{H}^+$) benötigt. In dieser Arbeit wurde T4-Ligase verwendet.

2.5 Verzweigungen und Netzwerke aus DNA

2.5.1 DNA-Verzweigungen

Die Grundvoraussetzung für den Aufbau von DNA-Netzwerken sind Verzweigungen. Sie sind der erste Schritt beim Übergang vom linearen Molekül zum Netzwerk. Die einfachste Verzweigung ist die 3-Arm-Verzweigung, wie in Abbildung 15 schematisch dargestellt. Jede Linie stellt ein Oligonukleotid dar, der Pfeil zeigt das 3'-Ende an. Die einzelnen DNA-Oligonukleotide sind jeweils zu einem Teil zueinander komplementär. Beim ersten Oligonukleotid ist der Abschnitt a mit dem Abschnitt a' des zweiten Oligonukleotides und der Abschnitt b mit dem Abschnitt b' des dritten komplementär.

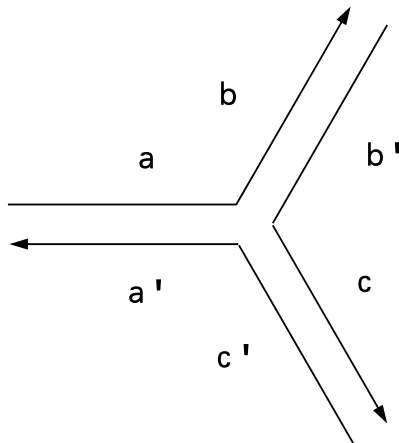


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer 3-Arm-Verzweigung. Die drei Oligonukleotide bestehen aus je zwei mit einem kleinen Buchstaben bezeichneten Abschnitten. Die Abschnitte a und a', b und b' sowie c und c' sind komplementär und können dadurch hybridisieren.

3-Arm-Verzweigungen sind im Verzweigungspunkt flexibel, d.h. die Arme sind nicht in einem Winkel zueinander fixiert, sondern beweglich. Experimentell wurde gezeigt, daß bei der Ligation von Verzweigungen geschlossene Strukturen ab drei Verzweigungen gebildet werden können [6]. Eine geschlossene Struktur aus drei Verzweigungen besteht aus einem Dreieck. Das bedeutet, daß bei jeder Verzweigung

zwischen zwei Armen ein Winkel von 60° vorliegen muß.

Die drei Arme einer Verzweigung müssen nicht unbedingt in einer Ebene liegen und können auch eine pyramidale Struktur annehmen [38]. Welche dominierenden Winkel sich zwischen den Armen ausbilden, ist von den in der Lösung vorhandenen Ionen und den an den Verzweigungspunkt angrenzenden Basen abhängig [39]. Durch den Einbau von ungepaarten Basen im Verzweigungspunkt kann eine gewisse Versteifung erreicht werden [40].

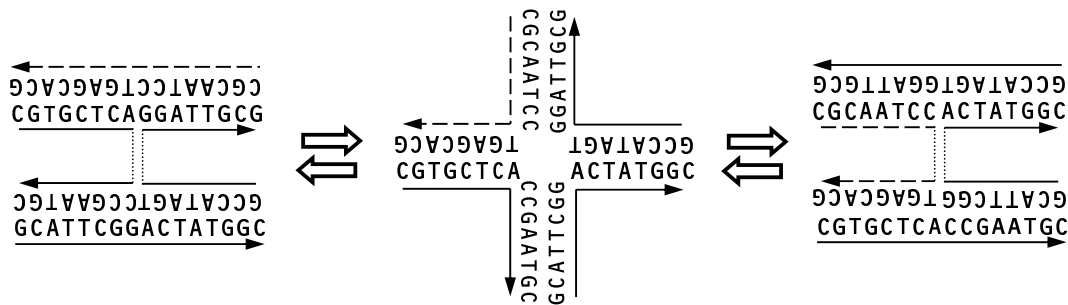


Abbildung 16: Verschiedene Konformationen der 4-Arm-Verzweigung: eine "offene Struktur" als Kreuz in der Mitte und zwei verschiedene Formen der "gestapelten X-Struktur". Die "gestapelte X-Struktur" kann man sich auch als zwei übereinander liegende Doppelstränge mit einem Einzelstrangaustausch vorstellen. Zur Verdeutlichung der Unterschiede ist ein Oligonukleotid gestrichelt gezeichnet. Die Doppelpfeile zeigen die Möglichkeit der Konformationsänderung.

Die nächstkompliziertere Verzweigung ist die 4-Arm-Verzweigung. Auch sie ist im Verzweigungspunkt flexibel, wodurch verschiedene, wie in Abbildung 16 dargestellte Konformationen möglich sind. Die Art der in der Lösung vorhandenen Ionen und deren Konzentration haben Einfluß auf die Struktur. Ohne zweiwertige Ionen besitzt die DNA 4-Arm-Verzweigung eine "offene Struktur" (Abbildung 16, Mitte), mit Mg^{2+} -Ionen eine "gestapelte X-Struktur", bei der es zwei verschiedene Konformationen gibt (Abbildung 16, links und rechts). In welchem Anteil sich die Konformationen ausbilden, ist von der Sequenz der DNA abhängig. Die Konformationen können ineinander übergehen. Wie oft Übergänge zwischen den Konformationen stattfinden, hängt von der Mg^{2+} -Ionenkonzentration ab [41, 42]. Eine Definition zur Beschreibung der Geometrie von 4-Arm-Verzweigungen befindet sich in [43].

Bei den in der Natur vorkommenden Verzweigungen kann der Verzweigungspunkt wandern. Bei künstlich hergestellten Verzweigungen kann das durch eine entsprechend gewählte Sequenz verhindert werden. Wie eine solche Sequenz gefunden werden kann, wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

2.5.2 Seeman'sches Konstruktionsprinzip

Die Bedingungen für die möglichst optimale Konstruktion von Verzweigungen wurden von N.C. Seeman entwickelt und als Algorithmus veröffentlicht [5]. Um stabile Verzweigungen aus Oligonukleotiden herstellen zu können, sind verschiedene Bedingungen an die Basensequenz zu stellen. Die Oligonukleotide in einer Verzweigung müssen so konstruiert werden, daß sich nur die gewünschte Struktur bildet. Andere Strukturen, die über fehlerhafte Hybridisierungen entstehen können, sollen möglichst ausgeschlossen werden.

Ein DNA-Oligonukleotid kann sich an ein anderes anlagern, wenn dieses eine komplementäre oder eine der komplementären ähnliche Sequenz hat. Um fehlerhafte Hybridisierungen zu vermeiden, muß man daher lange, ähnliche Sequenzen vermeiden. Im Algorithmus von Seeman wird dazu eine sogenannte Critonlänge definiert. Sie gibt die Länge eines Abschnittes an, ab der sich nicht komplementäre Stränge in mindestens einer Base unterscheiden müssen. Für die Konstruktion einer Verzweigung werden die Oligonukleotide in sich überlappende Abschnitte gleicher Basenzahl zerlegt. Diese Abschnitte heißen Critons. So würde z.B. ein zehn Basen langer Abschnitt bei einer vorgegebenen Critonlänge von fünf in sechs sich überlappende Critons zerlegt. Der erste Criton enthält die Basen 1 bis 5, der zweite die Basen 2 bis 6 usw., der letzte die Basen 6 bis 10.

Um Fehlpaarungen, die genau so lang oder länger als die Critonlänge sind, und eine Wanderung des Verzweigungspunktes auszuschließen, hat Seeman vier Regeln für die Gestaltung der Critons in Verzweigungen aufgestellt:

- (1) Jedes Criton eines DNA-Stranges ist einmalig für alle Stränge der Struktur.
- (2) Bei Critons, die in einer Verzweigung liegen, darf das komplementäre Criton in keinem Strang vorkommen.
- (3) Selbstkomplementäre Critons sind nicht erlaubt. Wenn die Critonlänge ungerade ist, gilt diese Regel für alle Critons mit einer Base mehr.
- (4) Das gleiche Basenpaar kann nur zweimal an eine DNA-Verzweigung angrenzen. Wenn ein Basenpaar zweimal vorhanden ist, muß es auf angrenzenden Armen liegen.

Der Algorithmus ist auch für komplexere Strukturen wie DNA-Netzwerke anwendbar. Die Wahl der Critonlänge ist von der gewünschten Struktur abhängig. Ist die

Critonlänge zu hoch, können sich längere und damit stabile Fehlpaarungen bilden. Ist sie zu kurz, gibt es keine Möglichkeit, die Struktur mit Basen zu belegen, da die Anzahl der möglichen Critons nicht ausreicht. Größere Strukturen benötigen daher höhere Critonlängen. Der Algorithmus wurde in einem Programm namens "Sequin" umgesetzt [44]. In dem Programm wird ein DNA-Doppelstrang mit einer zufälligen Basensequenz belegt. Dann wird geprüft, ob die Critonregeln eingehalten werden. Wenn eine Critonregel verletzt wird, wird die Basensequenz geändert und erneut geprüft. Dieses iterative Verfahren wird so lange fortgesetzt, bis ein Ergebnis gefunden ist bzw. alle Möglichkeiten durchprobiert wurden. Mit dem Programm namens SEED können als Erweiterung auch komplexere Strukturen berechnet werden [45].

2.5.3 Bausteine und Netzwerke aus DNA

Einfache Verzweigungen sind in der Regel zu flexibel, um als Bausteine für regelmäßige DNA-Netzwerke eingesetzt zu werden. Um eine für den Aufbau von Netzwerken notwendige Steifigkeit zu erreichen, kann man zwei Grundprinzipien unterscheiden. Das erste Grundprinzip beruht darauf, daß bei der Kombination mehrerer steifer Elemente zu einem größeren Konstrukt eine zusätzliche, gegenseitige Versteifung stattfindet. Das zweite Grundprinzip ist die Anordnung der DNA in geometrisch steifen Figuren, z.B. in Dreiecken.

Das erste Grundprinzip ist wesentlich für die Steifigkeit großer Netzwerke. Auch in den Bausteinen selbst kann dieses Prinzip genutzt werden. Die Gruppe von Seeman zeigte, daß sich mit einem Baustein aus vier zu einem Viereck angeordneten 4-Arm-Verzweigungen Netzwerke bauen lassen (Abbildung 17) [46]. Die Helixachsen dieser Verzweigungen stehen nicht senkrecht aufeinander, sondern sind um 30° gegeneinander gedreht. Dadurch entsteht ein Parallelogramm als Baustein. Der Baustein wird direkt aus den DNA-Oligonukleotiden zusammengesetzt und nicht aus einzelnen Verzweigungen, da diese zu flexibel sind. Die Verzweigungen im Baustein versteifen sich gegenseitig. Die Bausteine können zu regelmäßigen ein- und zweidimensionalen Netzwerken assembliert werden.

Ein weiterer zum Aufbau von Netzwerken geeigneter Baustein ist das *Double Crossover*-Element, kurz DX-Element. Die Varianten des DX-Elementes wurden von Fu und Seeman in einem Oligonukleotidsystem modelliert [10]. Das DX-Element besteht aus zwei nebeneinander liegenden DNA-Doppelsträngen, die an zwei Stellen durch einen Einzelstrangaustausch verbunden sind (Abbildung 18). Aus

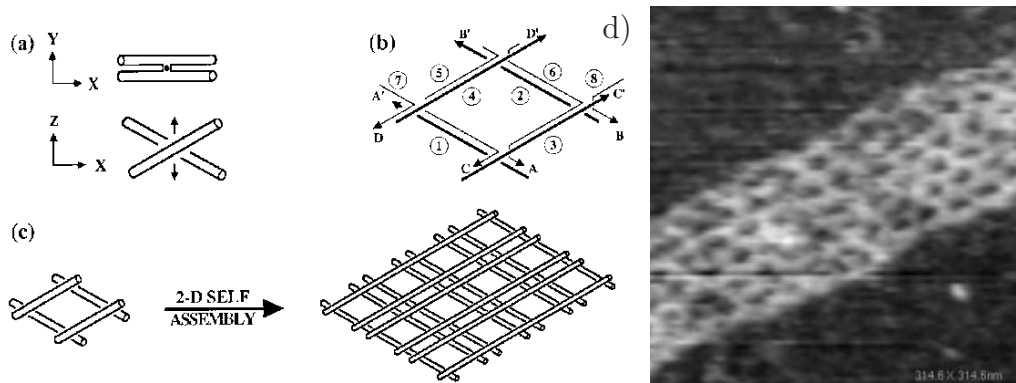


Abbildung 17: Schematische Darstellung und AFM-Abbildung eines DNA-Netzwerkes aus Parallelogrammen von Mao et al. (a) Ansicht der Geometrie einer Verzweigung. Die Helixachsen sind um 30° gegeneinander gedreht. (b) Zusammenbau eines Parallelogramms aus den Oligonukleotiden. (c) Prinzip der Assemblierung der Parallelogramme zu einem 2D-Netzwerk. (d) AFM-Abbildung des 2D-Netzwerkes. Abb. aus [46].

dem Einzelstrangaustausch an zwei Stellen ist der Name *double crossover* („doppelte Überkreuzung“) abgeleitet. Durch die beiden verbundenen Doppelstränge besitzen DX-Elemente eine höhere Steifigkeit als einzelne Doppelstränge. Die Persistenzlänge erhöht sich auf den doppelten Wert im Vergleich mit linearer DNA [11]. Eine andere Möglichkeit, sich das DX-Element vorzustellen, ist das Verbinden von zwei 4-Arm-Verzweigungen.



Abbildung 18: Prinzipieller Aufbau eines DX-Elementes. Zwei DNA Doppelstränge, hier übereinander liegend, sind an zwei Punkten durch einen gestrichelt gezeichneten Einzelstrangaustausch miteinander verbunden. Für den Aufbau des Bausteins sind vier verschiedene Oligomere notwendig.

Der Abstand der Kreuzungspunkte im DX-Element ist nicht beliebig, da für einen Strangaustausch die Phosphatgruppen der DNA an diesem Punkt zusammenliegen müssen. Nach jeweils einer ganzen Windung liegt die Phosphatgruppe des ausgetauschten Stranges wieder in derselben Richtung. Nach einer halben Windung hingegen liegen die Phosphatgruppen des anderen Stranges der Doppelhelix in dieser Richtung. Daraus ergibt sich, daß die Strangaustauschpunkte Vielfache halber Windungen auseinander liegen. Je nachdem, wie die beiden Doppelhelices

zueinander liegen und wie weit die Strangaustauschpunkte voneinander entfernt sind, ergeben sich unterschiedliche Varianten für DX-Elemente [10].



Abbildung 19: AFM-Abbildung eines DNA-Netzwerkes von Winfree et al.. Abb. aus [12].

Winfree et al. zeigten, daß sich mit DX-Elementen zweidimensionale Netzwerke aufbauen lassen (Abbildung 19) [12]. Die Verknüpfung der Bausteine zu Netzwerken erfolgt über *sticky-end*-Hybridisierung. Die vier Enden der beiden Doppelstränge eines DX-Elementes können je ein *sticky end* aufweisen, welche für eine gezielte Assemblierung der DX-Elemente genutzt werden können. Dadurch lassen sich bis zu vier weitere Bausteine an ein DX-Element hybridisieren.

Neben dem DX-Element wurden eine Reihe weiterer Bausteine assembliert. Ein Überblick über die Bausteine ist in Abbildung 20 dargestellt. In dem sich schnell entwickelndem Gebiet des Aufbaus von DNA-Netzwerken können auf der einen Seite immer größere und komplexere Bausteine und Netzwerke entworfen und hergestellt werden. Auf der anderen Seite gelingt es mit den gesammelten Erfahrungen, durch Ausnutzung von Symmetrien Netzwerke aus wenigen unterschiedlichen Oligonukleotiden aufzubauen.

LaBean et al. entwickelten, basierend auf dem DX-Element, das TX-Element, bei dem drei DNA-Doppelstränge in einer Ebene liegen [14]. Die Doppelstränge sind über Einzelstrangaustausch an insgesamt vier Verzweigungspunkten miteinander verbunden. Ein TX-Element ist in Abbildung 20a dargestellt. Baut man darüber hinaus einen vierten Doppelstrang mit ein, entsteht das von Reishus et al. entwickelte *Double-Double-Crossover-Element* (DDX) [50]. Die Verbindung zum nächsten Baustein in einem zweidimensionalen DNA-Netzwerk erfolgt hier über zwei *sticky ends* statt wie bei den bisher vorgestellten Bausteinen über eines. Die über die zwei Doppelhelices verbundenen Bausteine haben wahrscheinlich eine höhere Verwindungssteifigkeit.

Chelyapov et al. entwickelten einen dreieckigen Komplex [47]. Dieser besteht aus einem Dreieck als geometrisch steife Struktur, bei dem an jeder Ecke zwei Doppelstränge abgehen (Abb. 20b). Bei der Assemblierung zu Netzwerken wurden neben Sechsecken auch Ringstrukturen mit mehr oder weniger als sechs Ecken gebildet, da die Bausteine flexibel sind.

Bei den von Yan et al. entwickelten 4x4-Kacheln bilden die DNA-Oligonukleotide ein steifes Kreuz [15]. Die Seiten des Kreuzes bestehen aus jeweils zwei

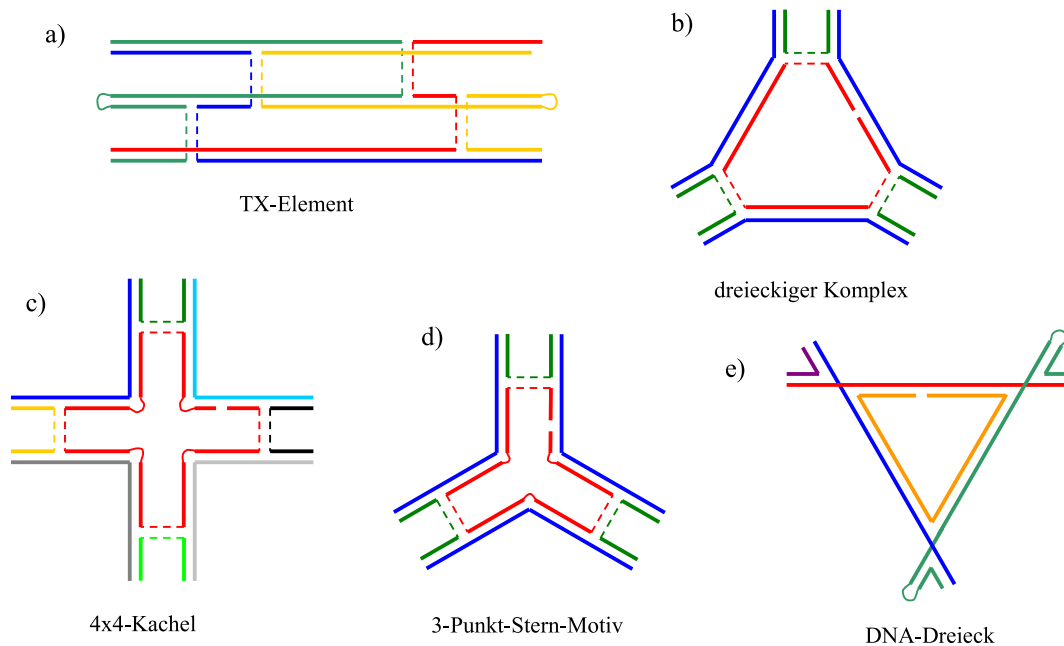


Abbildung 20: Schematische Darstellung von verschiedenen Bausteinen aus DNA-Oligonukleotiden. Unterschiedliche DNA-Oligonukleotide sind in verschiedenen Farben dargestellt. In den Bereichen, wo die Oligonukleotide eine Doppelhelix bilden, sind sie dick gezeichnet. Stellen mit ungepaarten Basen sind dünn gezeichnet. Die Übergänge beim Strangaustausch zwischen den Helices sind dünn gestrichelt gezeichnet. An diesen Stellen befinden sich keine Basen. Die dargestellten Elemente sind (a) ein TX-Element [14], (b) ein dreieckiger Komplex [47], (c) eine 4x4-Kachel [15], (d) ein 3-Punkt-Stern-Motiv [48] und (e) ein DNA-Dreieck [49].

nebeneinander laufenden Doppelhelices, welche über einen Strangaustausch miteinander verbunden sind. In der Mitte des Kreuzes sind die Doppelhelices um 90° abgelenkt, so daß sie an der nächsten Seite weiterlaufen. Diese Knicke lassen sich über ungepaarte Basen an definierten Stellen in der Doppelhelix erzeugen. In Abbildung 20c ist eine 4x4-Kachel dargestellt. An den Enden des Kreuzes sind jeweils zwei *sticky ends* möglich. Es lassen sich schienenartige eindimensionale sowie aus Quadraten bestehende zwei- und dreidimensionale Strukturen erzeugen. Während Netzwerke aus DX-Elementen eine Oberfläche vollständig mit DNA belegen, belegt hier die DNA nur einen Teil der Fläche. Mit den gleichmäßig großen Lücken zwischen den DNA-Strängen ist eine Herstellung von molekularen Sieben denkbar.

Von den 4x4-Kacheln abgeleitet ist das 3-Punkt-Stern-Motiv von He et al. (Abbildung 20d) [48]. Der Baustein ist wie die 4x4-Kachel aufgebaut, hat aber nur drei Arme. Durch die Ausnutzung von Symmetrien läßt sich ein solcher Baustein aus

nur drei unterschiedlichen Typen an Oligonukleotiden aufbauen. Durch Zusammenlagerung von 3-Punkt-Stern-Motiven läßt sich prinzipiell ein 6-Eck-Netzwerk assemblieren.

Neben den Bausteinen, die ihre Steifigkeit durch zwei nebeneinander liegende Helices erhalten, wurden auch Bausteine entwickelt, welche auf dem zweiten Grundprinzip der geometrisch steifen Figuren basieren. Liu et al. stellten Dreiecke her, welche aus drei sich einander überkreuzenden Helices bestehen (Abbildung 20e) [49]. An den Kreuzungspunkten sind die Helices durch einen Strangaustausch verbunden. Durch *sticky-end*-Hybridisierung lassen sich diese Dreiecke zu Netzwerken assemblieren.

Eine Kombinationen aus DX-Element und Dreieck in einem Baustein wurde von Ding et al. entwickelt [51]. Dieses "DX-Dreieck" besteht aus zwei übereinander liegenden Dreiecken aus DNA-Doppelsträngen. Diese sind durch Einzelstrangaustausch miteinander verbunden. Dadurch werden die Seiten des Dreiecks zu DX-Elementen, welche durch die übereinander liegenden Doppelstränge auf der Seite stehen. An den Ecken gehen jeweils die beiden Doppelstränge einer Seite über das Dreieck hinaus. An dieser Verlängerung lassen sich *sticky ends* anbringen, über die sich mehrere Dreiecke zusammen hybridisieren lassen. Auf diese Weise lassen sich pseudo-hexagonale zweidimensionale Netzwerke aufbauen. Da alle Kanten des Bausteins aus zwei Doppelhelices bestehen, weist der Baustein eine hohe Steifigkeit auf. Dadurch ist auch das Netzwerk sehr regelmäßig.

Neben zweidimensionalen Strukturen sind mit DNA auch dreidimensionale Strukturen herstellbar. Die ersten dreidimensionalen Objekte aus DNA stellte die Gruppe von Seeman bereits in den 90er Jahren her. Es wurden Würfel [52] und angeschnittene Oktaeder [53] erzeugt. Die Assemblierung erfolgte in mehreren Schritten mittels Hybridisierung und Ligation. Shih et al. zeigten, daß sich ein Oktaeder aus einem 1,7 kb langen Strang und fünf 40 Basen langen Oligonukleotiden aufbauen läßt [54]. Für die Assemblierung ist nur ein Hybridisierungsschritt notwendig. Mit dem Aufbau von dreidimensionalen Bausteinen aus Dreiecken befaßten sich Goodman et al. [55]. Durch die Dreiecke wird die strukturelle Stabilität in den 10 nm großen Tetraedern ermöglicht. Diese Struktur kann zu einer Doppelpyramide erweitert werden [56].

Dreidimensionale Netzwerke aus sich periodisch wiederholenden Bausteinen wurden bis jetzt nur in Form von Röhren erzeugt. Die Technologie zum Aufbau von dreidimensionalen Netzwerken steht daher noch ganz am Anfang. Viele der

Bausteine, mit welchen Röhren aufgebaut wurden, können in abgewandelter Form auch zweidimensionale Netzwerke bilden. In diesem Zusammenhang läßt sich eine Röhre auch als ein gebogenes zweidimensionales Netzwerk auffassen. Bausteine für eine Röhre lassen sich über die Biegung innerhalb des Bausteins oder über eine gegeneinander verdrehte Anordnung der Bausteine gestalten.

Ein zum Aufbau von Röhren verwendbarer Baustein ist das TX-Element. Bei diesem erfolgt die Verbindung zur dritten Helix über einen Strangaustausch nach einer halben Windung. Erfolgt der Strangaustausch an einer anderen Stelle, liegt die dritte Helix nicht mehr in der Ebene. Bei dem von Park et al. entwickelten 3HB-Element ("3-Helix-Bündel") erfolgt der Strangaustausch nach sieben Basen, was einem Winkel von "60°" zwischen den Helices entspricht [16]. Dadurch liegt der dritte Doppelstrang auf den beiden anderen, so daß die drei Doppelhelices im Querschnitt ein Dreieck bilden. Die dritte Doppelhelix bildet den Übergang in die dritte Dimension. Die drei Helices in diesem Element lassen sich auch als kleine Röhre auffassen. Mit diesem Element wurden ein- und zweidimensionale Netzwerke aufgebaut.

Von Mathieu et al. wurde ein "6-Helix-Bündel"-Baustein assembliert [17]. Die Strangaustauschpunkte im Baustein haben einen Abstand von 14 Basen, wodurch die Helices im Querschnitt einen Winkel von 120° bilden. Die sechs Helices bilden somit eine Röhre. Diese Bausteine lassen sich zu langen Röhren assemblieren.

Rothemund et al. untersuchten Röhren, welche durch gegeneinander gekippte DX-Elemente entstehen [13]. Untersuchungsgegenstand war die Bildung von Röhren mit DX-Elementen, bei welchen die Strangaustauschpunkte ganze Windungen auseinander liegen. Nach einer ganzen Windung liegen die Basen wieder in derselben Position, weshalb eigentlich keine Verkippung der Bausteine entstehen sollte. Zur Erklärung dieses Phänomens wurde ein auf der B-DNA-Struktur basierendes Modell aufgestellt. In diesem Modell wird berücksichtigt, daß die DNA eine große und eine kleine Furche besitzt. Die Phosphatgruppen des Rückgrates liegen bei der großen Furche weiter auseinander. Der Winkel der kleinen Furche beträgt $150^\circ \pm 10^\circ$. Zeigt die große Furche bei allen Strangaustauschpunkten in dieselbe Richtung, entsteht eine Verkippung von ca. 30° beim versetzten Zusammenlagern von DX-Elementen, obwohl der Strangaustausch nach ganzen Windungen erfolgt. Bei der Röhre zeigt die große Furche an den Strangaustauschpunkten nach außen. Untersuchungen mit Röhren, welche anhand dieses Modells hergestellt wurden, zeigen, daß die Anzahl der Elemente im Umfang der Röhre nicht genau festgelegt ist. Bei einer Assembli-

rung entstanden Röhren mit einem Durchmesser von 7-20 nm. Das entspricht einem Umfang von vier bis zehn DX-Elementen. Der Bereich, in dem Umfang liegt, ist von der Art des DX-Elementes abhängig. Die Länge der gebildeten Röhren reicht bis zu 50 μm . Durch Einbau eines Fortsatzes in Form eines *Hairpins* in das DX-Element wird die Röhrenbildung beeinflusst. Je nachdem, an welcher Stelle im DX-Element der *Hairpin* eingebaut ist, können auch Röhren entstehen, bei denen die Helices um 90° gegenüber normalen Röhren gedreht sind. An diesem Beispiel wird deutlich, daß kleine Änderungen an einem Baustein die gebildeten Netzwerke grundlegend ändern können.

Durch Markierung von DNA-Oligonukleotiden mit einem Fluoreszenzmarker konnten Ekani-Nkodo et al. die Assemblierung von Röhren aus DX-Elementen mit dem Fluoreszenzmikroskop direkt beobachten [57]. Es wurde festgestellt, daß die Abkühlrate während der Hybridisierung die mittlere Länge der gebildeten Röhren beeinflusst. Nach schnellem Abkühlen bilden sich erst kurze Röhren. Mit der Zeit nimmt dann die Länge der Röhren zu und deren Anzahl ab. Bei diesem Prozeß können sich mehrere Röhren verbinden. Es wurden bis zu 120 μm lange Röhren erzeugt.

Weitere Bausteine, mit denen sich Röhren erzeugen lassen, sind die schon bei den zweidimensionalen Netzwerken erwähnten DDX-Elemente [50] und 4x4-Kacheln [15].

Komplexere Strukturen erfordern in der Regel eine hohe Anzahl an unterschiedlichen Oligonukleotiden. Liu et al. zeigten, daß man durch Ausnutzung von Symmetrien Röhren mit einem DNA-Oligonukleotid herstellen kann [58]. Das Oligonukleotid enthält palindromische Sequenzen (Abbildung 21). Diese sind selbstkomplementär, wodurch gleiche Oligonukleotide aneinander hybridisieren können. Selbstkomplementäre Sequenzen werden aus genau diesem Grund in der Regel bei der Belegung von Oligonukleotiden mit einer Basensequenz vermieden. Zuerst bildet sich ein Konstrukt aus zwei solchen Oligonukleotiden. Es besitzt zwei nebeneinander liegende Doppelhelices. An den Enden der Helices wechselt ein Einzelstrang zu der anderen Doppelhelix, während der andere ein *sticky end* bildet. Diese Konstrukte können nun miteinander hybridisieren und ein Netzwerk aufbauen. Die Netzwerke können sich zu Röhren zusammenrollen, welche eine Chiralität aufweisen.

Rothemund entwickelte einen völlig anderen, nicht auf der Zusammenlagerung einzelner Bausteine beruhenden Ansatz, um DNA-Netzwerke zu erzeugen [59]. Bei dieser Technik wird ein langer DNA-Einzelstrang mit Hilfe von kurzen DNA-



Abbildung 21: Schematische Darstellung der Assemblierung eines Netzwerkes aus gleichen Oligonukleotiden. (a) Die DNA-Sequenz eines Oligonukleotides enthält vier palindromische Abschnitte. (b) Komplex aus zwei Oligonukleotiden. (c) Diese Komplexe können zu Netzwerken assemblieren. Abb. aus [58].

Oligonukleotiden gezielt gefaltet. Die entstandenen Strukturen bestehen aus aneinandergelegten Doppelsträngen. Der durch die gesamte Struktur laufende Einzelstrang bildet einen Teil der Doppelhelix. Die DNA-Oligonukleotide hybridisieren jeweils an mehreren Stellen des langen DNA-Einzelstranges und bestimmen, wie sich dieser faltet. Mit dieser als "DNA-Origami" bezeichneten Technik lassen sich verschiedene, auch nicht periodische zweidimensionale Strukturen erzeugen (Abbildung 22). In diesen Strukturen läßt sich das Prinzip der DX-Elemente wiederfinden.

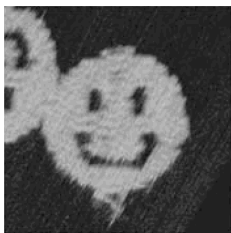


Abbildung 22: AFM-Abbildung eines DNA-Origami-Netzwerkes von Rothemund. Abb. aus [59].

Eine Anwendungsmöglichkeit für DNA-Strukturen ist die Lösung von Problemen aus der Informatik. Die gleichzeitige Hybridisierung vieler DNA-Stränge ermöglicht paralleles "Rechnen". Durch die Möglichkeit, hochgradig parallel zu arbeiten, ist z.B. bei Pfad-Problemen eine schnellere Auffindung einer Lösung als mit dem Computer denkbar. Winfree et al. zeigten im theoretischen Modell, daß sich das Hamilton-Pfad-Problem mit einem DX-Netzwerk lösen läßt [60].

Rothemund et al. belegten, daß sich mit algorithmischer Selbstassemblierung von DX-Elementen DNA-Netzwerke mit einem Muster aus Sierpinski-Dreiecken herstellen lassen [61]. Bei einer solchen algorithmischen Selbstassemblierung kann schon ein einziger falsch eingebauter Baustein im Netzwerk den Algorithmus stören und dadurch große Teile des Netzwerkes verändern. Das kann beim "Rechnen" mit DNA zu falschen Ergebnissen führen. Ursachen der Fehlerentstehung und Fehlerfortpflanzung sowie Möglichkeiten von deren Vermeidung und Korrektur wurden von Winfree und Bekbolatov [62] sowie Barish et al. [63] untersucht. Neben dem Design eines Netzwerkes können die Hybridisierungsbedingungen die Fehlerrate wesentlich beeinflussen.

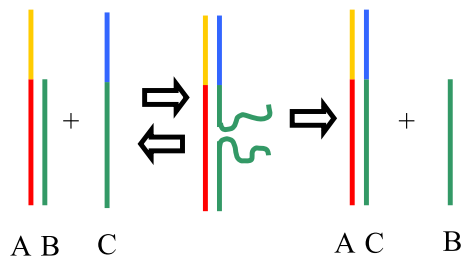


Abbildung 23: Schematische Darstellung zur Ablösung eines Oligonukleotids von einem zweiten. Dieses Grundprinzip für DNA-Motoren wurde in [64] zur Konstruktion eines Schalters verwendet. Im Ausgangszustand ist Oligonukleotid A an Oligonukleotid B, welcher Teil einer molekularen Maschine ist, hybridisiert. Oligonukleotid A besitzt ein gelb gezeichnetes sticky end. Daran kann Oligonukleotid C hybridisieren. Oligonukleotid C löst nun Oligonukleotid A von Oligonukleotid B ab. Am Ende liegen die Oligonukleotide A und C als Doppelstrang und Oligonukleotid B einzelsträngig vor.

genanntes *i*-Motiv aus viersträngiger DNA. Viasnoff et al. synthetisierten ein DNA-Oligonukleotid, das sich gezielt in einen Gleichgewichts- und in einen Nichtgleichgewichtszustand schalten läßt [67]. Durch langsames Abkühlen mit Raten unter $100^{\circ}\text{C}/\text{s}$ wird der Gleichgewichtszustand erreicht, während sehr schnelles Kühlen mit Geschwindigkeiten von über $100^{\circ}\text{C}/\text{ms}$ das Molekül in einer alternativen Konformation festsetzt.

Eine interessante Möglichkeit ist, Schalter aus DNA über die Zugabe von DNA-Oligonukleotiden zu betätigen. Ein solches Umschalten wurde von Yurke et al. mit dem Öffnen und Schließen einer Pinzette demonstriert [64]. Zum Zurücksetzen eines Schalters ist ein Ablösen von Oligonukleotiden notwendig. Das Prinzip des Ablöses ist in Abbildung 23 dargestellt. Mit diesem Prinzip wurden verschiedene weitere Schalter aufgebaut. Yan et al. zeigten, daß es mit diesem Prinzip möglich ist, ein DX-Element als Schalter zu verwenden [68]. Schaltet das Element, werden die Doppelhelices auf einer Seite vertauscht. Chhabra et al. belegten, daß man mit DNA ein System aus molekulare Pinzetten aufbauen kann [69]. Dieses könnte für ein spezifisches Zusammenbringen von Molekülen für chemische Reaktion verwendet

Eine weitere Richtung in der Forschung ist die Entwicklung von molekularen Maschinen aus DNA. Diese molekularen Maschinen lassen sich als schaltbare DNA-Bausteine bzw. Netzwerke auffassen. Diese chemisch und mechanisch schaltbaren Elemente können mit verschiedenen Mechanismen angetrieben werden. Mao et al. zeigten, daß sich der B-Z-Übergang von DNA zur Erzeugung eines Schalters nutzen läßt [65]. Dieser Schalter arbeitet über die Änderung der Ionenstärke im Puffer. Eine Umfaltung eines Oligonukleotids durch pH-Wert-Änderung läßt sich für ein Umschalten nutzen, wie Liu et al. zeigten [66]. In dem einen Zustand bildet das Oligonukleotid mit einem zweiten Oligonukleotid einen Doppelstrang aus. Bei niedrigen pH-Werten bildet sich ein zweiter Zustand, so-

werden. Fend et al. zeigten, daß verstellbare Gitter aus DNA möglich sind [70]. Verstellt wird das Gitter über das Auflösen von *Hairpins*, welche dann in das Gitter mit eingebaut werden.

Ein Nachteil vieler Elemente ist, daß sie diskontinuierlich arbeiten, d.h. für jeden Schritt ein Eingriff von außen erfolgen muß. Turberfield et al. zeigten einen kontinuierlich laufenden Prozeß, bei welchem nur DNA zum Einsatz kommt [71]. Als Energiequelle dient ein aus zwei Oligomeren bestehender Komplex. Dieser wird durch ein als Katalysatorstrang arbeitendes Oligonukleotid aufgelöst. Der Katalysatorstrang wechselt bei jedem Auflösen eines Komplexes kurzzeitig in einen doppelsträngigen Zustand. Dieser Wechsel wird so lange fortgesetzt, wie die als Energiequelle verwendeten Komplexe vorhanden sind. Die Bewegung des "Motors" besteht in dem Übergang zwischen geknäultem (einzelssträngigem) und gestrecktem (doppelsträngigem) Zustand des Katalysatorstranges.

Chen et al. konstruierten einen autonomen DNA-Motor, welcher zwischen zwei Zuständen schaltet [72]. Das Prinzip des Motors beruht auf der Hybridisierung eines Oligonukleotides an einer vorgegebenen Stelle. Nach dem Ausbilden einer Doppelhelix wird das Oligonukleotid von einem am Motor angebrachten Enzym in zwei Teile zerschnitten und fällt wieder ab. Auch hier besteht die Bewegung im Übergang zwischen geknäultem und gestrecktem Zustand.

Neben "einfachen" Schaltern wurden auch schon komplexere Systeme erzeugt. Yin et al. entwickelten einen DNA-Walker, welcher auf einem vorgegebenen Weg in eine Richtung entlangwandern kann [73]. Auf dem Weg befinden sich Ankerpunkte. Im Ausgangszustand befindet sich der Walker, ein aus sechs Basen bestehendes DNA-Molekül, an dem ersten Anker. Durch Ligation wird er an den nächsten Anker gebunden und anschließend mittels Restriktionsenzymen vom ersten Anker abgeschnitten.

2.6 Funktionalisierung und Metallisierung von DNA

Neben dem Rechnen mit DNA und dem Aufbau von molekularen Maschinen ist eine Anwendung von DNA-Strukturen als Templat für Schaltkreise denkbar. Zwei wesentliche Aspekte dazu sind die Funktionalisierbarkeit einzelner Basen, was eine gezielte Platzierung von Molekülen an der DNA erlaubt, und die Metallisierung, welche die Herstellung einer leitfähigen Verbindung ermöglicht.

Ein Beispiel für eine gezielte Platzierung von Kolloiden an einer DNA-

Verzweigung ist in Abbildung 24 dargestellt [74]. Am Verzweigungspunkt der 3-Arm-Verzweigung wurden biotinylierte Basen eingebaut. An diese können mit Streptavidin funktionalisierte Goldkolloide angebunden werden.

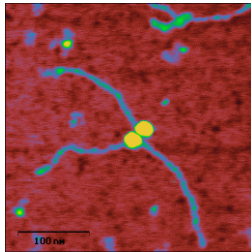


Abbildung 24: AFM-Abbildung eines Dreibeins mit zwei am Verzweigungspunkt immobilisierten Goldkolloiden. Abb. aus [74].

DNA-Netzwerke erlauben eine geordnete, zweidimensionale Platzierung von Partikeln. Über funktionalisierte Basen lassen sich z.B. Proteine spezifisch im Netzwerk positionieren [75]. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, ein Partikel mit einem DNA-Oligonukleotid zu verbinden. Dieser Komplex kann dann an einen komplementären Einzelstrangabschnitt im Netzwerk hybridisiert werden. Daß eine solche Anlage an definierter Stelle im Netzwerk möglich ist, wurde mit Goldpartikeln gezeigt, welche über eine Thiolbindung an ein DNA-Oligonukleotid gebunden wurden [76–78]. Diese zweite Möglichkeit erlaubt eine spezifische Anordnung unterschiedlich großer Partikel.

Lin et al. zeigten, daß sich röhrenförmige DNA-Netzwerke mittels einer Stempeltechnologie in hoch geordneten, periodischen Feldern anordnen lassen [79]. Auf diese Weise können auch an den Röhren angebrachte Partikel in periodischen Feldern auf einer Oberfläche plaziert werden.

DNA eignet sich aufgrund des geringen Durchmessers von 2 nm und des hohen Aspektverhältnisses – dem Verhältnis von Moleküllänge zu Durchmesser – hervorragend als Templat für einen Nanodraht. Da die DNA als Molekül für Längen ≥ 100 nm nichtleitend ist, muß sie zur Erzeugung eines Nanodrahtes leitfähig gemacht werden. Eine Metallisierung der DNA kann in zwei Schritten erreicht werden. Im ersten Schritt steht die Schaffung von aktiven Zentren an der DNA, welche eine weitere Metallisierung in einem zweiten Schritt ermöglichen.

Für den ersten Schritt lassen sich Verfahren zur Anbindung von metallischen Kolloiden und die Aktivierung mit Metallsalzen unterscheiden. Neben den schon beschriebenen Möglichkeiten für eine spezifische Anordnung von Kolloiden an der DNA ist für eine Metallisierung der gesamten DNA eine unspezifische Anbindung ausreichend. Eine solche unspezifische Anbindung wird z.B. bei der elektrostatischen Anbindung positiv geladener Kolloide an negativ geladene DNA erzeugt [80]. Eine Aktivierung von DNA mit Metallsalzen wurde bisher mit Silber [81], Platin [19], Palladium [82] und Kupfer [83] gezeigt.

Im zweiten Schritt wird an den aktiven Zentren weiteres Metall abgeschieden.

Das Wachstum von Partikeln an DNA wurde bisher mit Silber [20, 81], Palladium [82], Platin [19, 84], Gold [85, 86], Kupfer [83] und Nickel [87] gezeigt. Im Ergebnis der Metallisierung können mit λ -DNA Clusterketten mit minimalen Clustergrößen von 3 nm [19] und leitfähige Drähte mit 7 nm Durchmesser [88] erzeugt werden. Über die Metallisierung von DNA-Netzwerken wurden leitfähige Nanodrähte mit Durchmessern im Bereich von 40 nm hergestellt [89, 90]. Es konnten bis 5 μm lange Drähte erzeugt werden.

Die Konditionen für die Schaffung von aktiven Zentren und das Wachstum von Partikeln an DNA wurden für die Bildung von Clusterketten an DNA mit K_2PtCl_4 in [19] und [84] untersucht. Es wurde ein Bereich der chemischen Reaktionsbedingungen gefunden, in dem eine gleichmäßige und reproduzierbare Bildung von Clusterketten möglich ist. Bei einer templatgesteuerten heterogenen Clusterbildung entlang der DNA kann die homogene Clusterbildung in der Lösung vollständig unterdrückt werden.

Dazu wird im ersten Schritt die DNA zusammen mit den Metallsalzen in Lösung inkubiert. Diese Aktivierung der DNA findet in einer gealterten K_2PtCl_4 -Lösung statt. Als optimal für die weiteren Prozessschritte wurde eine 10 mM K_2PtCl_4 -Lösung gefunden. Der Platinkomplex hydrolysiert teilweise und liegt im Gleichgewicht zu 35% als $[\text{PtCl}_4]^{2-}$, zu 58,5% als $[\text{PtCl}_3(\text{H}_2\text{O})]^-$ und zu 6,5% als $[\text{PtCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ in dieser Lösung vor. Die Einstellung des Gleichgewichts ist nach ca. 24 Stunden erreicht. Optimale Bedingungen für die Aktivierung bieten Konzentrationen von auf 1 mM verdünnter, gealterter K_2PtCl_4 -Lösung und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA. Dabei kommt es zu Bindung der hydrolysierten Platinkomplexe an die DNA. Die Anlagerung der Metallionen erfolgt bevorzugt an der N7-Position des Guanins, gefolgt von der des Adenins. Bis zu drei Pt(II)-Komplexe können an ein Basenpaar binden. Um eine Besetzung aller Bindungsstellen zu ermöglichen, ist eine lange Inkubation (ca. 20 Stunden) der DNA mit einer gealterten K_2PtCl_4 -Lösung notwendig. Die angebondenen Metallkomplexe stehen bei der nachfolgenden Reduktion als Keimbildungsstellen zur Verfügung.

Während der Aktivierung verkürzt sich die DNA. Bei der 16 μm langen λ -DNA wurde nach 16 Stunden Inkubationszeit mit K_2PtCl_4 -Lösung mit dem Atomkraftmikroskop (AFM) eine Länge von 1,5 bis 2,9 μm gemessen. In den AFM-Bildern hat die DNA viele Knicke und ist teilweise eng zusammengerollt. Als Ursache der Verkürzung ist daher der Übergang zu einer Knäuelstruktur anzusehen. Durch Zugabe von Na^+ -Ionen während der Aktivierung läßt sich die DNA etwas stabilisieren.

Nach 16 Stunden Inkubationszeit mit 100 mM Na_2SO_4 beträgt die Länge der DNA 3,5 bis 9,7 μm . Die Störungen in der DNA sind deutlich geringer [91].

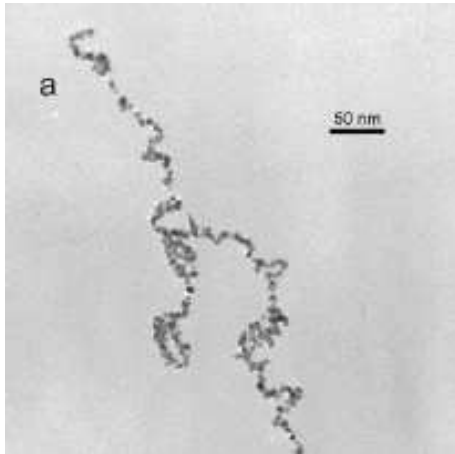


Abbildung 25: Mit K_2PtCl_4 metallisierte λ -DNA. Abb. aus [91].

Nach der Aktivierung wurde mit 1 mM Dimethylaminoboran (DMAB) reduziert. Bei der nun stattfindenden Metallisierung erfolgt eine Metallabscheidung heterogen an der aktivierten DNA durch Reduktion der Platinkomplexe aus der Lösung. Als Ergebnis einer solchen Metallisierung wurden in Ketten angeordnete Cluster mit 5 nm Durchmesser erhalten (Abb. 25). Außer dem hier verwendeten DMAB wurden auch Glutaraldehyd [92], NaBH_4 oder UV-Licht [20] zur Reduktion der Metallsalze eingesetzt.

Die Reaktionszeit ist abhängig von der Aktivierungszeit. Mit steigender Aktivierungszeit sinkt die Reaktionszeit (Abbildung 26). Ohne Aktivierung und bei sehr langer Aktivierung (50 Stunden) gibt es keine Unterschiede zwischen AT- und GC-reicher DNA in der Reaktionszeit bei gleicher Aktivierungszeit. Dazwischen ist für GC-reichere DNA eine kürzere Reaktionszeit feststellbar. Ursache dafür ist, daß die Anbindung an Guanin schneller erfolgt als an andere Basen. Bei längerer Aktivierungszeit werden auch

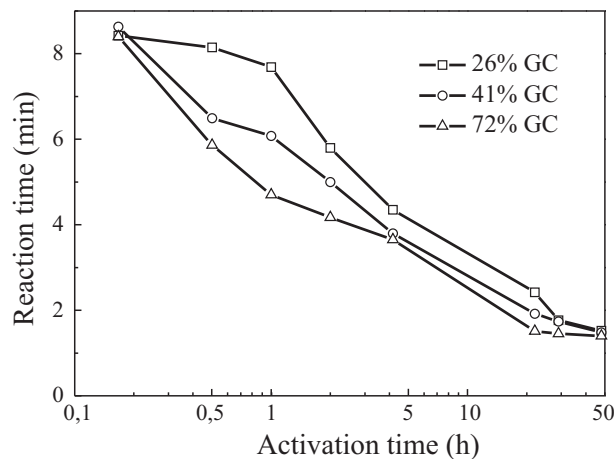


Abbildung 26: Metallisierung von DNA mit unterschiedlichen GC-Gehalten. Abb. aus [93].

alle anderen Bindungsstellen mit Pt-Komplexen belegt. Die größten Unterschiede findet man nach einer Stunde Aktivierungszeit. In diesem Zeitfenster besteht die Möglichkeit, die Metallisierung bevorzugt an GC-Basen stattfinden zu lassen [93].

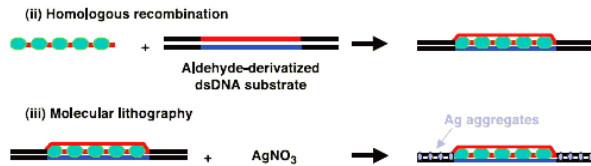


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Abdeckens von DNA-Abschnitten mit Proteinen. Abb. aus [92].

Bei der Metallisierung von DNA wird an der gesamten DNA Metall abgeschieden. Keren et al. zeigten, daß es möglich ist, durch Abdecken von einzelnen DNA-Abschnitten mit Proteinen die DNA gezielt in bestimmten Bereichen zu metallisieren [92]. Bei diesem Verfahren wird zuerst ein

DNA-Einzelstrang mit RecA-Monomeren zu einem Nucleoprotein Filament zusammengelagert. Dieses kann sequenzspezifisch an einen DNA-Doppelstrang binden (Abbildung 27). An dem abgedeckten Bereich findet keine Metallisierung statt. Somit lassen sich gezielt Bereiche der DNA von der Metallisierung ausschließen, was eine sequenzspezifische molekulare Lithographie ermöglicht.

3 Methoden zum Aufbau von künstlichen DNA-Strukturen

Der Aufbau von künstlichen DNA-Strukturen läßt sich in drei Basisschritte zerlegen: den Entwurf, die Synthese und die Analyse. Ziel des Entwurfes ist die Vorausberechnung eines Netzwerkes, welches dann aus DNA-Oligonukleotiden definierter Basensequenz aufgebaut werden kann. Eine genaue Vorhersagbarkeit des Netzwerkes ist allerdings noch nicht vollständig möglich. So kann z.B. die Lage eines *Hairpins* in einem Baustein die Struktur eines Netzwerkes wesentlich beeinflussen, wobei die Ursache dafür noch nicht in jedem Fall geklärt ist [13]. Ein "Baukasten", mit dem die molekulare Geometrie eines DNA-Netzwerkes festgelegt werden kann, ist daher nur in Ansätzen vorhanden. In aller Regel geht man deshalb beim Entwurf iterativ vor. Nachdem ein Entwurf erstellt und die Struktur synthetisiert wurde, ist folglich eine anschließende praktische Kontrolle bzw. Analyse des Netzwerkes notwendig. Die Analyse wurde in dieser Arbeit mittels Gelelektrophorese, Schmelzen der DNA-Strukturen und Atomkraftmikroskopie durchgeführt. Bei der Analyse gewonnene Erkenntnisse sind der Ausgangspunkt für ein geändertes Basen- bzw. Konstruktionsdesign, bis sich die gewünschte Struktur des Netzwerkes bildet.

3.1 Entwurf von DNA-Bausteinen

Zur Erläuterung, wie der theoretische Entwurf in dieser Arbeit erzeugt wird, wird nachstehend eine Unterteilung in einzelne Schritte vorgenommen. Die einzelnen Schritte werden am Beispiel des Entwurfes eines eindimensionalen Netzwerkes aus DX-Elementen erläutert. Beim realen Ausarbeiten eines Entwurfes ist eine klare Trennung der Schritte meist nicht möglich, da die Schritte ineinander übergehen. Es kann möglich sein, daß sich festgelegte Teile des Entwurfes in einem folgendem Schritt als nicht realisierbar herausstellen. Dann muß man den Entwurf dieser Teile in dem vorhergehenden Schritt prüfen und optimieren. Obwohl eine vollständige Vorhersagbarkeit noch nicht möglich ist, kann beim Entwurf auf einige grundlegende Prinzipien zurückgegriffen werden.

Der erste Schritt beim Entwurf einer Struktur besteht darin, die Zielstruktur zu definieren. Es muß die Frage beantwortet werden, wie die Struktur am Ende aussehen soll. Die Struktur kann mit verschiedenen Grundelementen aus DNA zusammengesetzt werden. Das wesentliche Element ist ein Abschnitt der DNA-

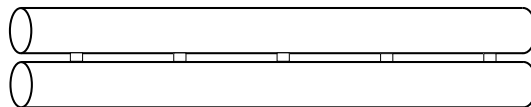


Abbildung 28: Schematische Darstellung eines Entwurfes im ersten Schritt. Es soll eine lineare Struktur mit zwei nebeneinander liegenden Helices entworfen werden. Die Länge der Struktur ist nicht begrenzt. Die beiden als Zylinder dargestellten Doppelhelices sind untereinander durch Einzelstrangaustausch an verschiedenen Stellen miteinander verbunden.

Doppelhelix. Diese Doppelstrangabschnitte werden über flexible Einzelstrangabschnitte bzw. einen Einzelstrangaustausch miteinander verbunden. Dabei muß eine ausreichende Steifigkeit der Struktur gewährleistet werden.

In Abbildung 28 ist ein Beispiel für einen einfachen Entwurf im ersten Schritt dargestellt. Es soll eine lineare Struktur aufgebaut werden. Diese wird im Entwurf über die Kombination von zwei Grundelementen erreicht. Die Grundelemente sind die DNA-Doppelhelix und der Einzelstrangaustausch. Die DNA-Doppelhelices werden als steifer Stab betrachtet. Eine Verbindung der beiden Helices erfolgt über einen Einzelstrangaustausch in regelmäßigen Abständen. Die Steifigkeit der beiden verbundenen Doppelhelices ist gegenüber einzelnen Doppelhelices erhöht. Dadurch bleibt die Struktur auch bei größerer Länge, d.h. größer als die Persistenzlänge des einzelnen DNA-Doppelstranges, noch steif.

Ist definiert, was für ein Netzwerk aufgebaut werden soll, erfolgt im zweiten Schritt eine Zerlegung in Bausteine. Bei komplexeren Netzwerken kann es sinnvoll sein, mehrere Bausteine zu einer Untereinheit zusammenzufassen. Es muß festgelegt werden, wie viele verschiedene Bausteine verwendet werden sollen und welche Bausteine sich wie zusammenlagern. Bei der Zerlegung in Bausteine geht man in diesem Schritt davon aus, daß über eine *sticky-end*-Verknüpfung eine zielgerichtete Zusammenlagerung der Bausteine immer möglich ist. Die Zusammenlagerung muß eindeutig vorhersagbar sein.

Um die Gestaltung in den nächsten Schritten möglichst einfach zu halten, sollte ein Netzwerk in möglichst einfache Bausteine und eine möglichst geringe Anzahl verschiedener Bausteine aufgeteilt werden. Je mehr unterschiedliche Bausteine vorhanden und je größer die Bausteine sind, desto mehr unterschiedliche Oligonukleotide werden zum Netzwerkaufbau im nächsten Schritt benötigt. Die Anzahl der notwendigen Bausteine läßt sich durch Ausnutzung von Symmetrien verringern.

Ein großer Vorteil bei der Konstruktion von selbstassemblierenden DNA-

Netzwerken ist es, schon vorhandene Bausteintypen wie in einem Baukastensystem zu nutzen. Lassen sich keine vorhandenen Bausteine nutzen, ist eine mit hohem Aufwand verbundene Neuentwicklung notwendig. In Abbildung 29 ist das Netzwerk in Bausteine zerlegt. Ein Baustein umfaßt einen Abschnitt mit beiden Doppelhelices, in dem zwei Stellen mit einem Einzelstrangaustausch liegen. Dieser Abschnitt entspricht einem DX-Element. Das Netzwerk soll hier aus gleichen DX-Elementen aufgebaut werden, welche aneinandergesetzt werden.

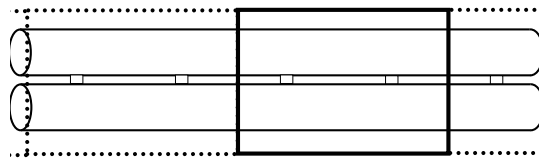


Abbildung 29: Schematische Darstellung eines Entwurfes im zweiten Schritt. Die Struktur wurde in einzelne Segmente, die gleichzeitig den Bausteinen entsprechen, zerlegt. Das Netzwerk soll aus einem sich immer wiederholenden Baustein aufgebaut werden. Dieser Baustein ist ein DX-Element. Ein Baustein ist mit einer durchgehenden Linie umrahmt, die restliche Zerlegung ist durch eine punktierte Linie markiert.

Die Zerlegung in DX-Elemente ist in diesem Fall als optimal anzusehen. Würde der Baustein nur einen Einzelstrangaustausch besitzen, entspräche das einer 4-Arm-Verzweigung. Da einzelne Verzweigungen flexibel sind, wäre die Zusammenlagerung von Bausteinen nicht mehr eindeutig. Die Verwendung eines größeren Bausteins mit einem Einzelstrangaustausch an drei Stellen ist grundsätzlich auch möglich. Dieser Baustein ist jedoch komplexer und erfordert somit mehr Aufwand in den folgenden Schritten.

Ist die Zerlegung des Netzwerkes in Bausteine festgelegt, erfolgt im dritten Schritt die Zerlegung der Bausteine in Oligonukleotide. Am Ende dieses Schrittes sind für jeden Baustein die Anzahl, die Länge und die sich bildenden Doppelstrangabschnitte der Oligonukleotide festgelegt. Der Schritt läßt sich in einen ersten Teil, in dem der Verlauf der Oligonukleotide ohne eine definierte Anzahl an Basen festgelegt wird, und einen zweiten Teil, in dem dann die Basenanzahl festgelegt wird, aufsplitten.

Bei der Zerlegung der Bausteine in Oligonukleotide ist einerseits zu beachten, daß sich lange Oligonukleotide schlechter synthetisieren lassen. Die Ursache dafür liegt in der Art der Herstellung der synthetischen Oligonukleotide. Die einzelnen Basen werden nacheinander angekoppelt. Geschieht hier ein Fehler, wird i.d.R. eine

Base nicht mit eingebaut und das resultierende Oligonukleotid wird kürzer. Die Kopplungseffizienz, welche die Rate der korrekt angebotenen Basen beschreibt, liegt bei fast 100%. Bei einer fast vollständigen Ankopplung mit einer Kopplungseffizienz von 99% beträgt die Ausbeute an vollständig gebildeten Oligonukleotiden bei einem 10 Basen langem Oligonukleotid 90%. Ein 100 Basen langes Oligonukleotid würde in diesem Fall mit einer Ausbeute von nur noch 37% erzeugt. In nachfolgenden Reinigungsschritten werden die korrekt gebildeten Oligonukleotide von den kürzeren, nicht korrekt gebildeten Oligonukleotiden getrennt. Von einem 10 Basen langen Oligonukleotid müssen die bis zu 9 Basen langen, fehlerhaft gebildeten Oligonukleotide abgetrennt werden. Der Längenunterschied beträgt in diesem Fall 10%. Bei einem Oligonukleotid mit 100 Basen beträgt der Längenunterschied nur noch 1%. Die Auftrennung der Oligonukleotide wird dadurch mit steigender Länge schwieriger. Eine geringere Ausbeute ist bei den in der Forschung eingesetzten geringen DNA-Mengen nicht weiter kostenrelevant. Mit Blick auf eine mögliche spätere Anwendung mit einer hochgradig parallelen Herstellung von Strukturen ist von deutlich größeren DNA-Mengen auszugehen. Die Unterschiede werden dann sowohl in Bezug auf die einzusetzenden Rohstoffe als auch bei der anfallenden Abfallmenge beträchtlich sein. Daraus läßt sich eine Strategie zum Aufbau der Bausteine aus möglichst kurzen Oligonukleotiden ableiten. Andererseits kann man die Oligonukleotide jedoch auch nicht beliebig kurz wählen, da eine stabile Struktur aufgebaut werden soll. Um ein Netzwerk aufbauen zu können, sind Verzweigungen erforderlich. Bei einer 3-Arm-Verzweigung ist jedes Oligonukleotid an zwei weitere hybridisiert. Soll eine Verzweigung in eine Struktur integriert werden, muß es Oligonukleotide geben, die noch an ein drittes Oligonukleotid hybridisieren. Damit die Hybridisierung mit einem weiterem Oligonukleotid stabil ist, muß die gebildete Doppelhelix lang genug sein. In den Bausteinen ist eine Windung einer Doppelhelix i.d.R. stabil. Hieraus folgt, daß Oligonukleotide mit einer Mindestlänge von drei Windungen erforderlich sind. Es können auch kürzere Oligonukleotide im Netzwerk vorhanden sein, jedoch läßt sich allein mit diesen kein Netzwerk aufbauen.

Neben der Länge der Oligonukleotide sollte auch die Anzahl der Oligonukleotide nicht unnötig groß sein. Mit zunehmender Anzahl und Größe der Bausteine steigt die Anzahl der erforderlichen Oligonukleotide an. Wie bei der Zerlegung des Netzwerkes in Bausteine können auch bei der Zerlegung der Bausteine in Oligonukleotide Symmetrien genutzt werden. Die Ausnutzung von Symmetrien kann so weit reichen, daß Netzwerke aus einem Oligonukleotid aufgebaut werden können [58].



Abbildung 30: DAE-Element. Schematische Darstellung des Verlaufs der Oligonukleotide ohne Basen. Im Bereich des Einzelstrangaustausches sind die Oligonukleotide gestrichelt dargestellt.

Das als Baustein für das Netzwerk verwendete DX-Element ist ein DAE-Element. Dieses ist in Abbildung 30 schematisch dargestellt. In der Bezeichnung DAE stehen D für DX-Element, A für antiparallel, was die Lage der Helices zueinander beschreibt, und E für even, einer geraden Anzahl halber Windungen zwischen den Strangaustauschpunkten. Dieses DAE-Element besteht aus fünf Oligonukleotiden. Mit dem in der Abbildung ersichtlichen Verlauf der Oligonukleotide sind auch die gebildeten Doppelstrangabschnitte festgelegt. Ein Baustein läßt sich gedanklich in steife Abschnitte aus stabilen Doppelhelices zerlegen,

welche über Strangaustausch miteinander verbunden sind. Bei der Hybridisierung der Oligonukleotide muß der Baustein eindeutig aufgebaut werden können. Das heißt, in diesem Schritt mit Sicherheit auszuschließen, daß sich bei korrekter Basenpaarung andere Strukturen aus den Oligonukleotiden bilden.

In Abbildung 31 ist das in dieser Arbeit für den Aufbau eines Netzwerkes verwendete DX-Element mit der Anzahl der Basen dargestellt. An diesem Punkt ist die Basenbelegung des Bausteins noch nicht festgelegt. Die Bezeichnung N bedeutet, daß alle vier Basen an dieser Stelle möglich sind. Der Baustein besteht aus fünf mit A1 bis A5 bezeichneten Oligonukleotiden. Durch den Verlauf der Oligonukleotide ist für viele Doppelstrangabschnitte eine Länge festgelegt, welche noch um ganze Windungen variiert werden kann.

Die Windungslänge bei B-DNA liegt bei 10,5 Basenpaaren. Da es keine halben Basenpaare gibt, muß ein eine Windung langer Abschnitt aus 10 oder 11 Basenpaaren aufgebaut werden. Eine halbe Windung wird dann entsprechend aus 5 oder 6 Basenpaaren aufgebaut. Die aus der Abweichung eines "halben" Basenpaars resultierende Verdrehung der DNA muß durch die Flexibilität ausgeglichen werden.

In dem Baustein des Netzwerkes ist der durch die Oligonukleotide A3 und A4 gebildete Doppelstrangabschnitt einer Längenfestlegung unterworfen. Da Oligonukleotid A3 am Anfang und am Ende dieses Abschnittes auf den benachbarten Doppelstrang wechselt, ist die Länge auf ganze Windungen festgelegt. Der Abschnitt ist mit 21 bp exakt zwei Windungen lang. Die durch die Oligonukleotide A3 und A5 gebildeten Abschnitte am gegenüberliegenden Doppelstrang ergeben mit 10 und 11 bp Länge ebenfalls zwei Windungen. Der nächstkleinere Abstand zwischen den Strangaustauschpunkten wäre eine Windung, was 10 bp entsprechen würde. Die

vorgestellten Netzwerken zu orientieren. Es gibt einige Beispiele mit vier Basen langen *sticky ends* [17, 48, 90], wobei hier jeweils zwei Bausteine über mindestens zwei *sticky ends* miteinander verbunden sind. Häufig werden Netzwerke mit fünf oder sechs Basen langen *sticky ends* assembliert [13, 15, 16, 57, 95], es gibt aber auch ein Beispiel mit über zehn Basen langen *sticky ends* [58]. Die *sticky ends* des hier entworfenen Bausteins sind auf eine Länge von sechs Basen festgelegt, was eine bei Raumtemperatur stabile Verknüpfung der Bausteine ermöglichen soll.

Wichtig für die Steifigkeit der Bausteine sind die Stellen, an denen ein Oligonukleotid endet und der nächste anfängt. Eine solche Stelle stellt einen Einzelstrangbruch des Phosphatrückgrates dar. Da das stabilisierende Phosphatrückgrat fehlt, sind veränderte Basenstapelungen möglich. Der *Tilt*-Winkel, der sonst durch das Rückgrat eingeschränkt wird, kann an dieser Stelle andere Werte annehmen. Solche Stellen sollten beim Entwurf an nicht kritische Positionen gelegt werden. Eine *sticky-end*-Hybridisierung weist immer zwei Einzelstrangbrüche in einem kurzem Abstand auf und sollte daher nur an unkritische Stellen gelegt werden.

Im letzten Schritt beim Entwurf von Netzwerken werden die Oligonukleotide mit einer Basensequenz belegt. Dazu werden Computerprogramme verwendet. Die Basensequenzen in dieser Arbeit wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, mit dem Programm SEED berechnet [45]. Dieses Programm arbeitet nach den Regeln des Seeman'schen Konstruktionsprinzips (Kapitel 2.5.2). Das Programm erstellt für eine vorgegebene Critonlänge und Struktur des Bausteins einen Sequenz-Graph und eine Critonstruktur. Der Sequenz-Graph beinhaltet die Basensequenzen aller möglichen Critons mit der Information, welche Critons jeweils als Nachfolger möglich sind. Die Critonstruktur stellt die Zerlegung des Bausteins in Critons dar. In der Critonstruktur sind alle gegenseitigen Abhängigkeiten der Critons untereinander enthalten. Diese Abhängigkeiten beinhalten z.B. gleiche Basen durch sich überlappende Critons sowie komplementäre Basen durch auf einem komplementären Strang liegende Critons. Das Programm legt eine Base fest und testet dann mit Hilfe des Sequenzgraphes und der Critonstruktur, ob Konflikte mit den Critonregeln in der Struktur auftreten. Treten keine Konflikte auf, kann die nächste Base festgelegt werden. Anderenfalls muß die Base geändert werden bzw., wenn das nicht möglich ist, muß eine vorhergehende Base geändert werden. Auf diese Weise werden nacheinander alle Basen festgelegt. Wenn eine Lösung gefunden wurde, kann eine Basenbelegung für einen Baustein angegeben werden.

In Abbildung 32 ist der für das Netzwerk verwendete Baustein mit Basenbele-

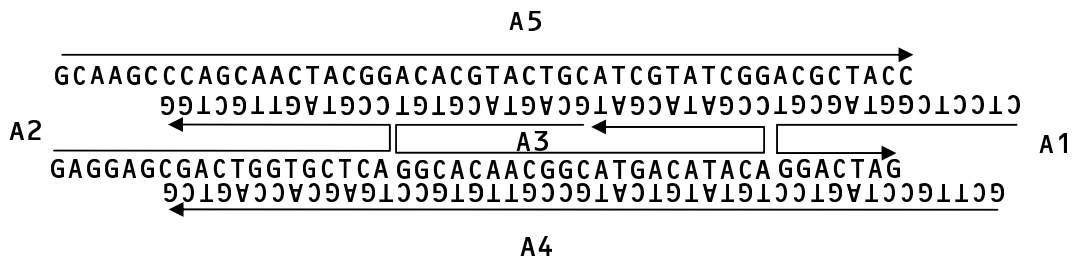


Abbildung 32: DX - Element für ein eindimensionales DX-Netzwerk. Die Oligonukleotide sind mit A1 bis A5 bezeichnet.

gung dargestellt. Der Baustein hat eine Critonlänge von sechs. Die Basensequenz ist aus [95] übernommen, wobei die *sticky ends* mit Hilfe des SEED-Programmes [45], unter Beibehaltung der restlichen Struktur so abgeändert wurden, daß bei einer Zusammenlagerung eine eindimensionale Struktur entsteht. Es gibt in dem Baustein nur eine Möglichkeit für eine Fehlpaarung mit einer Länge von fünf Basen. Die Zusammenlagerung der Bausteine geschieht wie in Abbildung 35b dargestellt.

3.2 Entwurf von DNA-Netzwerken und deren Funktionalisierung

Ein großer Vorteil beim Aufbau von DNA-Netzwerken ist es, durch eine Modifizierung vorhandener Bausteine neue Netzwerke aufzubauen zu können. Verschiedene Möglichkeiten dazu, welche auf DX-Elementen als Baustein basieren, werden im folgenden erläutert. Im einzelnen werden hier der Übergang zum zweidimensionalen Netzwerk über das Vertauschen von *sticky ends* oder die Änderung des Abstandes von Strangaustauschpunkten zwischen den Bausteinen, die Festlegung der Lage von Funktionalisierungen in einem linearen Netzwerk über eine unterschiedliche Zusammenlagerung von DX-Elementen, die Einschränkungen für *sticky ends* bei der Zusammenlagerung von drei DX-Elementen und die "Funktionalisierung" von Bausteinen mit Fortsätzen betrachtet.

Das für das eindimensionale Netzwerk entworfene DX-Element (Abbildung 31) besitzt vier gleich lange 5' *sticky ends*. Ein solcher Baustein kann durch alleiniges Vertauschen der *sticky ends* verschiedene Netzwerke bilden. Diese Möglichkeit am Beispiel der Verknüpfung zweier gleicher DX-Elemente ist in Abbildung 33 dargestellt. Bei der Verknüpfung der Elemente wie in Abbildung 33a hybridisieren die beiden *sticky ends* an einer Seite mit zwei *sticky ends* des nächsten DX-Elementes.

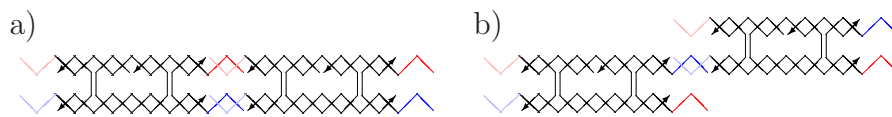


Abbildung 33: Unterschiedliche Verknüpfung zweier DX-Elemente über *sticky ends*. Die rot und blau gefärbten Bereiche sind *sticky ends*, wobei helle und dunkle *sticky ends* gleicher Farbe zueinander komplementär sind. (a) Eine Verknüpfung der DX-Elemente mit zwei *sticky ends*. (b) Durch Vertauschen des roten und blauen *sticky ends* auf einer Seite lagern sich die DX-Elemente versetzt und mit nur einem *sticky end* zusammen.

So können an ein DX-Element bis zu zwei weitere Elemente hybridisieren. Werden mehrere DX-Elemente auf diese Art verbunden, entsteht eine lineare Struktur. In Abbildung 33b sind die *sticky ends* auf der rechten Seite des DX-Elementes vertauscht. Dadurch kann ein weiteres DX-Element nur mit einem *sticky end* an das erste hybridisieren. Mit der versetzten Anordnung können an ein DX-Element bis zu vier weitere hybridisieren. Mit vielen DX-Elementen entsteht ein zweidimensionales Netzwerk. An diesem Beispiel wird deutlich, daß durch kleine Variationen wie das Vertauschen der Basensequenz von zwei *sticky ends* der Aufbau der Bausteine die Struktur des Netzwerkes wesentlich geändert werden kann. Auf diese Weise sind Bausteine in einem Baukastensystem verwendbar. In Kapitel 4 werden zwei auf diese Weise hergestellte Netzwerke gezeigt.



Abbildung 34: In Abhängigkeit der DNA-Länge zwischen den Strangaustauschpunkten findet eine unterschiedliche Zusammenlagerung zwischen den DX-Elementen statt. Das Schema gilt auch für alle Zusammenlagerungen, wenn derselbe Einzelstrang in den Strangaustauschpunkten ausgetauscht wird. Wenn der andere Einzelstrang ausgetauscht wird, verschiebt sich der Abstand um eine halbe Windung. (a) Die Zusammenlagerung von Bausteinen mit einem Abstand von einer Windung zwischen den Strangaustauschpunkten führt zu einem eindimensionalen Netzwerk. (b) Die Zusammenlagerung von Bausteinen mit einem Abstand von eineinhalb Windungen zwischen den Strangaustauschpunkten führt zu einem zweidimensionalen Netzwerk.

In Abbildung 34 ist die Verdrehung zweier DX-Elemente schematisch dargestellt. Die Anordnung der Bausteine wird über den Abstand der Strangaustauschpunkte bestimmt. Das Einfügen einer zusätzlichen halben Windung führt zu einer

Verdrehung um 180° . Die beim rechten DX-Element in Abbildung 34a unten liegende Doppelhelix wird nach oben geklappt. Somit kann auch mit dem Einfügen einer zusätzlichen halben Windung ein Übergang vom ein- zum zweidimensionalen Netzwerk erreicht werden.

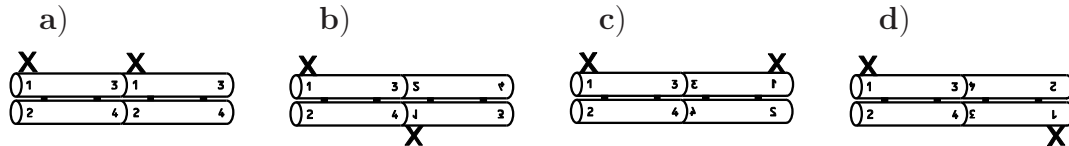


Abbildung 35: Verschiedene Zusammenlagerungsmöglichkeiten zweier DX-Elemente mit beiden Doppelhelices. Die Enden der Doppelhelices sind mit den Zahlen eins bis vier gekennzeichnet. Das X stellt die Position einer Funktionalisierung dar. Durch horizontale bzw. vertikale Verdrehung eines Bausteins ändert sich die Zusammenlagerung der Enden. Die Verdrehung des Bausteins ist an den verdreht dargestellten Zahlen ablesbar. Bei jeder der vier Zusammenlagerungen ist die Lage der Funktionalisierungen zueinander anders.

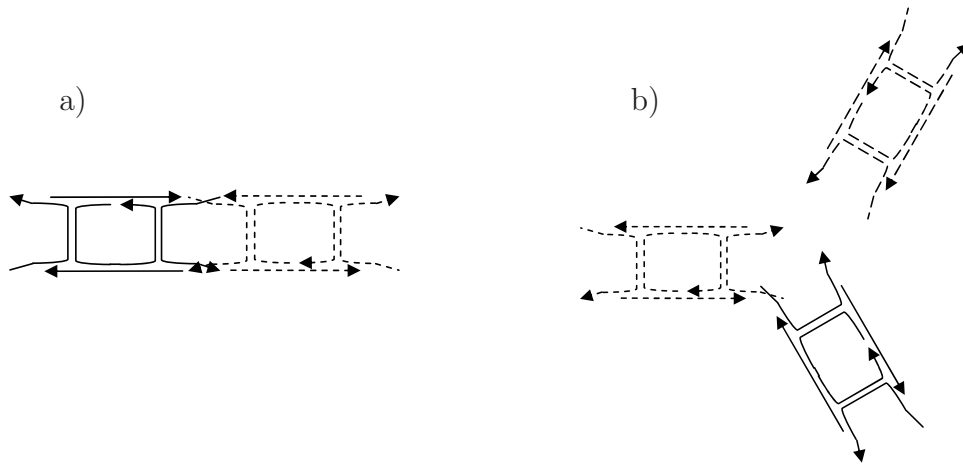


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Verbindung von DX-Elementen. (a) Die zur Verbindung der DX-Elemente benötigten *sticky ends* liegen auf einem Oligonukleotid. Das ermöglicht, durch den Austausch eines Oligonukleotids beide *sticky ends* zu ändern. Das ist vorteilhaft, wenn die Verknüpfung von zwei DX-Elementen mit unterschiedlichen *sticky ends* untersucht werden soll. (b) Eine Verbindung drei solcher DX-Elemente zu einem Dreibein ist mit dieser Konstruktion nicht realisierbar. Durch die Lage auf einem Oligonukleotid ist ein *sticky end* ein 3'- und das andere ein 5'-Überhang. Bei zwei über ein *sticky end* zusammengelagerten DX-Elementen sind entweder zwei 3'- oder zwei 5'-Überhänge frei. Das dritte DX-Element kann nicht an den beiden freien *sticky ends* hybridisieren, da es einen 3'- und einen 5'-Überhang besitzt.

Für die Zusammenlagerung zweier gleicher DX-Elemente mit jeweils zwei *sticky ends* gibt es die in Abbildung 35 dargestellten vier verschiedenen Varianten. Die Varianten lassen sich durch eine Kombination aus den eben erläuterten Methoden des Vertauschens von *sticky ends* und der Verdrehung zweier DX-Elemente erzeugen. Mit allen vier Varianten lassen sich lineare Strukturen aufbauen. Die Unterschiede werden deutlich, wenn sich am DX-Element an der mit X gekennzeichneten Stelle eine Funktionalisierung befindet. Dann wird mit jeder Variante eine andere Anordnung der Funktionalisierungen erzeugt.

Eine Verbindung von Bausteinen kann sowohl über 3'- als auch über 5'-*sticky ends* erfolgen. Die gegenläufige Ausrichtung der Einzelstränge im Doppelstrang erlaubt die Hybridisierung zweier 5'- oder zweier 3'-*sticky ends*. Die Hybridisierung eines 3'- mit einem 5'-*sticky end* ist nicht möglich. Dies muß bei der Bausteingestaltung beachtet werden. Die in Abbildung 36 dargestellten DX-Elemente besitzen auf jeder Seite ein 3'- und ein 5'-*sticky end*. Das erlaubt die Zusammenlagerung von zwei Bausteinen. Die Zusammenlagerung drei solcher Bausteine ist hingegen nicht möglich.

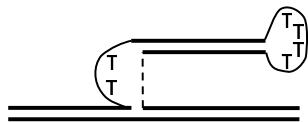


Abbildung 37: Schematische Darstellung eines als *Hairpin* gestalteten Fortsatzes. Die ungepaarten T-Basen erzeugen eine Unterbrechung der Doppelhelix und ermöglichen eine Richtungsänderung eines Einzelstranges.

Eine Möglichkeit zur Gestaltung von Bausteinen ist der Einbau von Fortsätzen. Ein Fortsatz kann z.B. als topographischer Marker oder als einzelsträngiger Fortsatz für eine spätere Hybridisierung von funktionalisierten DNA-Oligonukleotiden genutzt werden. An der Stelle, wo ein Fortsatz an den Baustein angesetzt wird, entsteht eine 3-Arm-Verzweigung. Der flexible Verzweigungspunkt einer solchen Verzweigung stört die durchgehende Doppelhelix und verringert die Steifigkeit des Bausteins. Durch den Einbau einer Ausbuchtung aus ungepaarten Basen (*bulge loop*) in eine Verzweigung wird eine Konfiguration bevorzugt, bei der zwei Arme einen durchgehenden Doppelstrang bilden [40]. Durch einen solchen in Abbildung 37 dargestellten

Einbau ungepaarter Basen kann die Basenstapelung im Baustein durchgehend gestaltet werden. In Abbildung 37 ist weiterhin dargestellt, daß über vier ungepaarte Basen ein Richtungswechsel um 180° gestaltet werden kann. Die ungepaarten Basen von als *Hairpin* gestalteten Fortsätzen bestehen oft aus T-Basen, da diese eine geringe Neigung haben, andere Strukturen zu bilden.

3.3 Synthese

Die zum Aufbau der Netzwerke benötigten DNA-Oligonukleotide wurden bei der Biozym Scientific GmbH bestellt. Die für ein Netzwerk notwendigen Oligonukleotide wurden in einen Puffer gemischt. Als Puffer wurde, wenn nicht anders erwähnt, ein Hybridisierungspuffer, bestehend aus 20 mM Tris, 2 mM EDTA und 12,5 mM MgCl₂, verwendet. Die DNA-Konzentration lag zwischen 0,1 und 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Selbstassemblierung der Oligonukleotide zu den Netzwerken erfolgt über eine Hybridisierung. Die Hybridisierung erfolgt in zwei Schritten. Durch ein Aufheizen auf 90°C für fünf Minuten werden bereits gebildete Doppelstrangabschnitte aufgebrochen. Alle Oligonukleotide liegen einzelsträngig vor. Mit anschließendem langsamen Abkühlen auf 4°C in 16 Stunden wird eine möglichst fehlerfreie Selbstassemblierung erreicht.

Die in der Arbeit hergestellten Verlängerungen für Netzwerke werden über verschiedene molekularbiologische Verfahren synthetisiert. Im ersten Schritt wird über eine PCR ein Stück aus der λ -DNA vervielfältigt. Die unterschiedlichen Verlängerungen werden mit verschiedenen PCR hergestellt. Zum Design der dazu notwendigen PCR-Primer wurde in dieser Arbeit die Software Generunner 3.05 von Hastings Software Inc. verwendet. Anschließend wird durch Schneiden der DNA mit dem Enzym (*HindIII*) die endgültige Länge der Verlängerung festgelegt und ein 5'-*sticky end* mit der Sequenz AGCT auf einer Seite erzeugt. Nach dem anschließendem Auffüllen einer Base mit einer Polymerase (Klenow-Fragment) hat das *sticky end* die Sequenz AGC und ist nicht mehr selbstkomplementär. Dadurch wird in der abschließenden Ligation eine Verbindung der Verlängerungen untereinander auf dieser Seite verhindert. Eine Ligation an der anderen Seite ist ausgeschlossen, weil die bei der PCR eingesetzten Primer an ihren 5'-Enden Hydroxylgruppen haben. Für eine Ligation wäre ein Phosphatrest notwendig. Die genauen Rezepte zur Herstellung der Verlängerungen sind im Anhang zu finden.

Die für die Hybridisierung von DNA-Strukturen verwendeten DNA-Oligonukleotide besitzen herstellungsbedingt am 5'-Ende eine OH-Gruppe. Um eine Ligation dieser Strukturen mit den Verlängerungen zu einem durchgehenden Doppelstrang zu ermöglichen, werden die 5'-Enden mit einer T4-Kinase phosphoryliert. Das Rezept dazu ist ebenfalls im Anhang enthalten.

3.4 Analyse der Strukturen

Bei der Analyse kann ermittelt werden, ob die Bausteine bzw. das Netzwerk überhaupt gebildet werden und wie stark das gebildete Netzwerk fehlerbehaftet ist. Um die Bildung einzelner Oligonukleotide sowie deren Hybridisierung zu untersuchen, eignen sich die Gelelektrophorese und die Bestimmung der Schmelzkurven von Strukturen. Das Aussehen kompletter Netzwerke kann mittels Atomkraftmikroskopie in der Flüssigkeit bestimmt werden.

3.4.1 Untersuchung einzelner Bausteine

Die Gelelektrophorese dient im allgemeinen der Auftrennung von verschiedenen Substanzen. In dieser Arbeit wird sie zur Trennung von DNA-Fragmenten nach deren Größe verwendet. Typische Materialien für Gele sind Agarose und Polyacrylamid. Mit unterschiedlicher Agarose- bzw. Polyacrylamidkonzentration läßt sich eine unterschiedlich dichte Gelmatrix erzeugen. Damit kann eine optimale Auftrennung in einem bestimmten Größenbereich der DNA erreicht werden. Polyacrylamidgele werden mit Konzentrationen von 6% bis über 20% für die Auftrennung von bis etwa 1000 bp langen DNA-Stücken eingesetzt. In dieser Arbeit wurden 6%ige und 8%ige Gele zur Untersuchung von Strukturen aus wenigen Oligonukleotiden und Bausteinen verwendet. Agarosegele werden in niedrigeren Konzentrationen im Bereich von unter 1% bis 10% für die DNA-Stücken ab 100 bp eingesetzt. In dieser Arbeit werden Agarosegele bei der Analyse der Verlängerung der Dreibeinstrukturen verwendet.

Die zu untersuchenden DNA-Proben werden mit einem Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Jede Probe kommt in eine Aussparung im Gel, eine sogenannte Tasche. Die Phosphatgruppen der DNA sind im Puffer der Elektrophorese negativ geladen. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die DNA in Richtung des positiven Poles. Die DNA wird durch die Gelmatrix in ihrer Bewegung behindert. Lange Fragmente werden stärker behindert als kurze, wodurch die unterschiedlichen Fragmente nach der Länge separiert werden. Moleküle gleicher Größe laufen zusammen durch das Gel. Nach einer festgelegten Zeit wird das elektrische Feld abgeschaltet. Die DNA im Gel kann mit einem fluoreszierendem Medium, wie dem in der Arbeit verwendeten Sybr Green I, gefärbt werden. Dann kann die DNA mit einer Fluoreszenzlampe sichtbar gemacht werden. Ist die Größe der DNA-Fragmente uneinheitlich, leuchtet die gesamte Bahn relativ schwach. Sind

viele Moleküle an einer Stelle vorhanden, sind sie als stärker leuchtende Bande sichtbar. Läßt man eine Molekulargewichtsstandard mitlaufen, ist die molekulare Größe der Moleküle in dieser Bande bestimmbar. Die DNA-Fragmente unbekannter Länge können durch Interpolation zwischen DNA-Fragmenten bekannter Länge aus dem Molekulargewichtsstandard bestimmt werden. Der Längenstandard ermöglicht somit eine direkte Aussage über die Basenanzahl bei einzel- oder doppelsträngiger DNA. Bei einem "schief" gelaufenem Gel kann mit einem Längenstandard auf beiden Seiten immer noch eine genaue Aussage getroffen werden, wie weit die einzelnen DNA-Fragmente gelaufen sind. Durch Verbindung einer Bande der beiden Längenstandards erhält man eine Linie, welche einer bestimmten Länge entspricht. Das ist zur Unterscheidung von ähnlich laufenden Konstrukten notwendig.

Als Längenstandard wurde die 50 bp Basenpaarleiter der Firma Invitrogen verwendet. Es gibt 16 Banden zwischen 50 bp und 800 bp mit einem Abstand von jeweils 50 bp. Zusätzlich gibt es eine Bande bei 2652 bp. Die 350 bp Bande ist ca. zwei bis drei mal intensiver als die anderen.

Ob sich Oligonukleotide bei der Selbstassemblierung wie erwartet zusammenlagern, kann man mittels Gelelektrophorese feststellen. Dazu werden die Oligonukleotide für einen ganzen Baustein oder für Teile davon zusammen hybridisiert und anschließend im Gel betrachtet. Dabei werden folgende Fragestellungen beantwortet:

Bildet sich die gewünschte Struktur?

Ist ausreichende Stabilität bei Raumtemperatur vorhanden?

Welche Fehlpaarungen bilden sich in welcher Menge ?

Die bei der Hybridisierung von Oligonukleotiden für DNA-Netzwerke entstehenden Konstrukte bestehen aus Verzweigungen sowie einzel- und doppelsträngigen Abschnitten. Weil diese unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten haben, ist die Basenanzahl nicht über den Längenstandard ablesbar. Da die Länge der für die Bausteine verwendeten DNA-Oligonukleotide vorgegeben ist, können nur Konstrukte mit bestimmten Größen auftreten. Die Bande, welche ein einzelnes Oligonukleotid darstellt, kann im Gel am weitesten laufen. Sind mehrere Oligonukleotide zusammen hybridisiert, entsteht eine neue Bande. Die in der Arbeit untersuchten Netzwerke wurden durch Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden hergestellt. Dabei gibt es drei grundsätzliche Möglichkeiten:

1. Die Oligonukleotide hybridisieren zu einer Struktur, welche stabil durch das Gel

läuft. Diese ist als Bande sichtbar. Über die Lage der Bande lässt sich ermitteln, welche und wie viele Oligonukleotide zusammen hybridisiert sind.

2. Die Oligonukleotide hybridisieren zu einer Struktur, welche nicht stabil durch das Gel läuft. Nach dem Start der Gelelektrophorese zerfällt die Struktur allmählich. Es entsteht ein verschmierter Bereich zwischen der (erwarteten) Bande der bei der Hybridisierung gebildeten Struktur und den Strukturen, in welche die Struktur zerfällt. Ist eine recht hohe Stabilität vorhanden, bekommt man eine Bande mit der noch nicht zerfallenen Struktur aus der Hybridisierung und einen Schmier durch die schon zerfallenen Strukturen. Ist hingegen eine recht niedrige Stabilität vorhanden, zerfällt ein großer Teil der Struktur schon beim Start des Geles. Die nach dem Zerfall entstandenen Produkte sind als Bande sichtbar. Von diesen geht ein Schmier mit den erst später zerfallenen Strukturen ab. Aus der Lage des Schmieres lassen sich Rückschlüsse ziehen, wie hoch die Stabilität ist.

3. Die Oligonukleotide hybridisieren nicht und laufen einzeln durch das Gel. Es sind die Banden der einzelnen Oligonukleotide sichtbar.

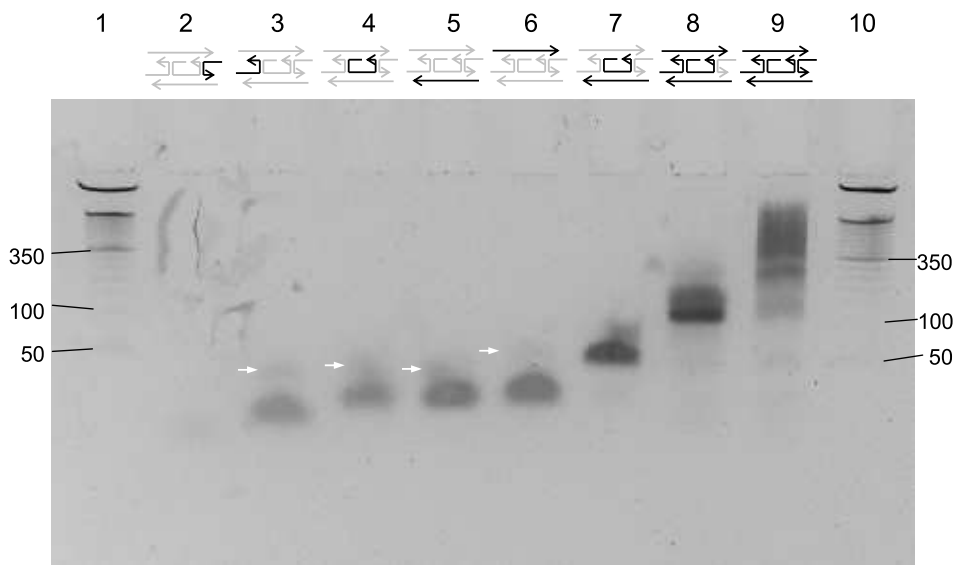


Abbildung 38: Gelbild mit Strukturen des DX-Elementes aus Abbildung 32. Welche Oligonukleotide hybridisiert wurden, ist über dem Gel graphisch dargestellt. In Bahn 1 und 10 befindet sich je eine 50bp-Leiter. Die Banden bei 50, 100 und 350 bp sind markiert. In den anderen Bahnen befinden sich hybridisierte Strukturen aus folgenden Oligonukleotiden: 2: A1; 3: A2; 4: A3; 5: A4; 6: A5; 7: A3+A4; 8: A2+A3+A4+A5; 9: komplettes Element.

Im folgenden soll der für das lineare Netzwerk entworfene und in Abbildung 32

dargestellte Baustein mittels Gelelektrophorese untersucht werden. In Abbildung 38 dienen die beiden 50 bp-Leitern in Bahn 1 und 10 als Längenstandard. Mit diesem kann die Laufweite der Konstrukte untereinander verglichen werden; ein direktes Ablesen der Basenanzahl ist jedoch nicht möglich. Im Gel ist in den Bahnen 2 bis 6 je ein Oligonukleotid vorhanden. Diese Oligonukleotide sind als Bande zu sehen. Die Bande in Bahn 2 ist schwächer, da beim Einfüllen in die Tasche ein Teil der Probe weggelaufen und somit wenig DNA vorhanden ist. Da die einzelnen Oligonukleotide hier nicht mit sich selbst hybridisieren sollen, sind die weiteren Banden Fehlpaarungen. Solche Fehlpaarungen sind bei den Bahnen 3 bis 6 als schwach ausgeprägte Banden sichtbar. Diese Banden wurden mit einem weißen Pfeil markiert. Es treten in geringem Maße Fehlpaarungen auf.

In Bahn 7 sind die Oligonukleotide A3 und A4 zusammen hybridisiert. Dieses Konstrukt zeigt sich durch eine neue Bande bei 50 bp. Die schwache Bande unten zeigt das Vorhandensein einiger weniger, nicht hybridisierter DNA-Oligonukleotide. Das ist möglich, wenn ein Oligonukleotid im Überschuß vorhanden ist und nicht genügend komplementäre Oligonukleotide findet. Fehlpaarungen sind nicht feststellbar. In Bahn 8 sind die Oligonukleotide A2 bis A5 zusammen hybridisiert. Es ist eine Bande bei 100 bp mit Schmier nach oben sichtbar. Die Bande entsteht durch die Zusammenlagerung der Elemente A2 bis A5. Eine Verknüpfung dieser Konstrukte ist über die 6 Basenpaare langen, komplementären *sticky ends* der Oligonukleotide A4 und A5 möglich. Da an jedem Konstrukt zwei solcher *sticky ends* vorhanden sind, lassen sich beliebig viele zusammenlagern. Diese Zusammenlagerung ist jedoch nicht stabil, so daß die Konstrukte im Gel einzeln laufen. In Bahn 9 sind alle Oligonukleotide des Elementes zusammen hybridisiert. Bei 100 bp befindet sich die Bande, welche ein DX-Element repräsentiert. Die nächste Bande liegt bei 300 bp. Hier laufen zwei DX-Elemente zusammen. Diese Bande ist stärker ausgeprägt. Bei 400 bp startet ein Schmier. Hier sind drei DX-Elemente verknüpft. Drei DX-Elemente können stabil durch das Gel laufen. Größere Strukturen, die sich bei der Hybridisierung bilden, sind nicht stabil genug, um als Ganzes durch das Gel zu laufen bzw. in der Tasche hängen zu bleiben. Diese Konstrukte zerfallen während der Gelelektrophorese. Dadurch bildet sich der Schmier im Gel.

In Bahn 1 der Abbildung 39 sind die Oligonukleotide A3 mit A5 hybridisiert. Diese haben je zwei 10 bzw. 11 bp lange komplementäre Abschnitte, welche, wie in Abbildung 40a dargestellt, zusammen hybridisieren sollen. Neben einer Bande mit einzelnen Oligonukleotiden und einer Bande bei 50 bp mit dem Konstrukt

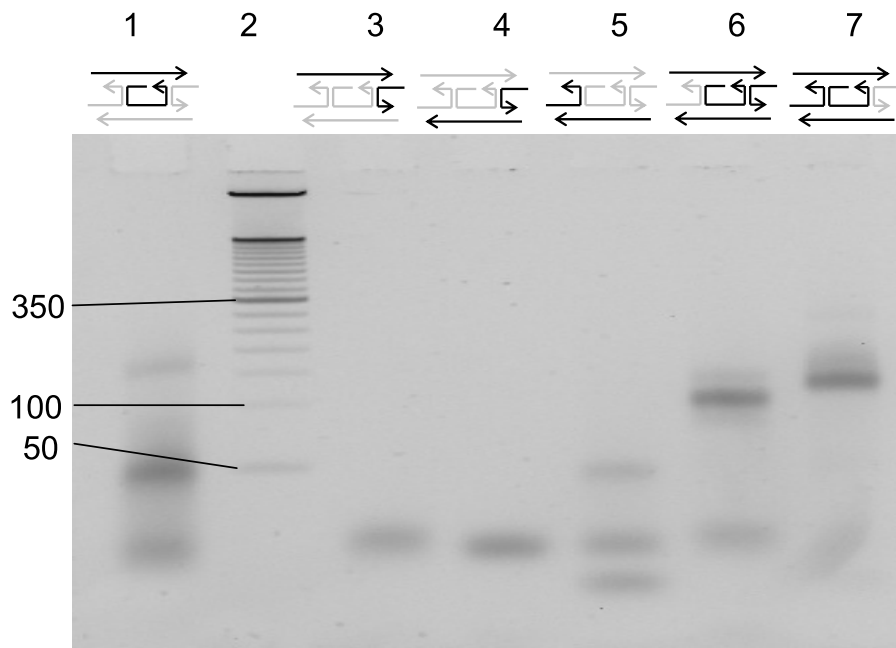


Abbildung 39: Gelbild mit Strukturen des DX-Elementes aus Abbildung 32. Welche Oligonukleotide hybridisiert wurden, ist über dem Gel graphisch dargestellt. Bei der in Bahn 2 befindlichen Leiter sind die Banden für 50, 100 und 350 bp markiert. In den weiteren Bahnen befinden sich hybridisierte Strukturen aus folgenden Oligonukleotiden: 1:A3,A5; 3: A1+A5; 4: A1+A4; 5: A2+A4; 6: A1+A3, A4+A5; 7: A2+A3+A4+A5.

ist im Gelbild jedoch eine dritte Bande bei 150 bp deutlich zu erkennen. Ursache ist, daß die beiden komplementären Abschnitte eines Oligonukleotides an verschiedene Oligonukleotide desselben Typs hybridisieren können. Dadurch können vier Oligonukleotide wie in Abbildung 40b miteinander verbunden werden. Die zwei in Abbildung 40 dargestellten Varianten sind Zusammenlagerungen von Oligonukleotiden zu ringförmigen Strukturen. Neben diesen aus zwei und vier Oligonukleotiden bestehenden Varianten sind auch ringförmige Strukturen mit noch mehr Oligonukleotiden denkbar. Bei der Hybridisierung von DX-Elementen müssen Strukturen wie in (a) erzeugt und Strukturen wie in (b) vermieden werden. Bei der Hybridisierung von allen Oligonukleotiden des DX-Elementes bildet das in Abbildung 40 gelb dargestellte Oligonukleotid A3 mit dem Oligonukleotid A4 einen 21 bp langen Abschnitt. Dieser Abschnitt bildet sich zuerst, da die gebildete Doppelhelix am längsten ist. Bei der Anlagerung weiterer Oligonukleotide an die Struktur bilden sich Vierfachverzweigungen. In Lösung mit zweiwertigen Ionen nehmen Vier-

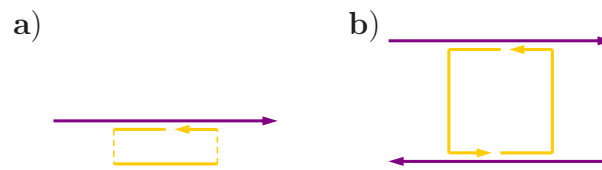


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Zusammenlagerung der Oligonukleotide A3 (gelb) und A5 (lila) mit mehreren komplementären Abschnitten. (a) Zusammenlagerung der Oligonukleotide, so wie im DX-Element vorgesehen. (b) Durch die beiden Doppelstrangabschnitte ist es möglich, daß sich mehr als zwei Oligonukleotide zusammenlagern.

fachverzweigungen die gestapelte X-Konformation an. Dies ist für Strukturen wie in Abbildung 40b energetisch ungünstig. Dadurch werden solche Strukturen wie in Abbildung 40b bei der Hybridisierung aller Oligonukleotide des DX-Elementes nicht gebildet.

In den Bahnen 3 und 4 ist das Oligonukleotid A1 mit A5 bzw. A4 hybridisiert. Die 7 und 8 bp langen Doppelstrangabschnitte sind nicht stabil genug, um die beiden Oligonukleotide zusammen durch das Gel laufen zu lassen. Die im Gel sichtbaren Banden werden durch die Oligonukleotide A5 bzw. A4 hervorgerufen. Das Oligonukleotid A1 ist aus dem Gel herausgelaufen und daher nicht als Bande sichtbar.

In Bahn 5 sind die Oligonukleotide A2 mit A5 hybridisiert, welche einen 13 bp langen Doppelstrangabschnitt bilden. Es befinden sich 3 Banden in dieser Bahn. Diese lassen sich den Oligonukleotiden A2 und A5 sowie einer Bande, in welcher beide Oligonukleotide zusammen hybridisiert sind, zuordnen. Die drei Banden weisen eine ähnliche Intensität auf. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß etwa ein Drittel der Oligonukleotide hybridisiert ist.

In Bahn 6 sind die Oligonukleotide A1 und A3 bis A5 und in Bahn 7 die Oligonukleotide A2 bis A5 zusammen hybridisiert. Das Konstrukt mit allen Oligonukleotiden bildet sich und ist jeweils als Bande sichtbar. Da das Oligonukleotid A1 kürzer ist als A2, ist auch das Konstrukt in Bahn 6 kleiner als das in Bahn 7. Dadurch entsteht die unterschiedliche Lage der Banden im Gel. In Bahn 6 ist eine Bande sichtbar, welche durch einzelne nicht hybridisierte Oligonukleotide gebildet wird. Ursache ist wahrscheinlich ein Fehler beim Pipettieren, so daß eines der Oligonukleotide in größerer Menge zugegeben wurde. In Bahn 7 gibt es eine schwach ausgeprägte Bande bei 300 bp. Diese hat die doppelte Größe der DNA wie bei 150 bp. Daraus läßt sich ableiten, daß in dieser Bande zwei verbundene DX-Elemente zusammen laufen.

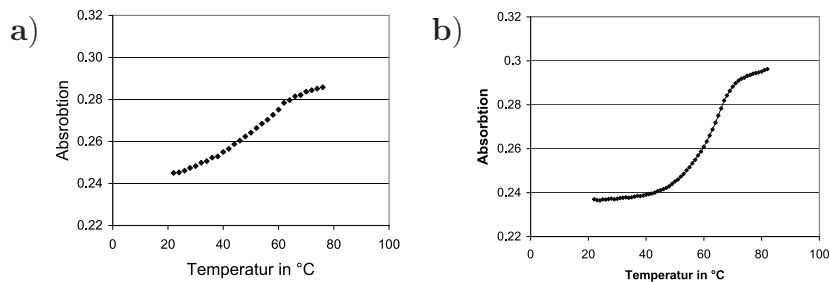


Abbildung 41: Schmelzkurven von DNA-Strukturen. (a) Schmelzkurve der aus den Oligonukleotiden A3 und A4 gebildeten Struktur, welche einen 21 bp langen Doppelstrangabschnitt bildet. Da die Struktur noch ungepaarte Basen enthält, ist die Schmelzkurve abgeflacht. Die Schmelztemperatur beträgt 52°C. (b) Schmelzkurve eines DX-Elementes. Die Schmelztemperatur liegt bei 62°C.

Während bei der Gelelektrophorese die Frage beantwortet wird, ob sich die Bausteine zusammenlagern und bei Raumtemperatur stabil sind, wird bei der UV-Vis-Spektroskopie die Frage beantwortet, bis zu welcher Temperatur die Bausteine stabil sind. In Abbildung 41 ist die Schmelzkurve des längsten, aus zwei Oligonukleotiden gebildeten Doppelstrangabschnittes und des kompletten DX-Elementes aus dem entworfenen Netzwerk dargestellt. Aus der Kurve ist ersichtlich, daß das Schmelzen des Bausteins in einem Schritt geschieht. Die Schmelztemperatur ist mit 62°C höher als die des längsten, durchgehenden Doppelstrangabschnittes. Ein solches Verhalten ist typisch für Bausteine aus DNA-Oligonukleotiden.

3.4.2 Atomkraftmikroskopie in der Flüssigkeit

Bei der Rastersondenmikroskopie (*Scanning Probe Microscopy*, SPM), zu der auch die Atomkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy*, AFM) gehört, wird die Oberfläche einer Probe mit einer Spitze abgerastert. Dabei erfolgt eine punktweise Abtastung einer Oberflächeneigenschaft. Bei der Atomkraftmikroskopie werden die auf die Spitze wirkenden Kräfte genutzt [96].

Die Untersuchungen in dieser Arbeit erfolgten an einem Nanoscop IIIa (Digital Instruments). Es wurde ein *vertical approach* J-Scanner im *Tapping Mode* eingesetzt. Die Abbildungen an Luft wurden mit Spitzen vom Typ RTE SP (Veeco Instruments) aufgenommen. Die Anregungsfrequenz lag zwischen 200 und 400 kHz, die Anregungsamplitude betrug 2 V. Die Abbildungen in der Flüssigkeit wurden

mit Spitzen vom Typ NP-S (Veeco Instruments) aufgenommen. Verwendung fand die kleine, dünne Spitze. Die Anregungsfrequenz lag zwischen 7 und 10 kHz, die Anregungsamplitude bei 0,6 V. Alle AFM-Abbildungen wurden mit der Software WSxM [97] bearbeitet.

Die zur Erzeugung von Abbildungen gängigen Verfahren sind der *Tapping Mode* und der *Contact Mode*. Im *Contact Mode* wird die Spitze während des Abrasterns mit einer konstanten Kraft auf die Probe gedrückt. Es sind atomare Auflösungen möglich. Bei weniger stabilen Proben wie z.B. organischen Proben ist es allerdings möglich, daß durch die wirkenden lateralen Kräfte die Probe verändert oder zerstört wird. In diesem Fall nutzt man den *Tapping Mode*, welcher auch in dieser Arbeit verwendet wird. Hier oszilliert die Spitze über der Oberfläche nahe der Resonanzfrequenz. Die Spitze berührt die Oberfläche dabei zwischendurch leicht, wodurch im Vergleich mit dem *Contact Mode* nur geringe Kräfte auf die Oberfläche wirken. Die Spitze wird mit einer bestimmten Amplitude angeregt. Wenn sich die Spitze der Probenoberfläche annähert, ändert sich die Schwingungsamplitude. Die Höhe der Probe wird nun nachgeregelt, bis eine Soll-Schwingungsamplitude und somit dieselbe Höhe über der Probe wieder erreicht ist. Aus der Position der Spitze läßt sich das Höhenbild rekonstruieren. Man erhält eine dreidimensionale Darstellung der Oberfläche. Der Nachteil des *Tapping Mode* ist die im Vergleich zum *Contact Mode* geringere erreichbare Auflösung von 1 nm.

Die AFM-Abbildungen in dieser Arbeit sind Höhenbilder. Neben diesen gibt es noch Amplitudenbilder, in denen die Änderung der Schwingungsamplitude dargestellt wird, und Phasenbilder, in welchen die Änderung der Phase zwischen Spitzenanregung und Spitzenausgang der Schwingung dargestellt ist. Amplitudenbilder liefern keine Höheninformationen, dafür können feine, regelmäßige Strukturen leichter erkannt werden. Phasenbilder erlauben es, Bereiche mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften zu unterscheiden.

Ein Beispiel für ein hochaufgelöstes Höhenbild einer organischen Probe ist in Abbildung 42 zu sehen. Dieses Bild wurde in der Flüssigkeit aufgenommen. Die abgebildeten bakteriellen Zellhüllproteine bilden regelmäßige Gitter. Das ermöglicht es, die Auflösung aus den Reflexen der Powerspektrums zu ermitteln. Die aus der Abbildung ermittelte Gitterperiodizität beträgt 20 nm. Es ist zu erkennen, daß die Auflösung des Verfahrens bis in den Bereich <4 nm geht.

Wie bei allen hochauflösenden Verfahren ist es auch bei der Atomkraftmikroskopie wichtig, die Auflösungsgrenzen und Abbildungsfehler zu kennen, um die erhal-

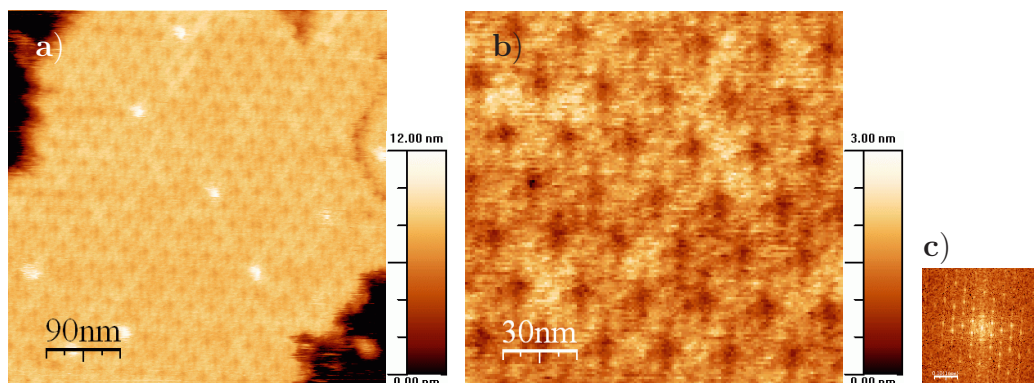


Abbildung 42: Hochauflösende AFM-Abbildungen von rekristallisierten, bakteriellen Zellhüllproteinen von *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 in der Flüssigkeit. (a) Die bakteriellen Zellhüllproteine bilden ein periodisches, hexagonales Gitter aus. Aus der Höhenskalierung bei (a) und (b) ist ablesbar, welche Farbe welcher Höhe zugeordnet ist. (b) Der Ausschnitt aus (a) zeigt Details des Gitters. Die Höhenauflösung liegt bei 0,2 nm. (c) Das Powerspektrum zeigt Reflexe bis zur sechsten Ordnung. Die laterale Auflösung liegt bei 3,8 nm.

tenen Daten richtig zu deuten. Ein limitierender Faktor der Auflösung im AFM ist der Spitzenradius. Der Radius kommerziell erhältlicher Spitzen aus Si oder Si₃N₄ beträgt typischerweise zwischen 5 und 10 nm. Die resultierende Abbildung im AFM ist eine Faltung aus Spitze und Probe. In Abbildung 43 ist die Verbreiterung eines DNA-Doppelstranges mit 2 nm Durchmesser durch eine Spitze mit einem Radius von 5 nm dargestellt. Die Breite der Abbildung wird dabei mehr als verdoppelt.



Abbildung 43: Schematische Darstellung von Abbildungsfehlern im AFM: Verbreiterung des blau dargestellten Objektes durch die Spitze. Die schwarze Kurve zeigt die abgebildete Kurve.

Bei der Betrachtung von Strukturen hat die Atomkraftmikroskopie in der Flüssigkeit gegenüber der an Luft verschiedene Vorteile. An Luft überziehen sich Oberflächen mit einer Schicht adsorbierter Wassermoleküle, wodurch die Auflösung verringert wird. Dieser Film erzeugt außerdem bei einer Berührung durch die Spitze Kapillarkräfte, welche das Wegschwingen der Spitze von der Probe im *Tapping Mode* erschweren. In der Flüssigkeit sind Probe und Spitze vollständig mit Wasser umgeben, wodurch eine höhere Auflösung erreicht werden kann. Ein weiterer Vorteil der Messung in der Flüssigkeit ist die Betrachtung von organischen Proben mit intakter Struktur in ihrer natürlichen Umgebung. In Abbildung 44 ist eine AFM-Aufnahme an Luft mit den gleichen

bakteriellen Zellhüllproteine wie in Abbildung 42 zu sehen. Die Auflösung ist mit rund 20 nm deutlich niedriger. Es ist noch zu erkennen, daß eine hexagonale Struktur vorliegt, Details können jedoch nicht erkannt werden. Die Höhe der Struktur beträgt 3 nm gegenüber 10 nm in der Flüssigkeit. Die Gitterperiodizität läßt sich zu 19 nm ermitteln. Das bedeutet, daß die Struktur der Probe an der Luft verändert ist.

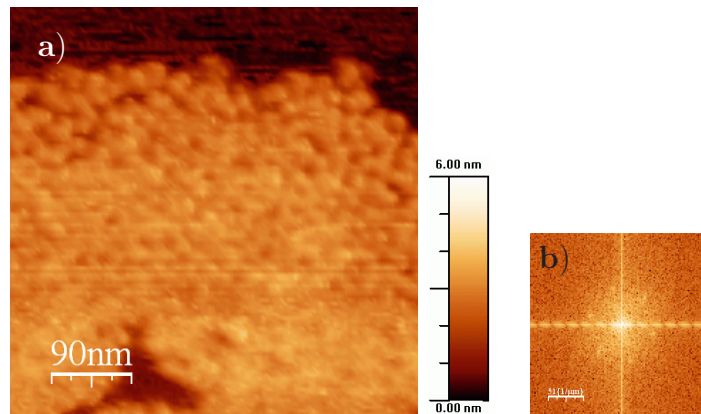


Abbildung 44: AFM-Abbildungen von rekristallisierten, bakteriellen Zellhüllproteinen von *Thermoaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 an Luft. (a) Die bakteriellen Zellhüllproteine bilden ein periodisches, hexagonales Gitter aus. (b) Das Powerspektrum zeigt nur Reflexe der ersten Ordnung. Die laterale Auflösung liegt bei 19 nm.

Als Unterlage für eine DNA-Absorption ist Glimmer geeignet. Dieses Substrat ist atomar glatt, spaltbar und hat eine negativ geladene Oberfläche. Durch die im Puffer enthaltenen zweiwertige Ionen wie z.B. Mg^{2+} wird die Oberfläche umgeladen. An die positiv geladene Oberfläche kann das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA anbinden. Zur Probenherstellung wurden 10 μ l DNA-Lösung auf frisch gespaltem Glimmer gegeben. Die DNA läßt man 5 min absorbieren. Dann wurden weitere 10 μ l Puffer auf die Probe gegeben.

Eine häufiges Problem in der Flüssigkeit ist das Abtragen von DNA von der Oberfläche (Abbildung 45). Kleine Bausteine werden während des Scannens von der Oberfläche leicht abgelöst und können dadurch nur schlecht in der Flüssigkeit betrachtet werden. Eine quantitative Aussage, welcher Anteil an Bausteinen sich zu einem Netzwerk zusammenlagert, ist mit dem AFM dadurch nicht möglich. Bei der Betrachtung von Netzwerken können auch Teile aus einem Netzwerk abgelöst werden. Die wesentliche Maßnahme gegen Abtrag ist eine niedrigere Anregungs-

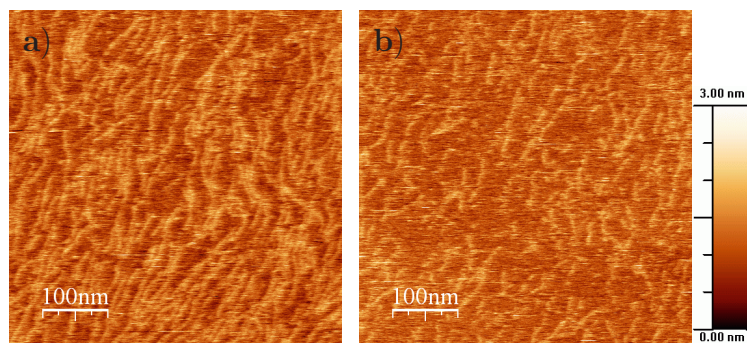


Abbildung 45: AFM-Abbildungen eines eindimensionalen DX-Netzwerkes. Die Bilder wurden direkt nacheinander aufgenommen. In (b) wurde das Netzwerk teilweise abgetragen.

spannung der Spitze. Durch die geringeren Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe wird dabei weniger DNA abgelöst.

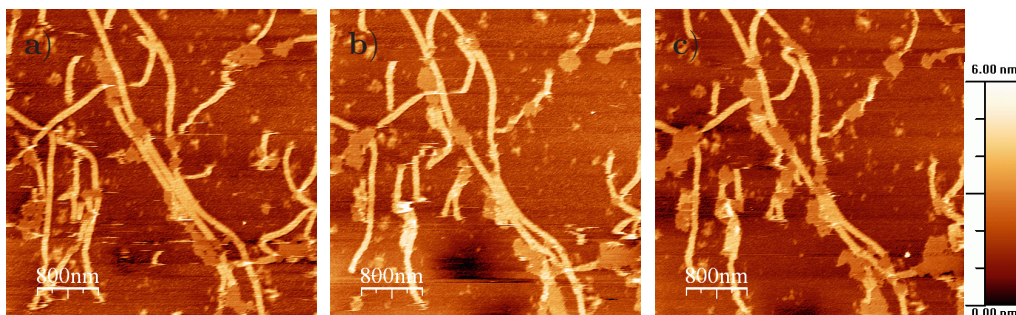


Abbildung 46: AFM-Abbildungen von Röhren aus 4x4-Kacheln. Es wurde dieselbe Stelle mehrmals hintereinander aufgenommen. Die Untersuchung der 4x4-Strukturen erfolgte in Zusammenarbeit mit Hao Yan von der *Arizona state University*, Phoenix, USA.

In Abbildung 46 sind drei direkt nacheinander aufgenommene Abbildungen von Röhren aus 4x4-Kacheln dargestellt. Die Röhren sind durch das Anbinden an den Glimmer flachgedrückt. Es sind verschiedene Veränderungen an den Röhren erkennbar. Eine Möglichkeit der Veränderung ist die Öffnung von Röhren. Durch die Wechselwirkungen der Spitze mit dem Netzwerk wird dieses an einzelnen Stellen gestört und klappt auseinander. Neben dem Abtrag von Röhrenstücken ist an einigen Stellen auch eine Verschiebung oder ein Hinzufügen von Röhrenstücken sichtbar. Diese dynamische Natur der Röhren auf der Glimmer-Oberfläche ist ein Problem beim mehrmaligen Scannen derselben Stelle. In den Abbildungen ist sichtbar, daß das Öffnen von Röhren häufiger auftritt als der Abtrag von Röhrenstücken.

Das ist erklärbar, wenn man die im AFM flachgedrückten Röhren als zwei Schichten auffaßt. Die untere ist an den Glimmer angebunden, während die obere nicht angebunden ist. Sie ist dadurch leichter ablösbar.

4 Netzwerke mit DNA

4.1 Einfache Verzweigungen als Grundelemente für den Aufbau von Netzwerken

Eine grundlegende Herausforderung in der Nanotechnologie ist es, eine kleine Struktur in ein um mehrere Ordnungen größeres Umfeld zu integrieren. Dazu ist es notwendig, die Größenskalen anzupassen, d.h. die kleine Struktur mit Elementen zu versehen, die eine Integration in eine größerskalige Umgebung erlauben. Im folgenden soll dazu eine Verzweigung über die Anbindung von Verlängerungen vergrößert werden. Eine 3-Arm-Verzweigung stellt das einfachste Grundelement dar, welches beim Aufbau von Netzwerken verwendet werden kann. Eine Größenänderung um den Faktor 100 kann erreicht werden, wenn eine Verzweigung, deren Größe ca. 10 nm beträgt, mit einer Verlängerung im μm -Bereich verbunden wird. Eine solche Verzweigung mit einer Größe im μm -Bereich ermöglicht beispielsweise auch eine Beobachtung mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Eine Methode für den Aufbau großer Verzweigungen besteht darin, kleine Verzweigungen als Bausteine für die Anknüpfung von längeren DNA-Doppelsträngen zu verwenden [9]. Die kleinen Verzweigungen dienen als Linkerelement und werden über eine Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden erzeugt. Die zur Verlängerung verwendeten DNA-Doppelstränge werden mit Hilfe verschiedener Methoden der DNA-Manipulation hergestellt. Die Methode zum Aufbau großer Verzweigungen stellt somit eine Kombination aus "klassischen" molekularbiologischen Methoden der DNA-Manipulation und der Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden dar.

Das Prinzip, wie die großen Verzweigungen aufgebaut sind, ist in Abbildung 47 schematisch dargestellt. Die dazu verwendeten Bausteine sind Linkerelemente und die Verlängerung. Die Verbindung dieser erfolgt über eine Ligation der *sticky ends*. Durch Variation der *sticky ends* des Linkerelementes lassen sich wie in Abbildung 47 (d) und (e) mehrere Linker definiert zusammenligieren und verlängern. Dadurch ist es möglich, die Linkerelemente wie in einem Baukastensystem zu verwenden [98]. Mit diesem Prinzip ist der Zusammenbau von Strukturen aus noch mehr Linkerelementen denkbar. Im Unterschied zu den in Kapitel 2.5.3 vorgestellten DNA-Netzwerken wird bei den Verzweigungen der Zusammenhalt der Bausteine durch eine Ligation erreicht.

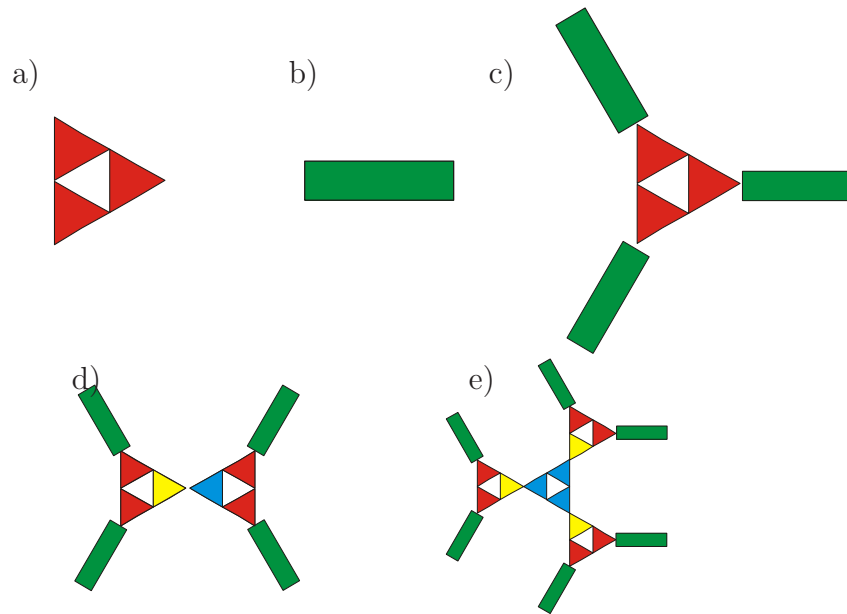


Abbildung 47: Schematische Darstellung zum Aufbau von großen DNA-Verzweigungen. (a) Symbolhafte Darstellung des Linkerelementes aus Abbildung 49. Die drei Arme mit den *sticky ends* sind durch die drei roten Dreiecke symbolisiert. Die Farbe entspricht einer definierten Basensequenz eines *sticky end*. (b) Die Verlängerung besitzt ein *sticky end*, welches zu dem des Linkerelementes komplementär ist. Diese komplementäre Sequenz ist durch die grüne Farbe angegeben. (c) Durch Ligation eines Linkerelementes mit drei Verlängerungen entsteht eine 3-Arm-Verzweigung. (d) Bei zwei Linkerelementen wurde je ein *sticky end* (blau und gelb) so abgeändert, daß diese untereinander komplementär sind. Diese beiden Linkerelemente lassen sich zusammen ligieren. Es lassen sich insgesamt vier Verlängerungen an das Konstrukt ligieren, so daß eine 4-Arm-Verzweigung entsteht. (e) Mit vier untereinander ligierbaren Linkerelementen lassen sich in Fortsetzung der Prinzipien der Linkerhybridisierung und Ligation 6-Arm-Verzweigungen aufbauen.

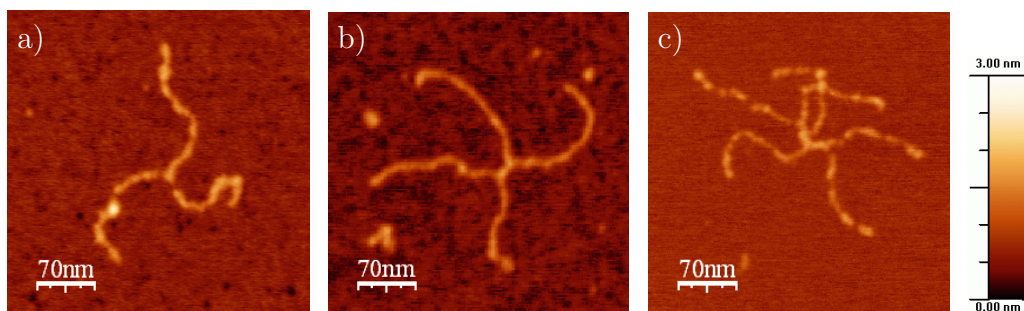


Abbildung 48: AFM-Abbildungen einer (a) 3-, (b) 4-, und (c) 6-Arm-Verzweigung aus DNA. Die Verlängerungen sind ca. 500 bp lang.

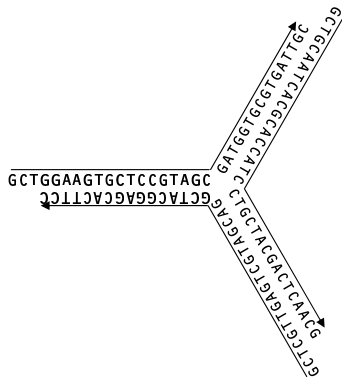


Abbildung 49: Schematische Darstellung einer als Linkerelement dienenden DNA-Verzweigung. Das Linkerelement ist ca. 10 nm groß.

In Abbildung 49 ist das in dieser Arbeit verwendete Linkerelement mit der Basensequenz dargestellt. Dieses wird über die Hybridisierung von drei 35 bp langen DNA-Oligonukleotiden hergestellt. Die Basensequenz dieses Linkerelementes ist optimiert, so daß die Oligonukleotide bei der Hybridisierung nur einen sehr geringen Anteil an Fehlpaarungen bilden [91]. Die Arme eines Linkerelementes bestehen aus einem 16 bp langen Doppelstrangabschnitt und einem drei Basen langen 5'-*sticky end* (Abbildung 49). Die Sequenz des *sticky ends* ist GCT. Die Größe des Linkerelementes beträgt etwa 10 nm.

Die zum Aufbau der in Abbildung 48 gezeigten Verzweigungen verwendeten Verlängerungen sind rund 500 bp lang, was ca. 170 nm entspricht. Damit sie im Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden, wird jedoch eine Verlängerung im μm -Bereich benötigt.

In dieser Arbeit wurden Verzweigungen mit 1 kbp (ca. 340 nm), 2 kbp (ca. 680 nm) und 7 kbp (ca. 2,4 μm) langen Verlängerungen hergestellt. Zur Herstellung der Verlängerungen wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen angewandt. Gemeinsam für alle Verlängerungen ist die Herstellung eines PCR-Fragmentes, welches mit dem *HindIII*-Enzym zur Erzeugung eines *sticky end* geschnitten und abschließend mit einer Base aufgefüllt wird. Unterschiedlich sind die Länge der PCR-Fragmente und die Stelle, an welcher die PCR-Fragmente geschnitten werden.

Zur Herstellung der 1 kbp- und 2 kbp-Verlängerung wird das jeweils verwendete PCR-Fragment in der Mitte zerschnitten. Die PCR-Fragmente müssen deshalb die doppelte Länge haben wie die daraus entstehenden Verlängerungen. Bei der Herstellung der 1 kbp-Verlängerung wird ein 2 kbp PCR-Fragment, bei der 2 kbp-Verlängerung ein 4 kbp PCR-Fragment verwendet. Aus einem PCR-Fragment werden zwei Verlängerungen erzeugt.

Zur Herstellung der 7 kbp-Verlängerung wird ein kurzes Stück vom verwendeten PCR-Fragment abgeschnitten. Das PCR-Fragment hat daher etwa dieselbe Länge wie die Verlängerung.

Bei der 2 kbp PCR wird aus λ -DNA der Bereich von 26516 bis 28502 bp vervielfältigt. Die Fragmentlänge beträgt 1987 bp. Eine Schnittstelle des *HindIII* En-

zyms auf der λ -DNA liegt bei 27479 bp. Nach dem Schneiden des PCR-Fragmentes liegen zwei Stücke mit Längen von 964 bp und 1019 bp mit je einem 4 Basen *sticky end* vor.

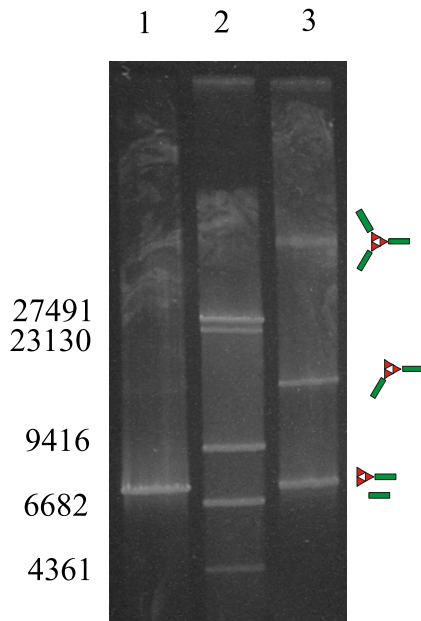


Abbildung 50: Gelbild zu den 7 kbp-Verzweigungen. Bahn 1: PCR-Produkt. Bahn 2: Die mit *HindIII* geschnittene λ -DNA dient als Leiter. Die Länge der einzelnen Fragmente ist links neben dem Bild in Basenpaaren angegeben. Bahn 3: Nach der Ligation sind Produkte aus einer, zwei und drei Verlängerungen vorhanden. Sie sind rechts neben den jeweiligen Banden schematisch dargestellt.

Bei der 4 kbp PCR wird aus λ -DNA der Bereich von 21197 bis 25133 bp vervielfältigt. Es entsteht ein 3937 bp langes Fragment. Eine *HindIII* Schnittstelle der λ -DNA liegt bei 23130 bp. Das PCR-Fragment wird in zwei 1934 bp und 1999 bp lange Stücke, welche je ein 4 Basen *sticky end* besitzen, zerschnitten.

Je länger die mit einer PCR zu vervielfältigenden DNA-Fragmente sind, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit der Vervielfältigung von zusätzlichen, nicht gewünschten Abschnitten. Um zur Herstellung der 7 kbp-Verlängerung mit einem möglichst kurzem PCR-Fragment auszukommen, wird eine veränderte Methode angewandt. Das PCR-Fragment ist so beschaffen, daß die *HindIII*-Schnittstelle am Ende liegt. Zum Erzeugen des *sticky end* wird somit nur ein kurzes Stück abgeschnitten. Das hat gegenüber dem Durchschneiden in der Mitte den Vorteil, daß die Länge des vervielfältigten PCR-Fragmentes etwa der Länge der Verlängerung entspricht. Bei der 7 kbp PCR wird aus λ -DNA der Bereich von 27464 bis 34700 bp vervielfältigt. Es wird ein 7237 bp langes Fragment erzeugt. Eine *HindIII* Schnittstelle der λ -DNA liegt bei 27479 bp. Beim *HindIII*-Schneiden

wird ein 16 bp langes Stück vom PCR-Fragment abgeschnitten. Dieses wird bei einem anschließenden Filtern abgetrennt. Die DNA zum Aufbau der 7 kbp-Verlängerung ist 7217 bp lang und besitzt ein 4 Basen *sticky end*.

Beim *HindIII*-Schneiden entsteht ein 5'-*sticky end* mit der Sequenz AGCT. Nach dem *HindIII*-Schneiden wird eine Base des *sticky end* mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Dadurch wird ein *sticky end* mit der

Sequenz AGC erzeugt, welches zu den *sticky ends* des Linkerelementes komplementär ist.

In Abbildung 50 ist ein Gelbild mit dem 7 kbp-PCR-Fragment und den in der Ligation entstandenen Produkten zu sehen. Das PCR-Fragment in Bahn 1 befindet sich bei 7000 bp und hat somit die erwartete Länge. Andere Fragmente sind nicht sichtbar, d.h. die Vervielfältigung des Fragmentes findet hochspezifisch statt. Bei den nach der Ligation vorhandenen Fragmenten in Bahn 3 befindet sich eine Bande an derselben Stelle. In dieser Bande können Verlängerungen mit und ohne Linkerelement sowie ungeschnittene PCR-Fragmente vorhanden sein. Der relative Unterschied zwischen den drei DNA-Fragmenten ist so gering, daß sie in diesem Gel nicht aufgetrennt werden.

Eine weitere Bande in Bahn 3 befindet sich bei 14000 bp. Diese kann durch zwei verschiedene DNA-Fragmente gebildet werden. Zum einen können Verlängerungen über ein Linkerelement verbunden sein. Zum anderen bleibt bei einem unvollständigen Auffüllen mit dem Klenow-Fragment ein Teil der *sticky ends* selbstkomplementär. Dann können zwei DNA-Fragmente ohne Linker zusammenligieren.

Die dritte Bande wird durch vollständig zusammenligierte Verzweigungen gebildet. Ein einfaches Aufsummieren ergibt, daß die Verzweigung aus etwa 21 kbp besteht. Da es sich hier um eine nichtlineare Struktur handelt, läuft diese deutlich langsamer durch das Gel als eine lineare Struktur gleicher Größe. Die Bande enthält nur vollständig ligierte Verzweigungen. Durch Ausschneiden dieser Bande aus dem Gel und anschließendes Herauslösen der DNA aus dem Gelstück (Gelextraktion) werden die Verzweigungen in reiner Form gewonnen. Auf die selbe Art und Weise lassen sich auch die Verzweigungen mit 2 kbp- und 4 kbp-Verlängerungen von den unvollständig ligierten DNA-Konstrukten abtrennen.

Der bei der Ligation gebildete Anteil an Verzweigungen wird von der Güte der vorhergehenden Arbeitsschritte beeinflusst. Durch unvollständiges *HindIII*-Schneiden oder Auffüllen mit dem Klenow-Fragment sind lange DNA-Stücke vorhanden, welche keine Verzweigungen bilden. Wie hoch der Anteil solcher DNA-Stücke ist, läßt sich nicht ohne weiteres feststellen, weshalb bei der Bestimmung der DNA-Mengen solche Stücke als Verlängerung mit gemessen werden. Dadurch ändert sich zusätzlich das Verhältnis von Linkerelementen zu tatsächlich nutzbaren Verlängerungen. Sind zu wenig Verzweigungen vorhanden, bilden sich vermehrt Strukturen mit ein oder zwei Verlängerungen an einem Linkerelement und weniger vollständige Verzweigungen. Dies kann korrigiert werden, indem man den Anteil an

Verlängerungen im Ligationsansatz erhöht.

AFM-Abbildungen von in der Arbeit hergestellten Verzweigungen mit 1 kbp (ca. 340 nm), 2 kbp (ca. 680 nm) und 7 kbp (ca. 2,4 μm) langen Verlängerungen sind in den Abbildungen 51, 52 und 53 zu sehen. Die AFM-Abbildungen wurden an Luft aufgenommen. In den Abbildungen ist sichtbar, daß einige Arme der Verzweigungen stellenweise verdickt sind. An diesen Stellen haben sich Sekundärstrukturen aus DNA gebildet. Eine denkbare Ursache dafür sind Schäden an der DNA, welche bei der Extraktion aus dem Gel verursacht werden. In Abbildung 53 sind neben den Verzweigungen auch kürzere DNA-Stücke zu sehen. Diese sind Bruchstücke von Verzweigungen, welche bei der Extraktion aus dem Gel entstehen. Größere Verzweigungen werden während der Extraktion aus dem Gel leichter zerstört.

Zur Bestimmung der Länge der DNA wurde der Verlauf der DNA mit Punkten markiert, welche mit geraden Linien verbunden wurden. Die Länge dieser Linien ist die gemessene Länge der DNA. Die Länge der Arme der Verzweigungen ohne Sekundärstrukturen in Abbildung 51 wurde mit 330 bis 340 nm gemessen. Das entspricht dem erwarteten Wert. An Armen, welche ein Sekundärstruktur aufweisen, wurden deutlich geringere Längen bis hinab zu 230 nm gemessen. Die Sekundärstrukturen sind in Abbildung 51 mit Pfeilen markiert.

Bei den Verzweigungen mit 2 kbp-Verlängerungen in Abbildung 52 besitzen fast alle Arme Sekundärstrukturen. Der längste Arm wurde zu 560 nm gemessen, was deutlich unter dem erwarteten Wert von 680 nm liegt. Da auch Arme ohne Sekundärstrukturen deutlich kürzer als der erwartete Wert sind, ist anzunehmen, daß Stücke der Verlängerung während der Geextraktion abgebrochen sind.

Bei den 7 kbp langen Armen der Verzweigungen in Abbildung 53 wurden Längen im Bereich von 1,9 bis 2,1 μm gemessen. Das liegt unter dem erwarteten Wert von 2,4 μm . Da keine Sekundärstrukturen feststellbar sind, können diese als Ursache für eine Verkürzung ausgeschlossen werden. Auch ein Abbrechen der Verlängerung während der Geextraktion an immer derselben Stelle ist unwahrscheinlich. Die geringeren gemessenen Längen lassen sich über die geringere Auflösung der Abbildungen erklären. Das AFM erzeugt Abbildungen mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixel. Bei 700 nm Abbildungsgröße beträgt die Auflösung 1,4 nm/Pixel (1 kbp-Verlängerung), bei 1 μm Abbildungsgröße 1,9 nm/Pixel (2 kbp-Verlängerung) und bei 2 μm Abbildungsgröße nur noch 3,9 nm/Pixel (7 kbp-Verlängerung). Geringe Änderungen im Verlauf der DNA, wie z.B. Krümmungen mit niedrigem Radius, werden bei der niedrigeren Auflösung nicht mit abgebildet. Diese geringen Ände-

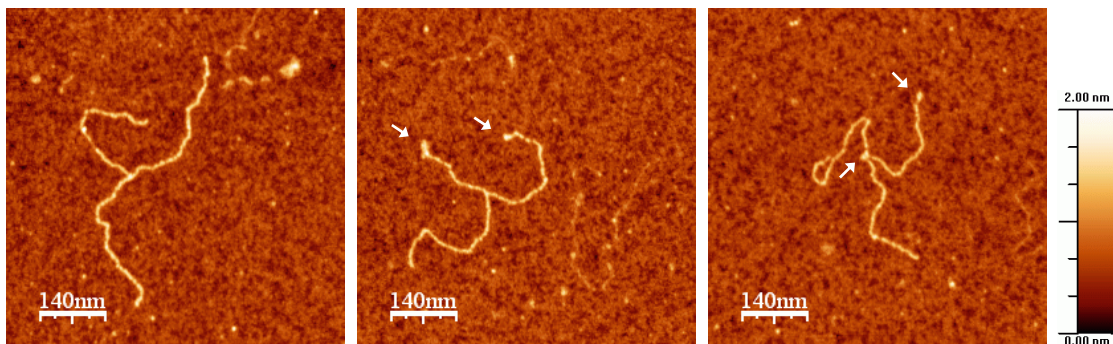


Abbildung 51: AFM-Abbildungen von 3-Arm-Verzweigungen aus DNA. Die Verlängerungen sind rund 1 kbp lang. Die Pfeile kennzeichnen Sekundärstrukturen an der DNA.

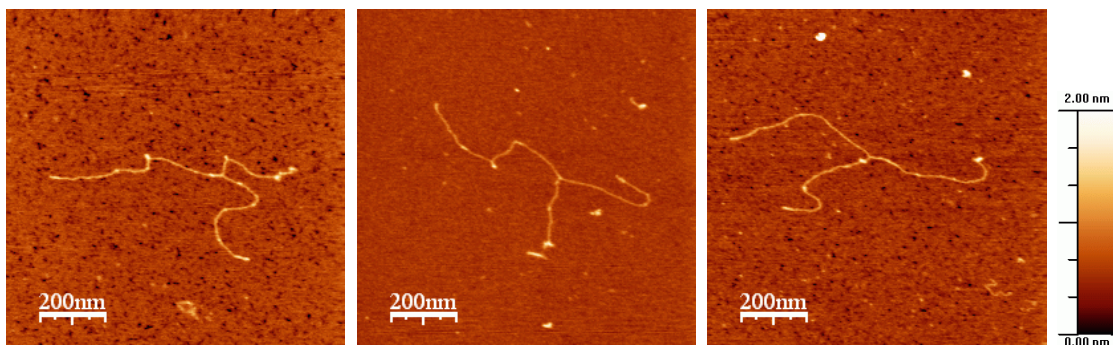


Abbildung 52: AFM-Abbildungen von 3-Arm-Verzweigungen aus DNA. Die Verlängerungen sind rund 2 kbp lang.

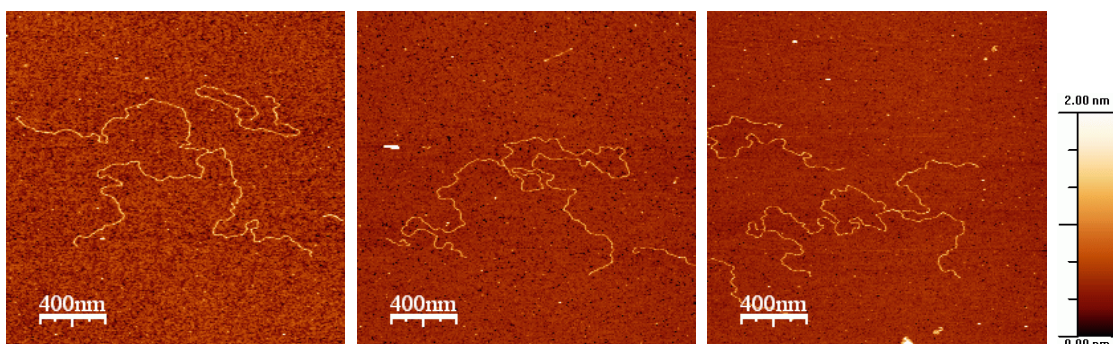


Abbildung 53: AFM-Abbildungen von 3-Arm-Verzweigungen aus DNA. Die Verlängerungen sind rund 7 kbp lang.

rungen werden bei der Längenmessung als "gerade" gemessen. So werden bei einer Abbildung von $2\ \mu\text{m}$ mal $2\ \mu\text{m}$ nur Änderungen bei der Längenmessung berücksichtigt, welche größer als $3,9\ \text{nm}$ sind. Mit steigender Bildgröße sinkt daher auch die gemessene Länge der DNA im Verhältnis zur tatsächlichen Länge. Dadurch werden die niedrigeren Meßwerte bei den größeren Verzweigungen erklärbar.

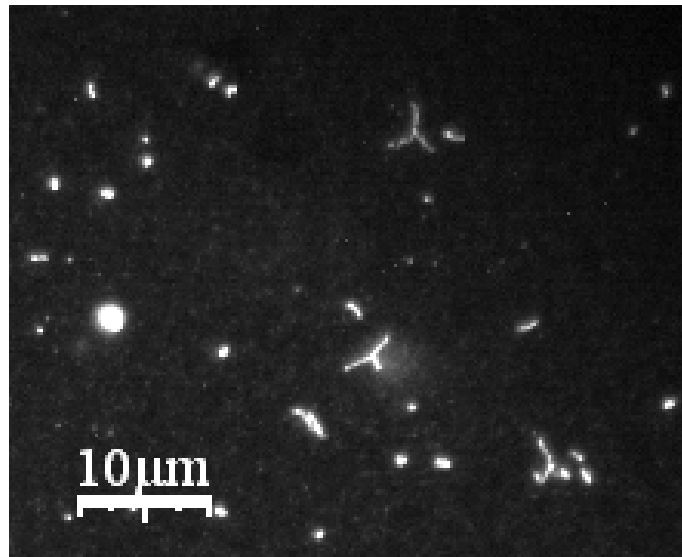


Abbildung 54: Fluoreszenzbild mit aus dem Gel eluierten 3-Arm-Verzweigungen. Die Verlängerungen der 3-Arm-Verzweigungen sind rund $7\ \text{kbp}$ lang. Es sind drei Verzweigungen erkennbar. Die Abbildung wurde mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einem $100\times 1,3$ Ölimmersionsobjektiv aufgenommen.

Die 3-Arm-Verzweigungen mit den $7\ \text{kbp}$ -Verlängerungen sind auch im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. In Abbildung 54 sind drei Verzweigungen deutlich zu erkennen. Bei der Probenherstellung wird die DNA auf der Oberfläche elektrostatisch angebunden. Nur wenn die Arme der Verzweigungen in verschiedene Richtungen gestreckt werden, ist erkennbar ob eine Verzweigung vorliegt. An den Verzweigungen sind teilweise Armlängen bis $2,3\ \mu\text{m}$ meßbar. Das bedeutet, daß diese Arme fast vollständig gestreckt sind. An der 3-Arm-Verzweigung unten rechts in Abbildung 54 ist sichtbar, daß einzelne Arme auch teilweise verknäuel sein können.

Werden zwei Arme in dieselbe Richtung gestreckt, kann keine Aussage getroffen werden, ob lineare DNA oder eine Verzweigung vorliegt. Bei den im Fluoreszenzmikroskop sichtbaren Verzweigungen liegen die Winkel zwischen den Armen daher alle im Bereich von 120° . Begünstigend für die Ausbildung gleicher Winkel zwischen

den Armen wirkt vermutlich die elektrostatische Abstoßung der Arme untereinander. Nicht gestreckte DNA liegt als Knäuel vor und erscheint als leuchtender Punkt. Bei diesen Punkten kann es sich auch um Bruchstücke von Verzweigungen handeln.

Die durch die 7 kbp-Verlängerungen mögliche Beobachtbarkeit im Fluoreszenzmikroskop erlaubt es, in Zukunft in situ Experimente zur spezifischen Anbindung der DNA-Enden an Goldkontakten [9] auch mit DNA-Verzweigungen durchzuführen. Als darauf aufbauende Anwendung ist eine gezielte Platzierung von DNA-Verzweigungen bzw. Netzwerken z.B. zwischen Goldkontakten denkbar.

4.2 Ein- und zweidimensionale Netzwerke aus DX-Elementen

In Kapitel 3 wurde schematisch gezeigt, wie sich durch Vertauschen von *sticky ends* aus einem eindimensionalen Netzwerk aus DX-Elementen ein zweidimensionales Netzwerk ableiten läßt. Der in Abbildung 32 auf Seite 44 dargestellte Baustein erzeugt dahingehend ein eindimensionales Netzwerk. Durch Vertauschen der durch die Oligonukleotide A1 und A4 gebildeten *sticky ends* an einer Seite des DX-Elementes wird ein Baustein erzeugt, welcher zu einem zweidimensionalen Netzwerk assembliert. Diese Änderung ist in Abbildung 55 zusammen mit der daraus resultierenden Zusammenlagerung der Bausteine schematisch dargestellt.

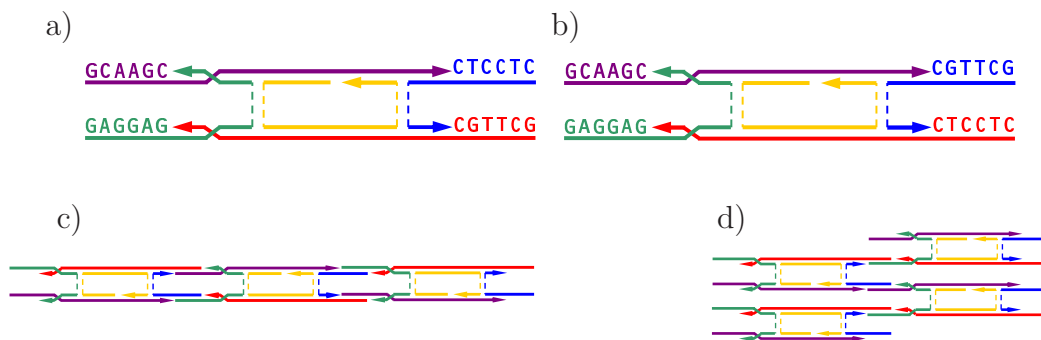


Abbildung 55: Schematische Darstellung der DX-Elemente mit den Sequenzen der *sticky ends*. Die sich überkreuzenden Oligonukleotide symbolisieren die halbe Windung der insgesamt zwei-einhalb Windungen zwischen den Strangaustauschpunkten benachbarter DX-Elemente. Dadurch lagern sich die DX-Elemente um 180° verdreht zusammen. (a) Anordnung der *sticky ends* für ein eindimensionales Netzwerk. (b) Anordnung für ein zweidimensionales Netzwerk. Die *sticky ends* des blau und des rot dargestellten Oligonukleotides sind vertauscht. Die Assemblierung der DX-Elemente erfolgt zu einem (c) ein- bzw. (d) zweidimensionalen Netzwerk.

In Abbildung 56 sind AFM-Aufnahmen des linearen DX-Netzwerkes zu sehen. Es sind bis zu 250 nm lange Strukturen zu sehen. Das entspricht einer Kette aus 17 zusammenhängenden DX-Elementen. Die in Abbildung 56a verwendete Probe wurde vor der Adsorption an den Glimmer auf ein Drittel der ursprünglichen DNA-Konzentration verdünnt. Die Oberfläche ist weniger dicht mit DNA belegt als in Abbildung 56b. Die Abbildung 56b zeigt eine mit der ursprünglichen DNA-Konzentration hergestellte Probe. Die DX-Ketten sind so zusammengelagert, daß geordnete Bereiche entstehen. Die geordneten Bereiche sind bis 150 nm x 50 nm groß. Es liegen teilweise mehr als 15 DX-Ketten geordnet nebeneinander. In den geordneten Bereichen weisen die DX-Ketten eine geringere Biegung auf.

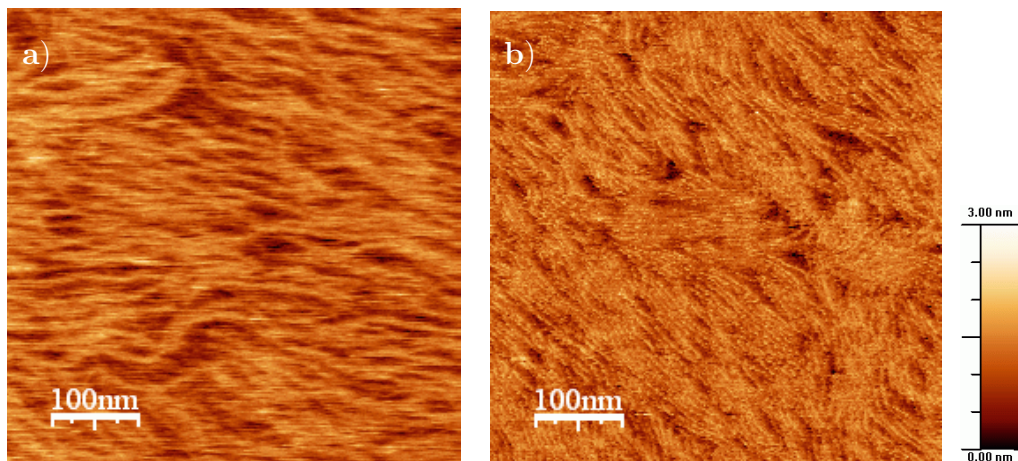


Abbildung 56: AFM-Abbildungen eines eindimensionalen DNA-Netzwerkes. (a) Bei niedriger DNA-Konzentration liegen die DX-Ketten ungeordnet auf dem Glimmer. (b) Bei hoher DNA-Konzentration liegen die DX-Ketten dicht nebeneinander und bilden geordnete Bereiche.

Die Zeit, in der sich die DX-Ketten während der Adsorption an den Glimmer ablagern können, beträgt fünf Minuten. Es ist anzunehmen, daß diese Zeit nicht ausreicht, um eine Ordnung der Ketten auf der Oberfläche zu erzeugen. Außerdem müßten dann auch bei der geringeren DNA-Konzentration geordnete Bereiche zu finden sein. Daher muß schon in der Lösung eine Ordnung vorhanden sein. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß es in der Lösung bei höheren DNA-Konzentrationen Wechselwirkungen der gebildeten Strukturen untereinander gibt. Es ist denkbar, daß ähnlich wie bei der Adsorption der DNA an Glimmer eine Zusammenlagerung der DX-Ketten untereinander erfolgt. DNA-Doppelstränge mit negativ geladenem Phosphatrückgrat können sich aneinanderlagern, wenn die negative Ladung durch

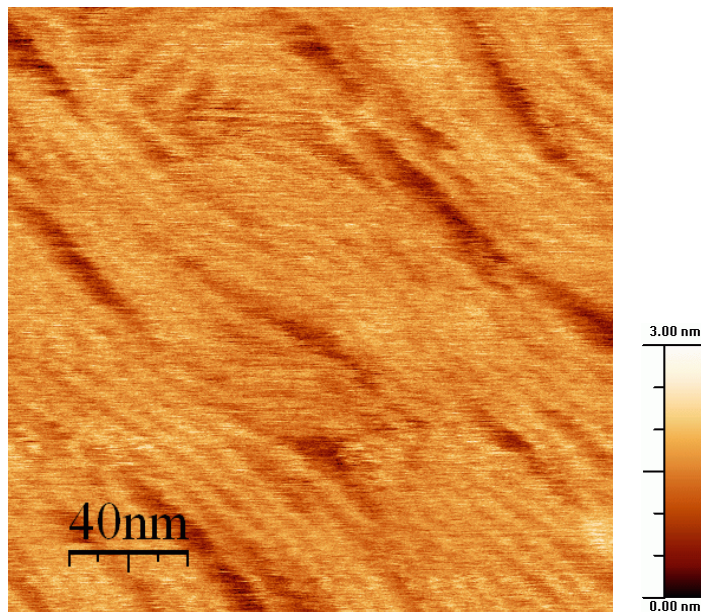


Abbildung 57: AFM-Abbildung eines eindimensionalen DNA-Netzwerkes.

Mg^{2+} -Ionen in der Lösung kompensiert wird. Die über die Mg^{2+} -Ionen gekoppelten DX-Ketten können dann eine parallele Anordnung einnehmen und in der Lösung kristalline Bereiche bilden. In einem solchen Bereich stabilisieren sich die DX-Ketten gegenseitig und sind dadurch weniger gebogen. Die in der Lösung vorliegenden, dreidimensionalen Strukturen werden bei der Adsorption an der Oberfläche zu einer zweidimensionalen Struktur ausgebreitet. Die Abbildung 57 zeigt geordnete Strukturen aus DX-Ketten in hoher Auflösung. Aus der Abbildung kann ermittelt werden, daß der Abstand der Mittelpunkte zweier DX-Ketten in den geordneten Strukturen 8 nm beträgt. Das bedeutet, daß die 4 nm breiten DX-Ketten nicht direkt nebeneinander liegen, sondern einen Abstand von 4 nm haben. Durch die Spitzenverbreiterung entsteht der Eindruck, die DX-Ketten würden direkt nebeneinander liegen.

In Abbildung 58 sind die DX-Elemente zu einem zweidimensionalen Netzwerk angeordnet. Durch die versetzte Anordnung sind die einzelnen DX-Elemente des zweidimensionalen Netzwerkes unterscheidbar. Die Länge der DX-Elemente in der AFM-Abbildung beträgt 15 nm, die Breite 5 nm. Der Vergleich mit der theoretischen Länge und Breite von 14 nm bzw. 4 nm zeigt eine gute Übereinstimmung. Die geordneten Bereiche sind bis zu 5 x 8 DX-Elemente groß. An diesem Beispiel zeigt

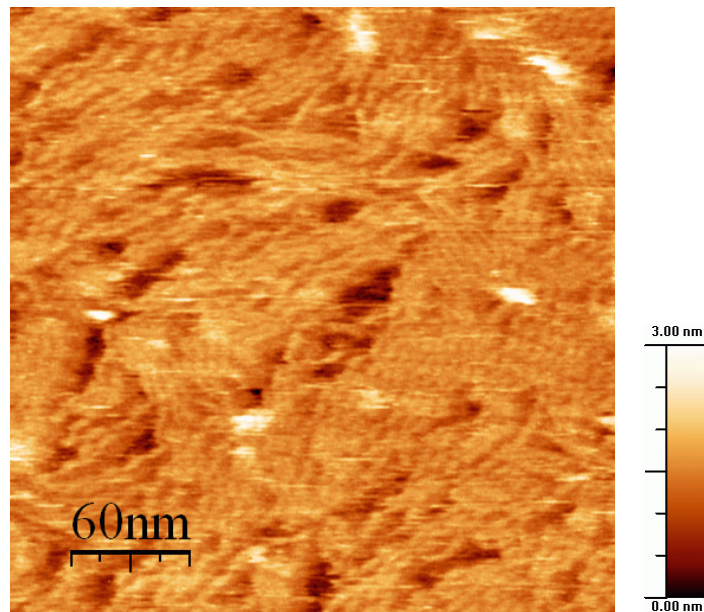


Abbildung 58: AFM-Abbildung eines zweidimensionalen DNA-Netzwerkes.

sich die große Vielfalt, mit der DNA Netzwerke aufgebaut werden können. Schon kleine Änderungen wie das Vertauschen zweier *sticky ends* an einem Baustein kann zu völlig anderen Netzwerken führen.

4.3 Gitter und Röhren aus 4x4-Kacheln

4x4-Kacheln können sich, je nach Art der Kacheln, zu Gittern oder Röhren zusammenlagern [15]. Untersuchungen, welche in Zusammenarbeit mit Hao Yan von der *Arizona State University*, Phoenix, USA, an einer 4x4-Kachel durchgeführt wurden, zeigen, daß sich die Zusammenlagerung auch über die Hybridisierungsbedingungen steuern läßt. Abbildung 59 zeigt eine schematische Darstellung der in den Experimenten verwendeten 4x4-Kachel. Die Assemblierung zu einem Netzwerk erfolgt über die Hybridisierung der *sticky ends* der Oligonukleotide VerbN mit VerbS und VerbO mit VerbW. Zwischen den Strangaustauschpunkten benachbarter Kacheln liegen jeweils 2,5 Windungen. Dadurch ist die jeweils nächste Kachel um 180° gedreht.

Bei einer Hybridisierung in 16 Stunden bilden sich Röhren. In Abbildung 60a sind solche Röhren zu sehen. Die Röhren weisen Breiten von 100 bis 150 nm auf.

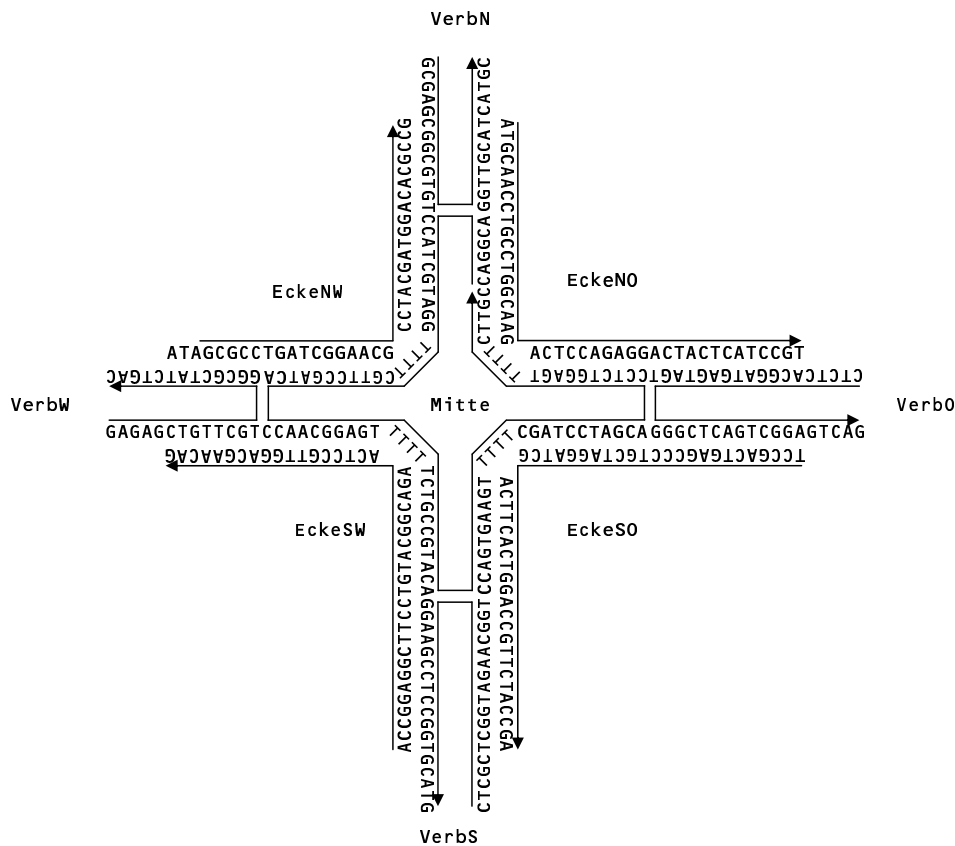


Abbildung 59: Aufbau der 4x4-Kachel mit Basenbelegung. Die Bezeichnung der Oligonukleotide orientiert sich an der Lage im Baustein. Neben dem mittleren Oligonukleotid bildet ein Oligonukleotid entweder eine Ecke im Baustein oder eine Verbindung zum nächsten Baustein. Die Seiten des Kreuzes werden nach den vier Himmelsrichtungen unterschieden und sind mit dem Anfangsbuchstaben im Oligonukleotidnamen enthalten.

Während der Scannens kommt es zu dem in Kapitel 3 beschriebenem Öffnen von Röhren. In Abbildung 60b wurde ein kleinerer Bereich gescannt. Es ist das quadratische Gitter erkennbar, welches durch die 4x4-Kacheln gebildet wird. Ein großer Teil der Röhren hat sich geöffnet. Die geschlossenen Röhren sind 3,5 nm hoch. Nach der Öffnung sind die Strukturen 2 nm hoch. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß die Röhren auf der Unterlage flachgedrückt sind und aus zwei Schichten des Gitters bestehen. Die aus der Öffnung der Röhren hervorgegangenen, zweidimensionalen Gitter weisen als Gitterbaufehler Löcher, Versetzungen und Gittergrenzen auf. Es ist anzunehmen, daß die Gittergrenzen durch schräge Zusammenlagerung zweier Gitter entstanden sind. Fehlerfreie Bereiche sind bis zu einer Größe von etwa 10 x 10 Kacheln zu finden.

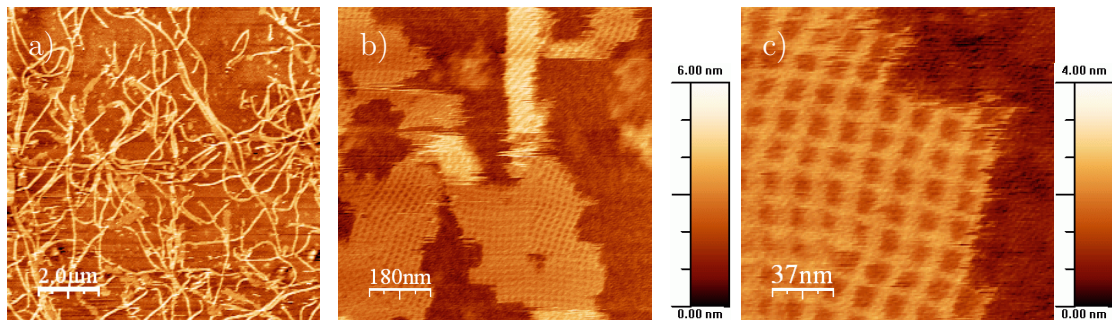


Abbildung 60: AFM-Abbildungen von Röhren aus 4x4-Kacheln. (a) Übersichtsbild. (b) Beim Scannen von kleineren Bildausschnitten kommt es zum verstärkten Öffnen von Röhren. (c) Hochauflöste Abbildung der quadratischen Gitterstruktur. Die Höhenskalierung beträgt bei (a) und (b) 6 nm sowie bei (c) 4 nm.

In Abbildung 60c ist das aus den 4x4-Kacheln gebildete Gitter in höherer Auflösung zu sehen. Der Abstand der Mittelpunkte von zwei nebeneinander liegenden 4x4-Kacheln im Netzwerk ist über das Design festgelegt. Zwei Mittelpunkte sind durch Doppelstrangabschnitte mit insgesamt 47 Basenpaaren sowie zwei DNA-Durchmesser voneinander getrennt. Mit einem Basenabstand von 0,34 nm und einem Helixdurchmesser von 2 nm ergibt sich rechnerisch eine Gitterkonstante von 20 nm. Diese liegt in guter Übereinstimmung mit dem in Abbildung 60c gemessenem Wert von 19 nm.

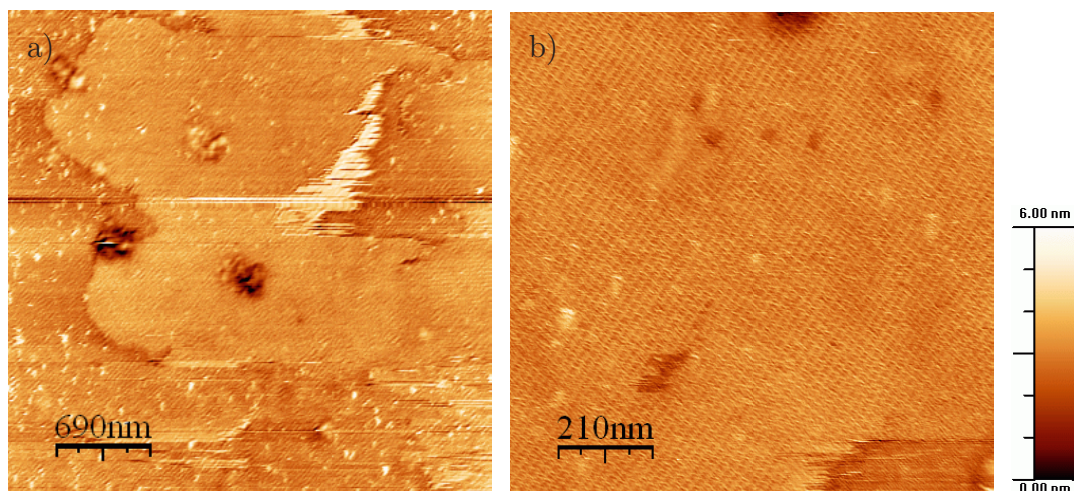


Abbildung 61: AFM-Abbildungen von Gittern aus 4x4-Kacheln (a) Übersichtsbild. (b) Regelmäßige Anordnung zu einem quadratischem Gitter. Die Höhenskalierung beträgt 6 nm.

Bei langer Lagerung bilden sich die im Abbildung 61a abgebildeten, zweidimensionalen Netzwerke. Die verwendete Probe wurde vier Wochen bei 4°C gelagert. Es ist anzunehmen, daß sich während dieser Zeit die Röhren in zweidimensionale Gitter umgelagert haben. Möglich wird dies, weil die 4x4-Kacheln durch je zwei nur 5 bp lange *sticky ends* verbunden sind. Diese können auch bei niedrigen Temperaturen auseinander gehen. Die Gitter können Größen von mehr als 1 μm x 2.5 μm (130 Elemente langes und 50 Elemente breites Gitter) erreichen. In Abbildung 61b ist ein Ausschnitt eines solchen Gitters zu sehen. Das Gitter weist, im Vergleich zu den aus der Öffnung von Röhren hervorgegangenen Gittern, viel weniger Gitterbaufehler auf.

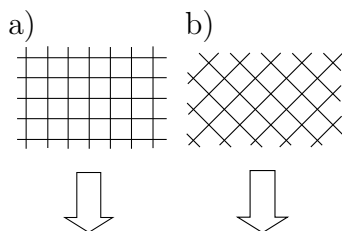


Abbildung 62: Schematische Darstellung der Lage von 4x4-Kacheln in unterschiedlichen Richtungen in Röhren: (a) 0°, (b) 45°. Der Pfeil zeigt die Richtung der Röhre, welche gleichzeitig Wachstumsrichtung ist.

Durch Änderung der Hybridisierungsbedingungen kann man verschiedene Strukturen herstellen. Die entstandenen Strukturen lassen sich mit den "klassischen" Modellen erklären. Eine Erklärung der Unterschiede läßt sich über das Keimwachstum ableiten. Während der Hybridisierung bilden sich zuerst die Kacheln, welche sich dann zu einem Gitter zusammenlagern. Bei den anfangs relativ hohen Temperaturen ist die Biegesteifigkeit niedrig, und die Gitter können stark schwingen. Ab einer bestimmten Größe können sich die Gitter so weit zusammenrollen, daß sich die gegenüberliegenden Seiten berühren. Verbinden sich die Seiten, entsteht ein Keim für eine Röhre. Vergrößert sich das Gitter, steigt die Wahrscheinlichkeit für die Bildung eines Keimes für eine Röhre stark

an. Die Durchmesser der sich aus den Keimen bildenden Röhren liegen daher in einem begrenztem Bereich, sind aber nicht gleich. An der Wachstumsfläche eines Keimes ist, außer bei einem geraden Zusammenrollen wie in Abbildung 62a, immer ein Platz vorhanden, an dem eine Kachel mit zwei Seiten an dem Keim hybridisieren kann. Diese Position ist, gegenüber der einer Hybridisierung mit nur einer Seite, bevorzugt. Solche Keime für Röhren wachsen dadurch bevorzugt. Ein Optimum für das Wachstum befindet sich bei einem Einbau der 4x4-Kacheln in einem 45°-Winkel, bezogen auf die Wachstumsrichtung (Abbildung 62b). Dann ist an allen Plätzen eine Anlagerung mit zwei Seiten möglich. Der noch geschlossene Teil der Röhre in Abbildung 60b weist diesen Winkel auf. Bei niedrigen Temperaturen bil-

det das zweidimensionale Netzwerk den energetisch günstigsten Zustand. Durch die offensichtlich höhere Biegesteifigkeit und dadurch nur geringen Fluktuationen bei niedrigen Temperaturen rollen sich die Netzwerke nicht zusammen. Es ist denkbar, daß es innerhalb der Röhren mechanische Spannungen gibt, welche eine Auflösung der Röhren beschleunigen. Die Bausteine können durch das Ablösen von der Röhre und anschließendes Anlagern an ein zweidimensionales Netzwerk in einen energetisch günstigeren Zustand übergehen.

4.4 Verknüpfung von DX-Elementen zu Dreibeinen

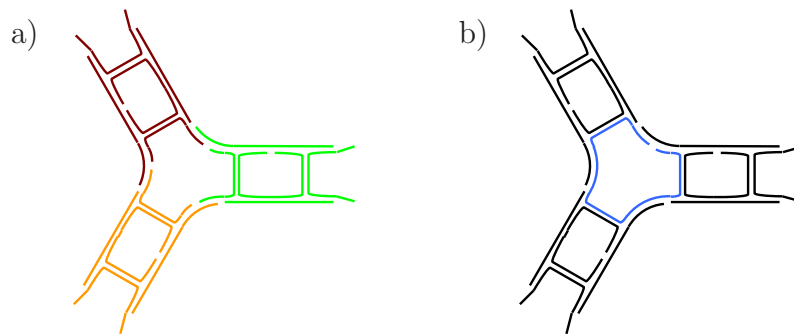


Abbildung 63: Verknüpfungsmöglichkeiten für DX-Elemente: (a) Drei unterschiedliche DX-Elemente verbinden sich zu einem Dreibein. (b) Die drei Oligonukleotide aus der Mitte sind in einem langen, blau dargestellten Oligonukleotid zusammengefaßt.

Um aus Bausteinen Netzwerke aufbauen zu können, ist eine Verknüpfung erforderlich. In den Methoden wurden bereits verschiedene Verknüpfungsmöglichkeiten von DX-Elementen erläutert. In diesem Abschnitt wird nun die Verknüpfung von Bausteinen aus DNA mit Richtungsänderung untersucht. Dabei lassen sich zwei unterschiedliche Strategien unterscheiden. Diese sind schematisch am Beispiel eines Dreibeins, welches aus drei DX-Elementen zusammengesetzt ist, in Abbildung 63 dargestellt. Die erste Möglichkeit ist die Zusammenlagerung von drei verschiedenen DX-Elementen über unterschiedliche *sticky ends* (a). Die Basensequenzen der *sticky ends* sind so gestaltet, daß sie dabei nur eine Hybridisierung von drei DX-Elementen zulassen. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, alle DX-Elemente über ein langes Oligonukleotid zu verbinden (b). Dieses Oligonukleotid ist in der Abbildung blau dargestellt. Die Länge des Oligonukleotides bestimmt, wie viele DX-Elemente aneinander gelagert werden. Bei dieser Variante läßt sich neben un-

terschiedlichen DX-Elementen auch eine definierte Anzahl gleicher DX-Elemente miteinander verbinden. Das erlaubt die Nutzung von Symmetrien in der Netzwerkgestaltung. Um diese Möglichkeit zu verdeutlichen, wurden die DX-Elemente in Abbildung 63b mit der gleichen Farbe gezeichnet. Da sich die DX-Elemente über ein einzelnes Oligonukleotid zusammenlagern, ist das Dreibein auch als ein einziger Baustein auffaßbar. Für beide Möglichkeiten ist auch eine Verbindung von mehr als drei DX-Elementen und von anderen Bausteinen denkbar.

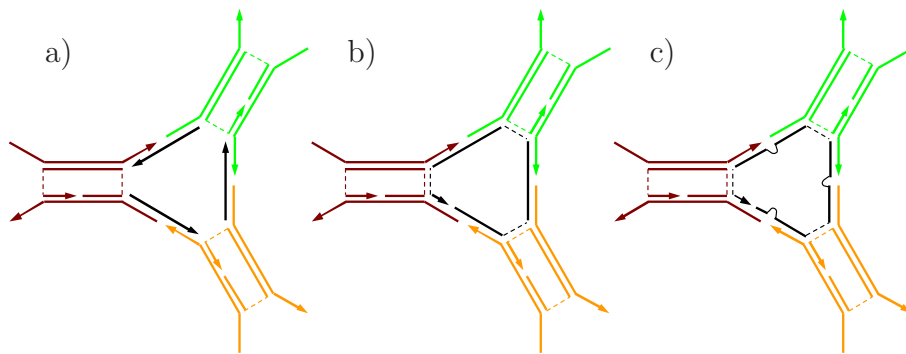


Abbildung 64: Schematische Darstellung der Entwürfe für die Verbindung von drei verschiedenen DX-Elementen mit (a) drei Oligonukleotiden sowie (b) und (c) einem Oligonukleotid. Bei (c) sind zusätzliche, ungepaarte Basen in dem die DX-Elemente verbindenden Oligonukleotid eingebaut.

Konkrete Realisierungen des Verlaufes der Oligonukleotide für die Verbindung von drei verschiedenen DX-Elementen sind in Abbildung 64 dargestellt. Diese drei Varianten sollen im folgenden untersucht werden. In Abbildung 64a geschieht die Verbindung der drei DX-Elemente über drei Oligonukleotide. Die verbindenden Oligonukleotide hybridisieren nur auf einer Seite an die DX-Elemente. Die Verbindung erfolgt dadurch etwas anders als in Abbildung 63a, ist dieser Variante aber trotzdem zuzuordnen. In Abbildung 65a sind drei so verbundene DX-Elemente schematisch mit der Basensequenz dargestellt. Die Doppelstrangabschnitte bestehen aus ganzen Windungen und sind 10 oder 11, bzw. -bei einem zwei Windungen langen Abschnitt- 21 Basenpaare lang. Aus dem Gelbild in Abbildung 65b ist ersichtlich, daß das Dreibein im Gel als einzelne Bande läuft. Das bedeutet, daß die gebildete Struktur im Gel stabil ist. Neben der Bande des Dreibeins bei 1000 bp sind noch weitere, allerdings nur schwach ausgeprägte Banden in der Bahn vorhanden. Diese sind vermutlich unvollständig gebildete Strukturen.

In den Abbildungen 64b und 64c sind die drei DX-Elemente über ein langes

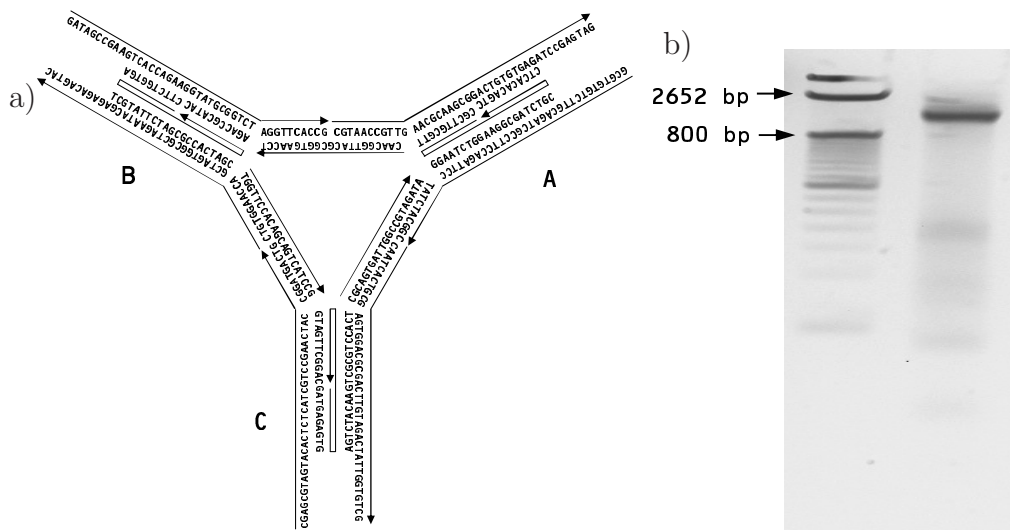


Abbildung 65: Realisierung für die Verbindung von drei verschiedenen DX-Elementen nach Variante aus Abbildung 64a. (a) Schematische Darstellung mit Basenbelegung. Die DX-Elemente sind mit A, B und C bezeichnet. (b) Die linke Bahn des Gelbildes enthält eine 50 bp-Leiter. Die rechte Bahn enthält das Dreibein, welches als Bande bei ca. 1000 bp läuft.

Oligonukleotid verbunden. Für die Realisierung dieser beiden Varianten werden die gleichen DX-Elemente verwendet. In Abbildung 64c wurden in das durchgehende Oligonukleotid zwei zusätzliche, ungepaarte Basen an jeder Seite eingebaut. Diese Basen verhindern eine durchgehende Basenstapelung an dieser Stelle und erhöhen dadurch die Flexibilität des Konstruktes. Ein zu hohe Flexibilität ist bei Netzwerken nicht erwünscht, da sich dadurch Bausteine in nicht beabsichtigter Weise zusammenlagern können.

Verknüpft man die DX-Elemente auf beiden Seiten zu Dreibeinen, können sich diese zu größeren Strukturen zusammenlagern. In den Abbildungen 66, 68 und 69 sind AFM-Aufnahmen für alle drei Varianten zu sehen. Es lassen sich große Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten feststellen.

In Abbildung 66 sind AFM-Abbildungen von dem nach Abbildung 64a aufgebautem DNA-Netzwerk, bei dem die Verbindung zu Dreibeinen über jeweils drei Oligonukleotide erzeugt wird, zu sehen. Bei hohen DNA-Konzentrationen wie in Abbildung 66a sind große Bereiche vollständig mit DNA bedeckt. Dazwischen sind leiterförmige Strukturen sichtbar. Eine dieser Strukturen ist in der Abbildung umrahmt. Die leiterförmigen Strukturen sind 20 nm breit und haben einen "Sprossenabstand" von 11 nm. In Abbildung 67 ist schematisch dargestellt, wie die

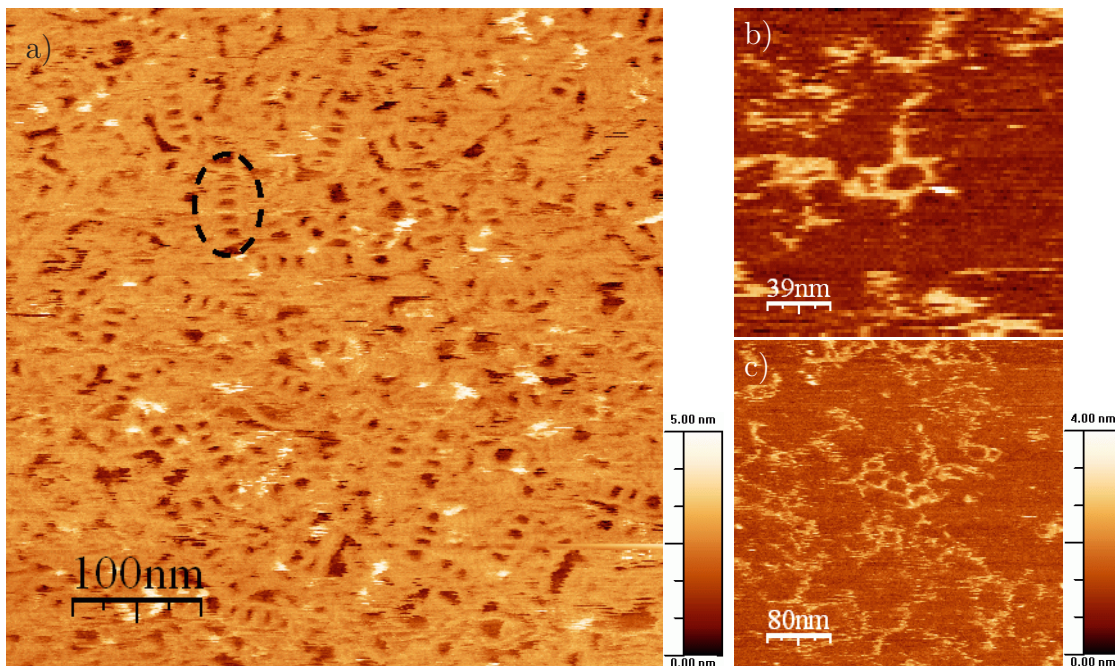


Abbildung 66: AFM-Abbildungen von einem nach Abbildung 64a aufgebauten DNA-Netzwerk. (a) Bei hoher DNA-Konzentration bilden sich leiterartige Strukturen. Eine dieser Strukturen ist markiert. (b), (c): Bei niedriger DNA-Konzentration sind Sechsecke vorhanden.

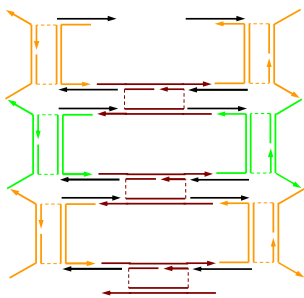


Abbildung 67: Schematische Darstellung, wie sich eine Leiterstruktur bilden könnte.

Zusammenlagerung der DX-Elemente zu einer Leiterstruktur sein könnte. An jeweils einer Seite der gebildeten Dreibeine ist ein Oligonukleotid nicht hybridisiert. An dieser Stelle bilden DX-Elemente einen Winkel von 180° . Das dritte DX-Element ist im rechten Winkel zu den beiden anderen angeordnet. Aus dem Modell läßt sich der Sprossenabstand aus zwei Windungen (7,2 nm) und zwei Durchmessern (4 nm) der DNA-Doppelhelix zu 11,2 nm ermitteln. Das ist eine sehr gute Übereinstimmung zu dem gemessenen Wert von 11 nm. Die Breite der Leiter im Modell beträgt mit sechs Windungen (21,6 nm) und zwei Durchmessern (4 nm) insgesamt 25,6 nm. Das ist mehr als der gemessene Wert von 20 nm. Vermutlich sind die Leitern seitlich gestaucht. Ein Wert von 21,6 nm Breite kann aber auch mit einem Modell erreicht werden, in dem die DX-Elemente auf einer Seite nach innen geklappt sind. Baut man mehr DX-

Elemente in das Modell, würden größere Strukturen erzeugt werden. Die Größen aus dem Modell würden dann mit den gemessenen Werten nicht mehr übereinstimmen. Daraus läßt sich ableiten, daß sich bei den Leitern vier DX-Elemente zu einem Viereck zusammenlagern.

Bei niedrigerer DNA-Konzentration kann man wie in Abbildung 66b vereinzelt Sechsecke finden. In Abbildung 66c ist eine Struktur aus drei Sechsecken zu sehen. Das zeigt, daß sich Strukturen aus Sechsecken bilden können. Die Kanten der Sechsecke sind ca. 15 nm lang, was eine gute Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert von 15,5 nm bedeutet. Die Winkel im Sechsecke in Abbildung 66b liegen im Bereich von 100° bis 140° . Das entspricht einer Abweichung um $\pm 20^\circ$ vom erwarteten Winkel von 120° .

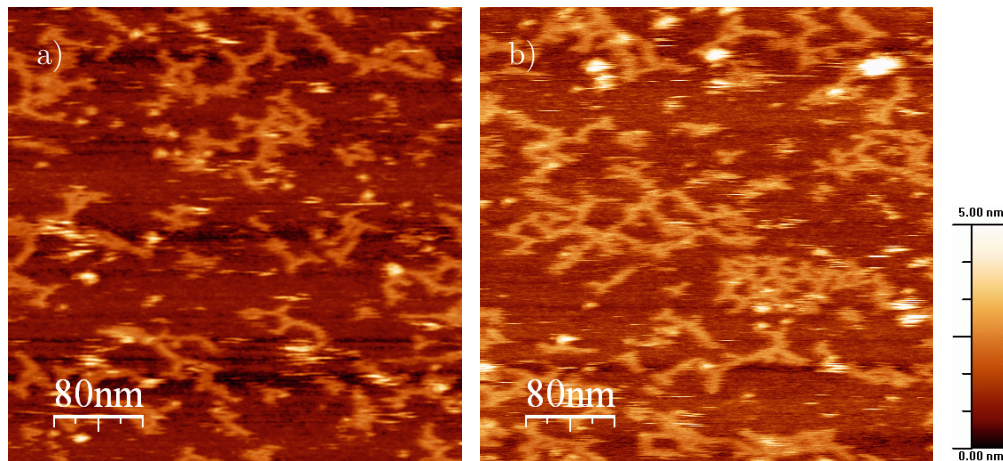


Abbildung 68: AFM-Abbildungen von einer nach Abbildung 64b aufgebauten DNA-Struktur.

In Abbildung 68 sind AFM-Abbildungen von dem nach Abbildung 64b aufgebauten DNA-Netzwerk zu sehen. Es befinden sich verzweigte, unregelmäßige Strukturen auf der gesamten Oberfläche. Vereinzelt sind wie in Abbildung 68b unregelmäßige Netzwerke zu finden. Die Winkel der Dreibeinstrukturen liegen im Bereich von 90° bis 150° . In den AFM-Abbildungen lassen sich unregelmäßige Strukturen, aber keine Sechsecke finden. Daraus läßt sich folgern, daß die Winkel zwischen den DX-Elementen nicht gleich 120° sind und die Steifigkeit der Dreibeine hoch ist. Durch die hohe Steifigkeit werden die unterschiedlichen Winkel fixiert, was den Aufbau regelmäßiger Strukturen verhindert. Eine denkbare Ursache für die ungleichen Winkel zwischen den DX-Elementen ist, daß das mittlere Oligonukleotid an

einer Stelle offen ist. An dieser Stelle kann sich ein Knick bilden, welcher dann zu den ungleichmäßigen Winkeln führt.

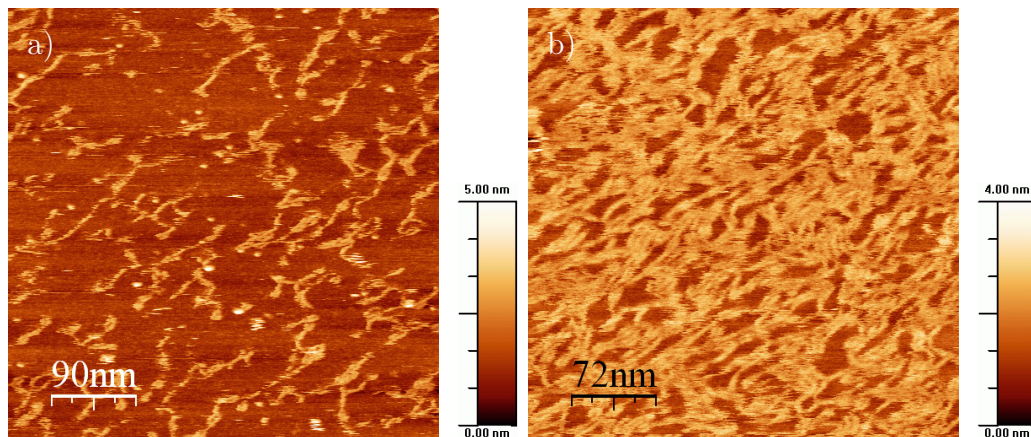


Abbildung 69: AFM-Abbildungen von einer nach Abbildung 64c aufgebauten DNA-Struktur mit zwei ungepaarten T-Basen im die DX-Elemente verbindenden Oligonukleotid.

Daß sich durch den in Abbildung 64c dargestellten Einbau von ungepaarten Basen die Flexibilität der Dreibeine erhöht, ist in Abbildung 69 zu sehen. In Abbildung 69a ist wenig DNA vorhanden. Die DX-Elemente sind zu kurzen, verzweigten Ketten zusammengelagert. Die Flexibilität der Dreibeine ist so hoch, daß die DX-Elemente teilweise nebeneinander liegen. Der Winkel zwischen den DX-Elementen läßt sich nicht eingrenzen. Absorbiert mehr DNA auf dem Glimmer, wie in Abbildung 69b, entsteht der Eindruck eines großen, unregelmäßigen Netzwerkes. Die Größe des möglicherweise gebildeten Netzwerkes ist jedoch aus der Abbildung nicht entnehmbar, da DNA-Strukturen auch zusammenstoßen können, ohne miteinander hybridisiert zu sein.

Vergleicht man die drei Varianten, ist die höchste Steifigkeit bei der Variante mit einem durchgehenden Oligonukleotid nach Abbildung 64b feststellbar. Die Verbindung von drei DX-Elementen mit drei Oligonukleotiden (Abbildung 64a) erzeugt eine mittlere Steifigkeit. Der Einbau von ungepaarten Basen, wie in Abbildung 64c schematisch dargestellt, erzeugte flexible Dreibeine.

Eine aus Ecken bestehende Struktur ist die in Abbildung 70 schematisch dargestellte Zickzack-Struktur. Zum Aufbau dieser Struktur wurden die gerade verwendeten DX-Elemente genutzt. Diese wurden auf einer Seite zu einem Dreibein, auf der jeweils anderen Seite jedoch anders verknüpft. In Abbildung 70a ist die Zu-

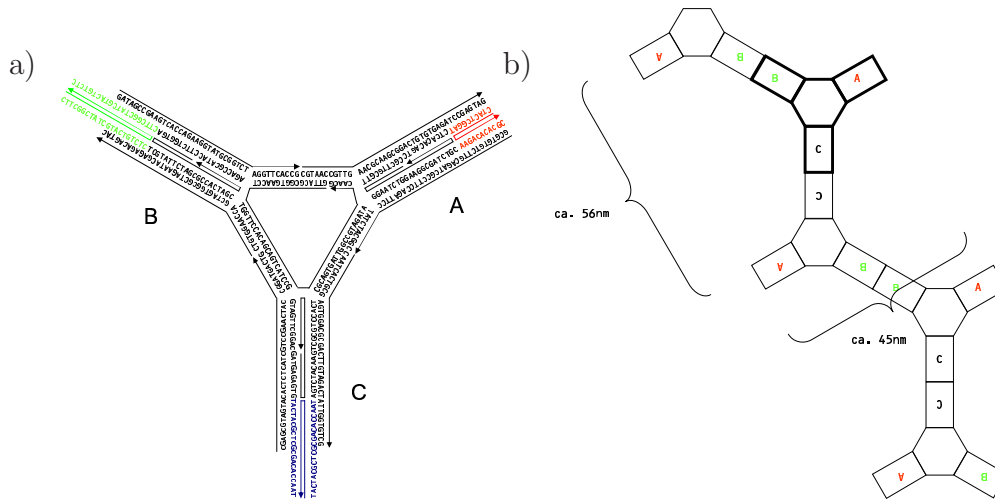


Abbildung 70: Schematische Darstellung der Zickzack-Struktur. (a) Das zum Aufbau der Struktur verwendete Dreibein mit der Basensequenz. Das rot dargestellte Oligonukleotid erzeugt *blunt ends* beim DX-Element A. Die grün und blau dargestellten Oligonukleotide ermöglichen die Zusammenlagerung zweier B bzw. C DX-Elemente. (b) Durch die Zusammenlagerung mehrerer Dreibeine bildet sich die Zickzack-Struktur. Die drei DX-Elemente A, B und C sind als Rechtecke dargestellt. Ein Dreibein ist hervorgehoben. Die theoretisch ermittelten Werte für die Breite der Struktur und den Abstand zweier A-Elemente sind mit eingezeichnet.

sammenlagerung der drei mit A, B und C bezeichneten DX-Elemente schematisch dargestellt. Die drei DX-Elemente sind auf der einen Seite mit einem durchgehenden Oligonukleotid wie in Abbildung 64b zu einem Dreibein verbunden. Diese Verknüpfung wurde gewählt, weil sie die höchste Steifigkeit aufweist. Die Dreibeine bilden die Ecken in der Struktur. In Abbildung 70b ist ein Dreibein hervorgehoben. Die weitere Struktur wird durch die Verknüpfung dieser Dreibeine erzeugt. Die dabei verwendeten Oligonukleotide sind in Abbildung 70a farblich dargestellt. An das DX-Element A wird ein Oligonukleotid angelagert, so daß dieses mit einem *blunt end* abschließt. Für die DX-Elemente B und C wird ein Oligonukleotid so gestaltet, daß diese sich selbst zusammenlagern können. Diese Zusammenlagerung entspricht der in Abbildung 63b dargestellten Variante der Verbindung von gleichen DX-Elementen über ein langes Oligonukleotid. In diesem Fall lagern sich allerdings nur zwei DX-Elemente zusammen. Dadurch entsteht eine DX-Kette mit einer Abfolge der DX-Elemente von BBCCBBCC usw., welche zwischen den Elementen B und C einen Knick hat, an dem das Element A angelagert ist.

In Abbildung 71 sind AFM-Aufnahmen der Zickzack-Struktur zu sehen. In Ab-

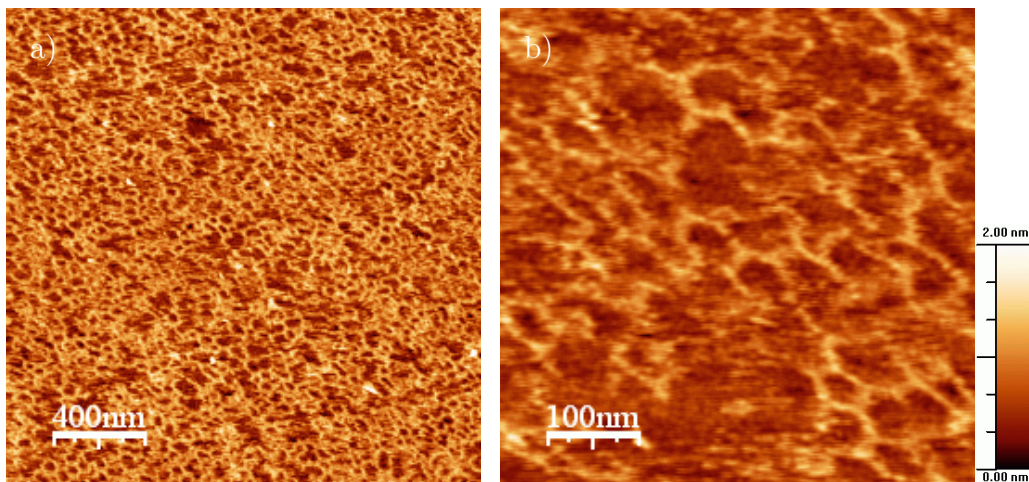


Abbildung 71: AFM-Abbildungen der Zickzack Struktur. (a) Übersichtsbild. (b) Einzelne Strukturen sind erkennbar.

Abbildung 71a ist ein größerer Bereich der Probe abgebildet. Die Oberfläche ist dicht mit verzweigten Strukturen belegt. Die Zickzack-Strukturen stoßen häufig zusammen, wodurch der Eindruck entsteht, daß sich Sechsecke gebildet haben. In Abbildung 71b sind einzelne Zickzack-Strukturen sichtbar. Diese haben eine Form aus halben Sechsecken. Das zeigt, daß die Verbindung von drei DX-Elementen über ein Oligonukleotid so steif ist, daß sie auch zum Aufbau von Zickzack-Strukturen verwendet werden kann. Es sind bis 125 nm lange Strukturen sichtbar. Das entspricht zehn DX-Elementen in der Kette.

Als Abstand zwischen den A-Elementen auf einer Seite der Kette wurden aus den AFM-Abbildungen Werte von 45 bis 65 nm ermittelt. Das ist eine gute Übereinstimmung mit dem theoretisch ermittelten Wert von 56 nm. Für die Breite der Struktur wurde Werte von 40 bis 50 nm gemessen, was ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit dem theoretisch ermittelten Wert von 45 nm ist.

Die in Abbildung 71 abgebildeten Strukturen sind deutlich regelmäßiger als die in Abbildung 68. Ursache ist, daß die DX-Kette aus einer Abfolge der DX-Elementen B und C aufgebaut ist. Der für den Verlauf der Kette ausschlaggebende Winkel ist immer der zwischen den DX-Elemente B und C gebildete. Dieser nimmt Werte von 110° bis 130° an und besitzt somit nur geringe Abweichungen vom erwarteten Winkel von 120° . Die beiden anderen Winkel schwanken mit gemessenen Werten von 90 bis 150° stärker. Diese Winkel bestimmen, in welcher Richtung das DX-

Element A an die Kette angelagert ist, haben aber keinen Einfluß auf den weiteren Verlauf der Kette. Die Winkel der Strukturen in Abbildung 68 schwanken zwischen 90° und 150° . Da der zum Aufbau der Zickzack-Struktur ausschlaggebende Winkel nur zwischen 110 und 130° schwankt, wird diese Struktur insgesamt regelmäßiger.

In diesem Kapitel wurden verschiedene DNA-Strukturen und Netzwerke untersucht. Es wurden großen Verzweigungen mit 7 kbp langen Verlängerungen aufgebaut. Das entspricht einer Länge von $2,4 \mu\text{m}$, was einer Vergrößerung des Linkerelementes um einen Faktor von etwa 400 entspricht. Dadurch werden die Verzweigungen im Fluoreszenzmikroskop beobachtbar. Das macht eine spätere Nutzung für in-situ-Experimente denkbar.

Weiterhin wurden ein- und zweidimensionale Netzwerke aus DX-Elementen hergestellt. Der Unterschied zwischen den dabei verwendeten DX-Elementen besteht einzig in dem Vertauschen zweier *sticky ends*. Beim eindimensionalen Netzwerk ist durch Aneinanderlagerung der Ketten eine Bildung von geordneten Strukturen in der Lösung möglich.

An aus 4x4-Kacheln aufgebauten Netzwerken konnte gezeigt werden, daß die Hybridisierungsbedingungen einen Einfluß auf die Form des sich ausbildenden Netzwerkes haben. Es können Gitter oder Röhren entstehen.

Eine Verknüpfung von drei DX-Elementen zu Dreibeinen kann mit verschiedenen Strategien erfolgen. Die Dreibeine können zu größeren Strukturen zusammen gelagert werden. Je nach Art der Verknüpfung bilden sich unterschiedliche Strukturen. Die Verbindung über ein durchgehendes Oligonukleotid erzeugt eine höhere Steifigkeit als die Verbindung mit drei kürzeren Oligonukleotiden. Der Einbau von zwei ungepaarten Basen in der Struktur erzeugt eine hohe Flexibilität der Verbindung. Als Weiterentwicklung wurde eine Zickzack-Struktur hergestellt, welche eine Kombination der Verknüpfung von zwei und drei DX-Elementen darstellt. Dabei wurde die hohe Steifigkeit bei der Verbindung von DX-Elementen über ein langes Oligonukleotid ausgenutzt.

5 Einfluß der Basensequenz auf die Bausteingeometrie

Beim Entwurf von Bausteinen für ein DNA-Netzwerk wird gewöhnlich davon ausgegangen, daß der DNA-Doppelstrang gerade ist. Dabei wird die Unabhängigkeit der DNA-Struktur von der Sequenz vorausgesetzt. In einigen bisher aufgebauten Netzwerken, wie z.B. in [47], wurde allerdings festgestellt, daß eine Biegung in der Helix vorhanden sein muß. Gebogene Bausteine können Röhren bilden, wobei eine Röhrenbildung auch mit nicht gebogenen Bausteinen erreicht werden kann [13].

Eine zusätzliche Gestaltungsmöglichkeit für Bausteine bietet eine Richtungsänderung der DNA-Doppelhelix. Um eine Richtungsänderung der DNA-Doppelhelix an einer bestimmten Stelle zu erzeugen, wird die Doppelhelix dort unterbrochen. Dies geschieht durch den Einbau eines Verzweigungspunktes oder von ungepaarten Basen. Der entstehende Knick in der Doppelhelix weist eine erhöhte Flexibilität auf. Um einen steifen Baustein zu erzeugen, muß der genaue Winkel an dieser Stelle über die Geometrie des restlichen Bausteins festgelegt werden.

Im folgenden wird als neue Idee zur Bausteingestaltung untersucht, wie ein bewußter Einbau von gebogenen Abschnitten in DNA-Strukturen gestaltet werden kann. Gebogene Abschnitte können mit bestimmten Basensequenzen erzeugt werden. Die bisher als biegend gefundenen DNA-Sequenzen sind A- oder G-Trakte. Sie weisen für die Konstruktion von Netzwerken nachteilige Eigenschaften auf. Entweder sind sie selbstkomplementär, wie z.B. AATT und GGCC, oder sie bestehen aus einer Abfolge von gleichen Basen, wie z.B. AAAA. Dadurch können Fehlpaarungen entstehen, die eigentlich im Design vermieden werden müssen. Ein Vorteil von gebogenen Abschnitten gegenüber dem Einbau ungepaarter Basen ist, daß die Doppelhelix nicht unterbrochen wird. Somit bleibt die Steifigkeit erhalten. Der Winkel und die Richtung der Biegung werden durch den gebogenen Abschnitt bestimmt (Kapitel 2.2). Eine derartig erzeugte Biegung hätte im Baustein den Vorteil, daß die Richtungsänderung nicht mehr über die restliche Bausteingeometrie festgelegt werden muß. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden die aus der Literatur bekannten Werte für die Biegung jedoch nicht erreicht. Allerdings ist ein Einfluß der Basensequenz feststellbar.

Die beiden möglichen Sequenzen für einen G-Trakt sind GGCC und GGGCCC. Diese sind selbstkomplementär und bestehen nur aus GC-Basenpaaren, welche eine

hoher Bindungsenergie aufweisen. Dadurch sind relativ stabile Fehlpaarungen auch bei geringer Basenanzahl denkbar. Der A-Trakt kann in der Basensequenz variieren. Bei einem vier Basen langen A-Trakt gibt es die Möglichkeiten AAAA, AAAT und AATT mit den entsprechenden komplementären Sequenzen. Der Einbau von mehreren A-Trakten in einen Baustein läßt sich dadurch so gestalten, daß diese nicht selbstkomplementär und auch untereinander nicht vollständig komplementär sind. So sind z.B. beim Einbau von zwei vier Basen langen A-Trakten (AAAA und AAAT) in einen Baustein nur bis zu drei Basen lange, komplementäre Fehlpaarungen mit der Sequenz AAA möglich. Die Bindungsenergie der AT-Basenpaare ist niedriger als bei GC-Basenpaaren. Durch die Kombination von niedrigerer Bindungsenergie und geringerer Länge der möglichen Fehlpaarung ist deren Stabilität deutlich niedriger.

Eine Besonderheit des A-Traktes ist die Temperaturabhängigkeit der Biegung. Mit steigender Temperatur sinkt der Biegewinkel. Die Bausteine sollten daher so konstruiert sein, daß sie sich erst bei niedrigen Temperaturen zusammensetzen. Andererseits sind auch Konstruktionen denkbar, bei denen sich erst ein DNA-Netzwerk bildet, das sich während der weiteren Abkühlung zusammenrollt.

Längere biegende Sequenzen ermöglichen eine stärkere Biegung, erzeugen aber auch längere Abschnitte mit für die Netzbildung nachteiligen Eigenschaften. Um die möglichen Fehlpaarungen möglichst kurz zu gestalten, ist es günstig, eine Biegung aus mehreren kurzen Abschnitten zusammenzusetzen. Dadurch lassen sich z.B. lange, selbstkomplementäre Abschnitte vermeiden.

5.1 Einfluß innerhalb eines Bausteins

In Abbildung 72 ist ein Entwurf für ein gebogenes DX-Element zu sehen. Beim DX-Element wird die B-Form der DNA mit 10,5 Basen je Windung angenommen. Da es sich hier um ein DAE-Element handelt, zeigen die kleinen Furchen der Helices an den Strangaustauschpunkten in dieselbe Richtung. Die beiden Kreuzungspunkte liegen zwei Windungen (21 Basen) auseinander. Die Biegung wird durch A-Trakte (rot und dunkelrot) und G-Trakte (blau), welche sich jeweils auf dem oberen und dem unteren Doppelstrang befinden, erreicht. Die beiden A-Trakte haben eine unterschiedliche Basensequenz, um die Möglichkeit von Fehlpaarungen zu verringern. Die Richtung der Biegung wird über die Lage der Biegezentren bestimmt, welche sich hier in der Mitte der biegenden Abschnitte befinden. A- und G-Trakt biegen

Die direkt neben den A- und G-Trakten liegenden Basen sind in Abbildung 72 türkis gezeichnet. Mit diesen Basen wird verhindert, daß sich A- oder G-Trakte bzw. die komplementären Abschnitte verlängern. Die Verlängerung eines gebogenen Abschnittes kann zu einer Änderung der Biegrichtung führen. Die maximal zu erwartende Biegung dieses DX-Elementes läßt sich als Summe von 20° Biegung für den A-Trakt und 23° Biegung für den G-Trakt zu insgesamt 43° bestimmen.

Abbildung 74 zeigt ein Gel, in welchem die Hybridisierung der Oligonukleotide des in Abbildung 72 dargestellten DX-Elementes untersucht wird. In Bahn 1 ist eine Bande bei 150 bp vorhanden. Ein Vergleich mit Bahn 1 in Abbildung 39 zeigt, daß dort auch eine Bande bei 150 bp vorhanden ist. In Abbildung 39 ist eine weitere Bande bei 50 bp vorhanden, welche hier fehlt. Das bedeutet, daß sich bei der Hybridisierung von DXG3 und DXG5 vier Oligonukleotide zusammenlagern. Die über der Bahn schematisch dargestellte Hybridisierung, welche bei 50 bp zu erwarten wäre, wird nicht gebildet. In Bahn 2 ist eine Bande bei 50 bp vorhanden. Die beiden Oligonukleotide DXG3 und DXG4 lagern sich so wie in der Darstellung über dem Gel und ohne Fehlpaarungen zusammen. In Bahn 3 ist eine Bande bei 70 bp vorhanden. Die drei Oligonukleotide lagern sich wieder ohne Fehlpaarungen zusammen. Eine Bande bei 150 bp, wie sie in Bahn 1 mit den Oligonukleotiden DXG3 und DXG5 gebildet wird, ist nicht vorhanden. Das in Bahn 4 zusätzlich vorhandene Oligonukleotid DXG2 wird mit in die Struktur eingebaut. Durch die Struktur wird eine Bande bei 90 bp gebildet. Für Bahn 5 wurden alle Oligonukleotide des DXG-Elementes zusammen hybridisiert. Bei 100 bp ist eine schwach ausgeprägte Bande zu sehen, welche durch ein einzelnes DX-Element gebildet wird. Es sind Banden für zwei (200 bp), drei (300 bp) und mehr zusammengelagerte DX-Elemente zu sehen. In Bahn 7 sind zwei Banden sichtbar. In der unteren, stärkeren Bande laufen einzelne DXG3-Oligonukleotide. In der zweiten Bande bei 50 bp sind zwei Oligonukleotide miteinander hybridisiert. Ursache hierfür ist, daß die beiden selbstkomplementären G-Trakte und Teile der A-Trakte zusammen hybridisieren können. Aus dem Gel in Abbildung 74 läßt sich schlußfolgern, daß sich ein DX-Element mit A- und G-Trakten aufbauen läßt. Bei einzelnen Oligonukleotiden (Bahn 7) und bestimmten Strukturen aus wenigen Oligonukleotiden (Bahn 1) kommt es zu Fehlpaarungen. Aus Bahn 5 ist ersichtlich, daß sich das komplette DX-Element ohne Fehlpaarungen aufbauen läßt und Strukturen aus zwei und mehr zusammengelagerten DX-Elementen stabil durch das Gel laufen.

Die AFM-Abbildung des DNA-Netzwerkes in Abbildung 75 läßt erkennen, daß

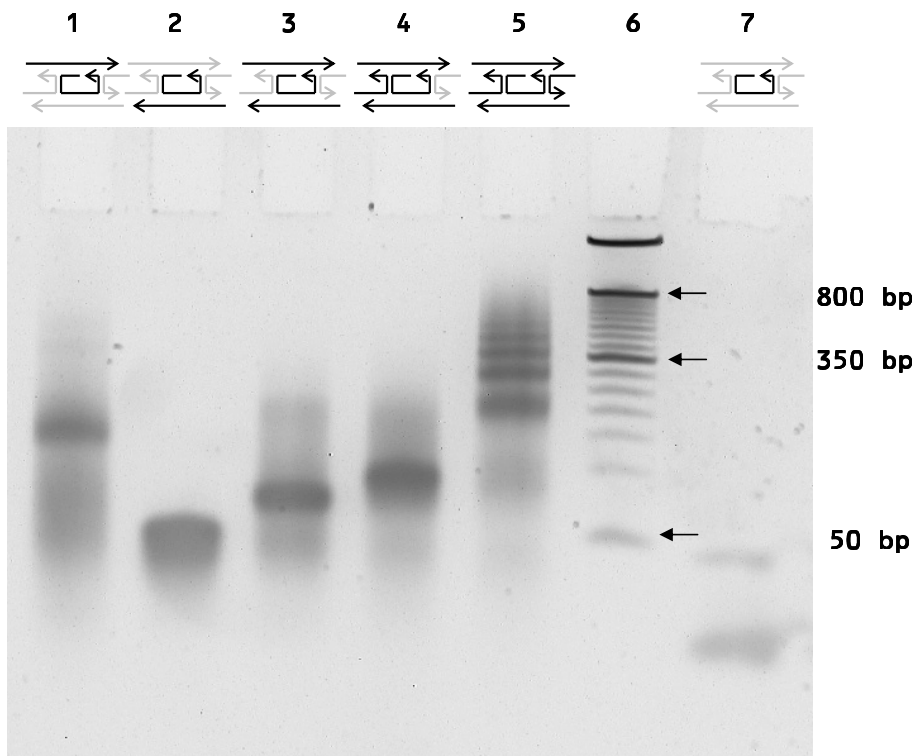


Abbildung 74: Gelbild mit Strukturen des DXG-Elementes. Welche Oligonukleotide hybridisiert wurden, ist über dem Gel graphisch dargestellt. In den einzelnen Bahnen befinden sich hybridisierte Strukturen aus folgenden Oligonukleotiden: 1: DXG3, DXG5; 2: DXG3, DXG4; 3: DXG3, DXG4, DXG5; 4: DXG2, DXG3, DXG4, DXG5; 5: DXG1, DXG2, DXG3, DXG4, DXG5; 6: 50 bp-Leiter; 7: DXG3

sich Ketten aus DX-Elementen gebildet haben. Die Ketten sind bis zu 200 nm lang, was 14 DX-Elementen entspricht. Die nebeneinander liegenden DX-Ketten haben Abstände von 8 bis 9 nm. Dieser Wert entspricht dem in Kapitel 4.2 untersuchten, eindimensionalen DX-Netzwerk. Die einzeln liegenden DX-Ketten sind im Vergleich mit Abbildung 56 deutlich weniger gebogen. Das bedeutet, daß der Einbau der gebogenen Abschnitte in das DX-Element statt zu der errechneten Biegung zu einer Versteifung der Struktur führte. Dies repräsentiert das Gegenteil des Modells in Abbildung 73. Als Ursache dafür sind Wechselwirkungen innerhalb des Netzwerkes zu vermuten, bei denen die für die Biegung notwendige Basenstapelung geändert wird. Zum einen kann eine gegenseitige Beeinflussung der zwei nebeneinander liegenden Doppelhelices nicht ausgeschlossen werden. Eine zweite Möglichkeit ist die Verdrehung der gebogenen Abschnitte in entgegengesetzte Richtungen. Durch eine

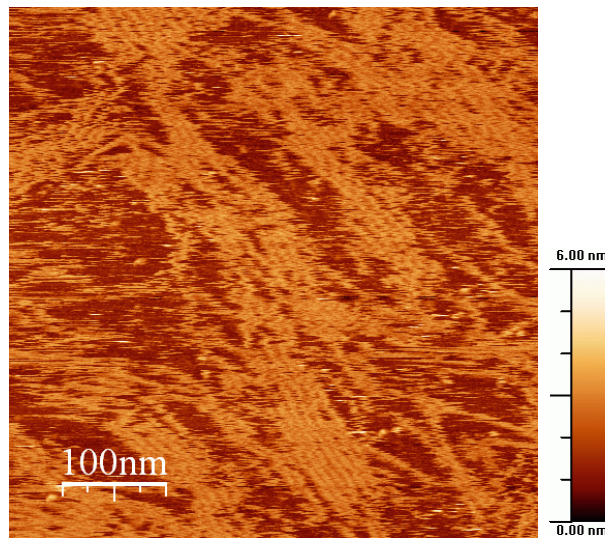


Abbildung 75: AFM-Abbildungen des DXG-Netzwerkes. Es sind einzelne DX-Ketten und geordnete Bereiche sichtbar.

daraus resultierende Biegung gegeneinander läßt sich auch die Versteifung erklären. Eine Verdrehung könnte durch denselben Mechanismus wie bei der gegenseitigen Verkipfung von DX-Elementen entstanden sein [13]. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Bausteingeometrie durch den Einbau beeinflusst wurde.

5.2 Einfluß auf die Verknüpfung von Bausteinen

In Kapitel 4.4 wurden zwei Strategien untersucht, um drei verschiedene oder gleiche DX-Elemente zu Verzweigungen zu verknüpfen. Eine mögliche neue Strategie eröffnet sich über die Geometrie der Verbindung. Läßt sich eine definierte Biegung der verbindenden Abschnitte zwischen den DX-Elementen erzeugen, kann eine definierte Anzahl gleicher DX-Elemente miteinander verbunden werden. In Abbildung 76 ist schematisch dargestellt, wie sich die Zusammenlagerung einer bestimmten Anzahl von Bausteinen über die Biegung der verbindenden DNA-Doppelstrangabschnitte steuern läßt. Sind die verbindenden Abschnitte gerade, können sich zwei DX-Elemente verbinden. Sind die verbindenden Abschnitte um 60° gebogen, verbinden sich drei DX-Elemente. Bei einem höherem Biegewinkel können auch mehr DX-Elemente zusammen hybridisieren. Wie bei der in Abbildung 63b dargestellten Variante ist auch hier eine Zusammenlagerung von gleichen DX-Elementen möglich.

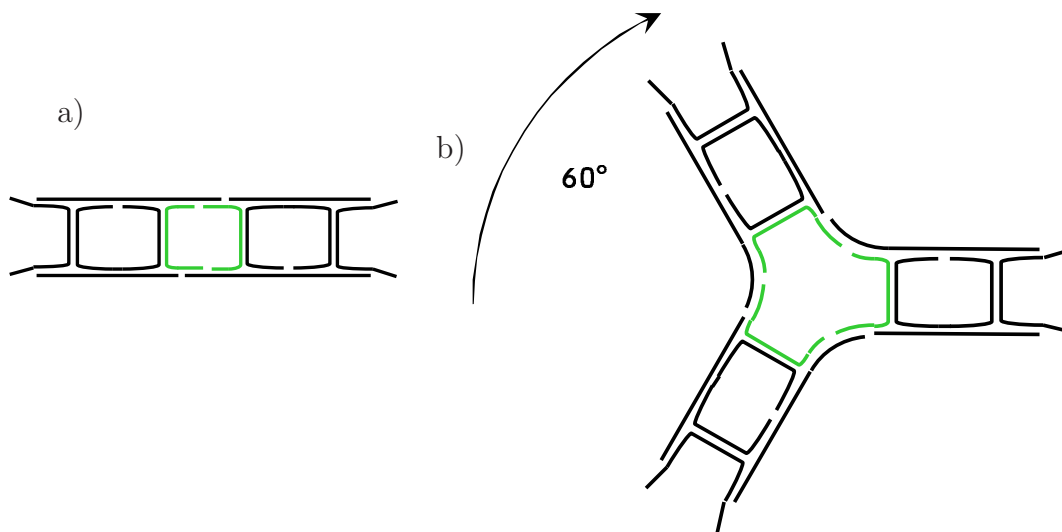


Abbildung 76: Unterschiedliche Verknüpfung der DX-Elemente in Abhängigkeit von dem im Bereich des grün dargestellten Oligonukleotids vorhandenen Winkel der Biegung. (a) Bei einer Biegung von 0° lagern sich zwei DX-Elemente zusammen. (b) Drei gleiche DX-Elemente verbinden sich zu einem Dreibein. Damit sich genau drei Elemente zusammen finden und nicht zwei oder vier, muß der Winkel von einem zum nächsten DX-Element 120° betragen. Das entspricht einer Biegung der DNA von 60° auf jeder Seite.

Zur Untersuchung des Einflusses von gebogenen Abschnitten auf die Verbindung von DX-Elementen wurde der in Abbildung 77 dargestellte Baustein entworfen. Auf der Seite mit dem grün dargestellten Oligonukleotid soll die Verbindung zwischen jeweils zwei DX-Elementen gebogen sein. Bei der Zusammenlagerung von DX-Elementen ist die Verbindung zwischen den Strangaustauschpunkten auf dieser Seite 21 Basen bzw. zwei Windungen lang. Die Biegung wird durch einen fünf Basen langen A- und einen vier Basen langen G-Trakt erzeugt. Um eine Zusammenlagerung von DX-Elementen wie in Abbildung 76b zu erzeugen, müssen die Doppelstränge auf dieser Seite voneinander weg biegen. Daraus folgt, daß die Biegezentren von A- und G-Trakt eine viertel bzw. eine dreiviertel Windung von den Strangaustauschpunkten entfernt liegen müssen. Das entspricht 2,6 bzw. 7,9 Basen. Das Biegezentrum des A-Traktes liegt 7,5 Basen und das des G-Traktes 7 Basen von den Strangaustauschpunkten entfernt. Der Unterschied zum theoretischen Wert von 7,9 beträgt bis zu 0,9 Basen. Da die Richtung der Biegung durch die Lage der gebogenen Abschnitte auf der DNA beeinflusst wird, ist zu erwarten, daß die Biegung nicht exakt in der Ebene liegt. In einem solchen Fall kann die Zusammen-

lagerung der DX-Elemente erschwert werden. Mit der im verbindenden Abschnitt enthaltenen Sequenz CTAG wird ein für die Torsion der DNA-Doppelhelix flexibler Abschnitt erzeugt [32]. Damit kann über eine Verdrehung der DNA an dieser Stelle die Richtung der Biegung korrigiert werden.

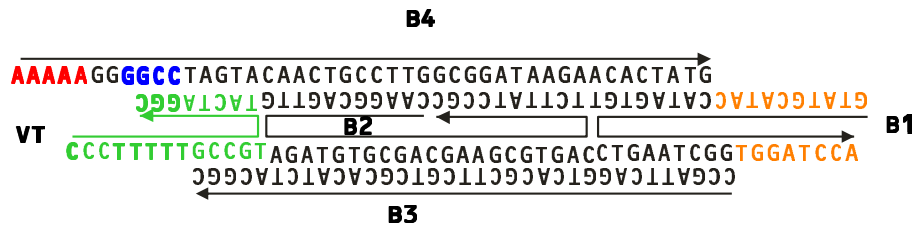


Abbildung 77: Das DX-Element zur Untersuchung der Verknüpfung mit gebogenen Abschnitten. Die biegenden Abschnitte der DNA sind auf dem Oligonukleotid B4 rot (A-Trakt) und blau (G-Trakt) dargestellt.

Die maximal zu erwartende Biegung aus A- und G-Trakt setzt sich aus 20° Biegung für den A-Trakt und 23° Biegung für den G-Trakt zu 43° zusammen. Aus Abbildung 76 ist ersichtlich, das sich entweder eine Biegung von 60° bei der Verbindung von drei DX-Elementen oder von 0° bei der Verbindung von zwei DX-Elementen einstellt. Der Winkel von 43° liegt zwischen beiden Werten, weshalb die Bildung beider Strukturen denkbar ist. Die sich daraus ableitenden Netzwerke sind eine lineare Struktur bei der Zusammenlagerung von zwei DX-Elementen bzw. ein hexagonales Netzwerk bei der Zusammenlagerung von drei DX-Elementen.

An der Stelle, wo sich die Sequenz GCCG auf dem VT-Oligonukleotid befindet, ist eine mögliche Position für einen weiteren G-Trakt. Um Fehlpaarungen durch einen weiteren, selbstkomplementären Abschnitt zu vermeiden, wurde an dieser Stelle kein weiterer G-Trakt eingebaut. Statt dessen wurden GC-Schritte, welche einen hohen *Roll*-Winkel annehmen und die Biegung somit insgesamt verstärken können, eingebaut.

Das Oligonukleotid mit den orange dargestellten *sticky ends* enthält keine biegenden Abschnitte und soll zwei DX-Elemente miteinander verbinden. Für die Verbindung wurden selbstkomplementäre *sticky ends* erzeugt.

In Kapitel 4.4 wurde festgestellt, daß es Unterschiede bei der Zusammenlagerung von drei unterschiedlichen DX-Elementen über drei kurze Oligonukleotide oder ein langes Oligonukleotid gibt. Hier soll nun für die Variante nach Abbildung 63b die Verbindung von drei gleichen DX-Elementen über ein langes Oligonukleotid unter-

sucht werden. Dazu wurde das in Abbildung 77 grün gezeichnete Oligonukleotid in der dreifachen Länge mit sich wiederholender Sequenz synthetisiert. Dieses Oligonukleotid hat die Bezeichnung VTx3. Da es drei DX-Elemente verbindet, wird von diesem bei der Hybridisierung nur 1/3 der Menge, im Verhältnis zu den anderen Oligonukleotiden, zugegeben.

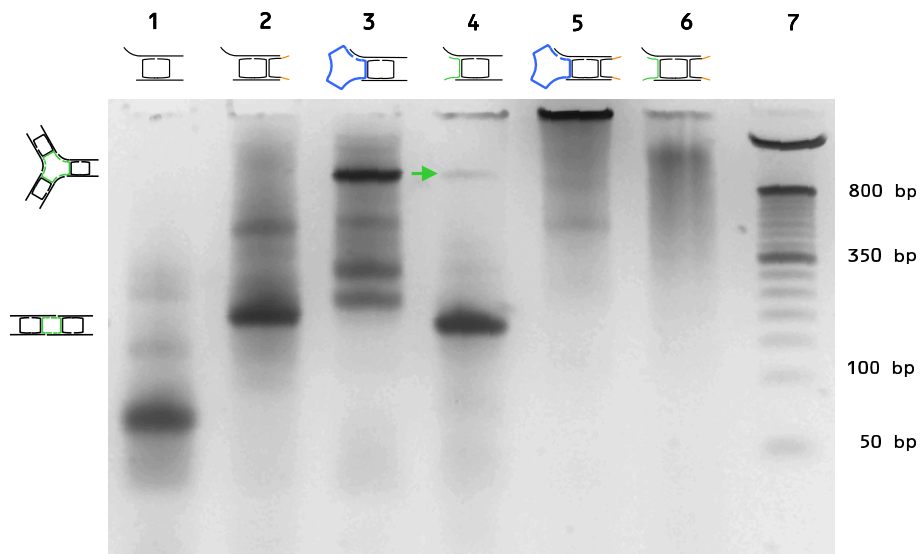


Abbildung 78: Gelbild mit Strukturen der Varianten nach Abbildung 63b und 76b. In den einzelnen Bahnen befinden sich hybridisierte Strukturen aus folgenden Oligonukleotiden: 1: B2, B3, B4; 2: B1, B2, B3, B4; 3: B2, B3, B4, VTx3; 4: B2, B3, B4, VT; 5: B1, B2, B3, B4, VTx3; 6: B1, B2, B3, B4, VT; 7: 50 bp-Leiter. Welche Oligonukleotide zusammen hybridisiert wurden, ist über den Bahnen schematisch dargestellt. In den schematischen Darstellungen ist das Oligonukleotid VT grün, das Oligonukleotid VTx3 blau dargestellt. Die schematischen Darstellungen links neben dem Gelbild geben die Positionen für zwei und drei verbundene DX-Elemente an.

Im Abbildung 78 ist ein Gel mit hybridisierten Oligonukleotiden der DX-Elemente aus den Varianten in Abbildung 63b und 76b zu sehen. In Bahn 1 sind die Oligonukleotide B2, B3 und B4 hybridisiert. Diese bilden ein Konstrukt bei 80 bp. In Bahn 2 wurde zusätzlich das Oligonukleotid VT mit hybridisiert. Die Bande bei 200 bp zeigt, daß hier zwei DX-Elemente zusammen hybridisiert sind. Bei der Verbindung mit einem langem Oligonukleotid in Bahn 3 entsteht eine Bande bei 1000 bp. Hier lagern sich drei DX-Elemente zusammen. Es sind ferner drei schwächere Banden bei 200 bp, 250 bp und 700 bp zu finden. Hierbei handelt es sich um unvollständig hybridisierte Strukturen. Die Verbindung der DX-Elemente mit kurzen Oligonukleotiden erzeugt in Bahn 4 eine starke Bande bei 150 bp. Hier haben

sich zwei DX-Elemente zusammengelagert. Das entstandene Konstrukt ist links neben dem Gel schematisch dargestellt. In der Bahn ist auch eine sehr schwache Bande bei 1000 bp zu sehen, welche mit einem grünen Pfeil markiert ist. Aus der Lage der Bande, welche sich genau in derselben Höhe befindet wie die stärkste Bande bei Bahn 3, läßt sich schlußfolgern, daß sich hier Dreibeine gebildet haben. Dieses Konstrukt ist schematisch links neben dem Gel dargestellt. Aus der Intensität der Banden läßt sich ablesen, daß sich hauptsächlich zwei DX-Elemente zusammengelagert haben und nur ein geringer Teil Dreibeine bildet. Anhand der errechneten Biegung von bis zu 43° war ein deutlich höherer Anteil an drei zusammengelagerten DX-Elementen zu erwarten. Die Biegung der die DX-Elemente verbindenden Abschnitte ist offensichtlich zu gering, um eine effektive Verbindung von drei DX-Elementen zu ermöglichen. In Bahnen 5 und 6 sind alle Oligonukleotide für Varianten aus Abbildung 63b und 76b hybridisiert. Die in Bahn 5 vorhandenen Konstrukte sind stabil und so groß, daß sie in der Tasche hängen bleiben. Der Schmier in Bahn 6 weist auf einen Zerfall größerer Konstrukte während der Gelelektrophorese hin. Daraus ergibt sich, daß die mit einem langem Oligonukleotid gebildeten Konstrukte deutlich stabiler sind.

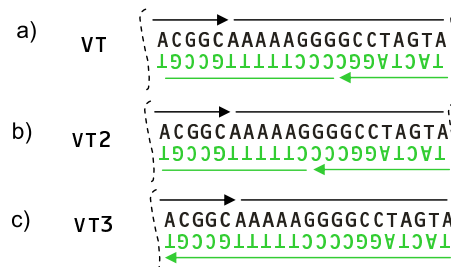


Abbildung 79: Schematische Darstellung des Doppelstrangabschnittes, welcher die DX-Elemente verbindet und die biegenden Abschnitte enthält. Dargestellt ist der gesamte Bereich zwischen den Strangaustauschpunkten der DX-Elemente. In den Varianten der unterschiedlichen VT-Oligonukleotide ist der Einzelstrang an verschiedenen Stellen unterbrochen. Die Basensequenz bleibt gleich. (a) Das Oligonukleotid endet zwischen Basenpaar 13 und 14. (b) Das Oligonukleotid endet zwischen Basenpaar 11 und 12. (c) Das Oligonukleotid endet an den Strangaustauschpunkten der DX-Elemente.

Eine Erklärung für die im Gel festgestellte geringe Biegung ist, daß das verbindende Oligonukleotid im G-Trakt endet. An diesem Punkt ist das Phosphatrückgrat unterbrochen. Um den Einfluß der Unterbrechung des Phosphatrückgrates zu untersuchen, wurden andere verbindende Oligonukleotide getestet, bei denen das

Ende verschoben ist. In Abbildung 79 sind drei Varianten dargestellt. Das bisher verwendete Oligonukleotid ist mit VT bezeichnet. Beim Oligonukleotid VT2 ist der Endpunkt um zwei Basen verschoben. Beim Oligonukleotid VT3 sind die Enden an den Rand verlegt.

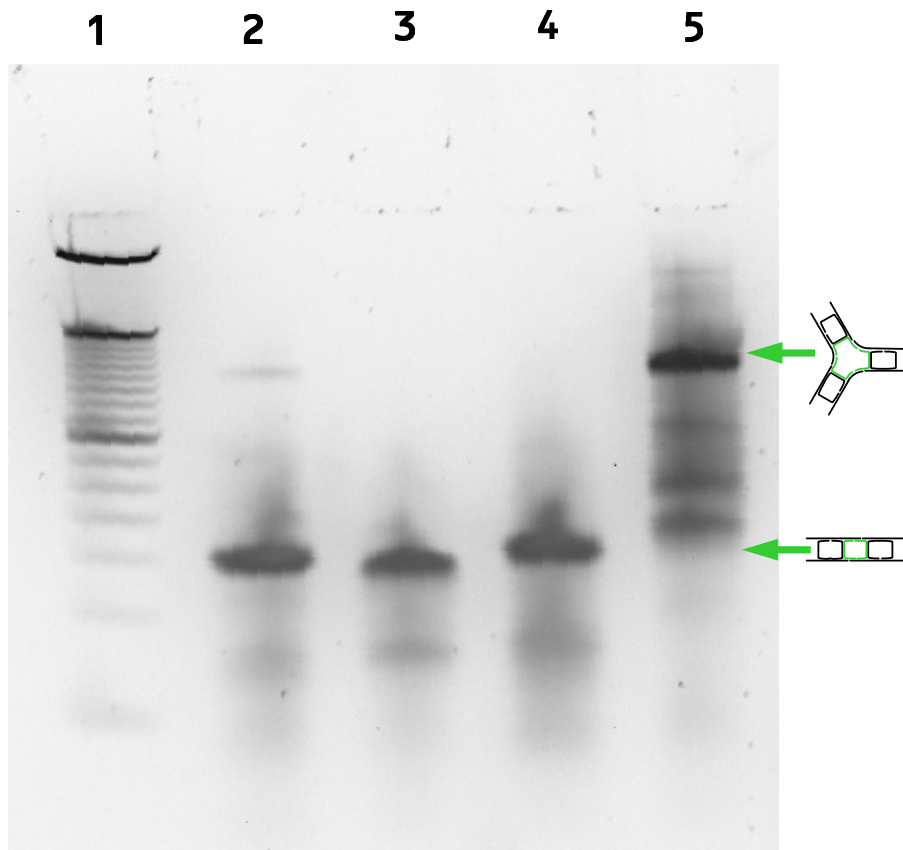


Abbildung 80: Gelbild zum Vergleich von Strukturen der Varianten mit verschiedenen VT-Oligonukleotiden und dem durchgehendem VTx3-Oligonukleotid. In Bahn 1 befindet sich eine 50 bp-Leiter. In den weiteren Bahnen befinden sich hybridisierte Strukturen aus folgenden Oligonukleotiden: 2: B2, B3, B4, VT; 3: B2, B3, B4, VT2; 4: B2, B3, B4, VT3; 5: B2, B3, B4, VTx3.

Abbildung 80 zeigt ein Gel, in welchem drei VT-Varianten in Bezug auf die Zusammenlagerung von zwei oder drei DX-Elementen verglichen werden. In den Bahnen 2 bis 4 sind DX-Elemente auf einer Seite über die Oligonukleotide VT, VT2 und VT3 miteinander verknüpft. Bahn 5 dient als Referenz und entspricht Bahn 3 aus Abbildung 78. An der intensivsten Bande dieser Bahn ist die Position von drei zusammengelagerten DX-Elementen ablesbar. Die Positionen der Banden

für zwei und drei zusammengelagerte DX-Elemente sind rechts neben dem Gel eingezeichnet. Bei Bahn 2 bis 4 befindet sich die stärkste Bande bei 150 bp. Zwei DX-Elemente sind hier verbunden. Bei Bahn 2 ist eine zusätzliche Bande bei 600 bp zu finden, welche die Verbindung von drei DX-Elementen repräsentiert. Bei den Varianten VT2 und VT3 in den Bahnen 3 und 4 ist die Bande bei 600 bp nicht vorhanden. Das bedeutet, daß eine Unterbrechung des Phosphatrückgrates einen deutlichen Einfluß auf die Biegung von DNA haben kann. Bei der Variante VT führt die Unterbrechung des Phosphatrückgrates am Biegezentrum des G-Traktes zu einer Erhöhung der Biegung. Ein solcher Unterschied kann nur möglich sein, wenn das Fehlen der Phosphatgruppe einen starken Knick in der DNA verursacht. In [100] wurde im Unterschied zu diesem Ergebnis bei einer Röntgendiffraktionsanalyse nur ein geringer Unterschied zwischen einer durchgehenden Doppelhelix und einer solchen mit einer fehlenden Phosphatgruppe festgestellt. Die Phosphatgruppe fehlte hier allerdings in einem A-Trakt.

Die in der Lösung befindlichen Ionen zeigen Wechselwirkungen mit der DNA. Zweiwertige Ionen sind einerseits für eine Biegung des G-Traktes notwendig, andererseits sind sie bei der 4-Arm-Verzweigung für eine Zusammenlagerung der Arme zur gestapelten X-Struktur verantwortlich.

Im Gel in Abbildung 81 wurde der Einfluß von verschiedenen Ionen in der Lösung auf die Zusammenlagerung von zwei oder drei DX-Elementen untersucht. Der höchste Anteil von drei verbundenen DX-Elementen ist in den Bahnen 2 und 3 vorhanden. Die hier zur Hybridisierung verwendeten Lösungen enthalten sowohl ein- als auch zweiwertige Ionen. Zwischen den beiden zweiwertigen Ionen Ca^{2+} in Bahn 2 und Mg^{2+} in Bahn 3 ist kein Unterschied feststellbar. Wenn nur ein- oder zweiwertige Ionen in der Lösung vorhanden sind, ist der Anteil von drei zusammengelagerten DX-Elementen geringer. Der Anteil von drei zusammengelagerten DX-Elementen ist bei einwertigen Ionen in Bahn 5 etwas höher als mit zweiwertigen Ionen in Bahn 1.

In Lösungen mit ein- oder zweiwertigen Ionen ist eine geringe Biegung vorhanden, wodurch ein geringer Anteil von drei verbundenen DX-Elementen vorhanden ist. Zu erwarten wäre, daß die Biegung beim Vorhandensein von zweiwertigen Ionen in der Lösung höher ist. Eine mögliche Ursache für die geringere Biegung ist, daß die zweiwertigen Ionen eine teilweise Umladung des Phosphatrückgrates der Doppelhelix verursachen. Dadurch bleiben die Doppelhelices zusammen, und das für die Zusammenlagerung von drei DX-Elementen notwendige "Auseinanderbiegen"

wird verhindert. Offensichtlich führt der gleiche Mechanismus auch zur Bildung von geordneten Bereichen beim eindimensionalen Netzwerk in Kapitel 4.2.

Sind ein- und zweiwertige Ionen in der Lösung vorhanden, können die einwertigen Ionen die zweiwertigen von der DNA verdrängen. Zwertwertige Ionen können bestimmte, bevorzugte Positionen an der DNA einnehmen [101], von welchen sie offensichtlich nicht verdrängt werden. Diese Positionen sind wahrscheinlich diejenigen, an denen gleichzeitig eine höhere Biegung erzeugt wird. Am Phosphatrückgrat gibt es solche bevorzugten Positionen nicht und die zweiwertigen Ionen werden verdrängt. Einwertige Ionen führen wahrscheinlich nicht zu einer Zusammenlagerung von Doppelhelices wie zweiwertige Ionen. Dies ist eine Möglichkeit, bei der die höhere Biegung durch die zweiwertigen Ionen erhalten bleibt, ein "Auseinanderbiegen" aber nicht verhindert wird.

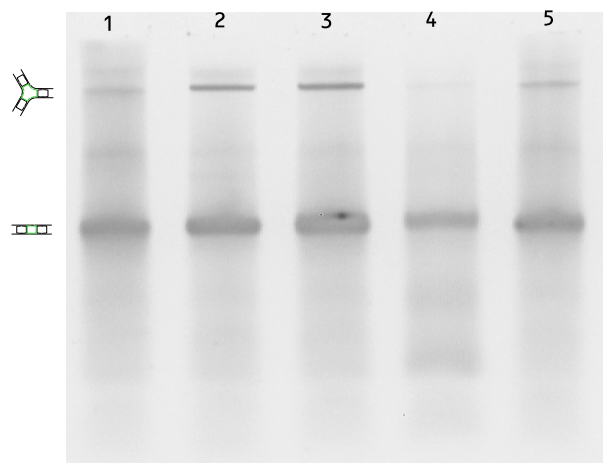


Abbildung 81: Gelbild mit der Struktur den Oligonukleotide B2, B3, B4 und VT, welche in verschiedenen Puffern hybridisiert wurde. Bahn 1: 10 mM CaCl_2 , Bahn 2: 10 mM CaCl_2 + SSC, Bahn 3: Hybridisierungspuffer + SSC, Bahn 4: SSC + K_2PtCl_4 , Bahn 5: SSC.³

In Kapitel 6 wird die Metallisierung von Netzwerken aus DNA untersucht. Ein bei der Metallisierung von DNA mit K_2PtCl_4 -Lösung notwendiger Schritt ist die Aktivierung. Diese führt zu Veränderungen, wie z.B. Knicken und Krümmungen, an der DNA. Um den Einfluß der Aktivierung auf ein DX-Element mit gebogenen Abschnitten zu untersuchen, wurde die in Bahn 5 verwendete Probe zwei Tage mit 0,14 mM K_2PtCl_4 -Lösung versetzt. Die aktivierten DX-Elemente sind in Bahn 4

³Der SSC-Puffer besteht aus 150 mM NaCl und 15 mM Natriumcitrat.

zu sehen. Im Gel ist fast keine Verbindung von drei DX-Elementen feststellbar. Bei der Verbindung von zwei DX-Elementen ist kein Unterschied zwischen Bahn 4 und 5 feststellbar. Daraus läßt sich ableiten, daß die Zusammenlagerung von drei DX-Elementen für eine DNA-Aktivierung zu instabil ist, während die Zusammenlagerung von zwei DX-Elementen nicht beeinflußt wird.

In einer weiteren Untersuchung wurde der pH-Werte auf pH=5 gesenkt bzw. auf pH=10 erhöht. Es zeigte sich kein meßbarer Einfluß auf die Zusammenlagerung von zwei oder drei DX-Elementen.

Eine weitere mögliche Ursache für den geringen Anteil an drei zusammengelagerten DX-Elementen ist die Hybridisierungstemperatur, bei der sich die DX-Elemente zusammenlagern. Wenn die Temperatur hoch ist, ist der Anteil der Biegung durch den A-Trakt geringer. Bei ca. 60°C ist keine Biegung im A-Trakt mehr vorhanden. Bei höheren Temperaturen sind außerdem die thermischen Fluktuationen in der DNA höher. Verbinden sich zwei Elemente mit einem *sticky end*, können bei genügend hoher Flexibilität der DNA die *sticky ends* auf der anderen Seite hybridisieren. Versuche mit einer schnelleren Abkühlung während der Hybridisierung führten allerdings nicht zu einem höherem Anteil von drei zusammengelagerten DX-Elementen, sondern zu einer hohen Fehlerrate.

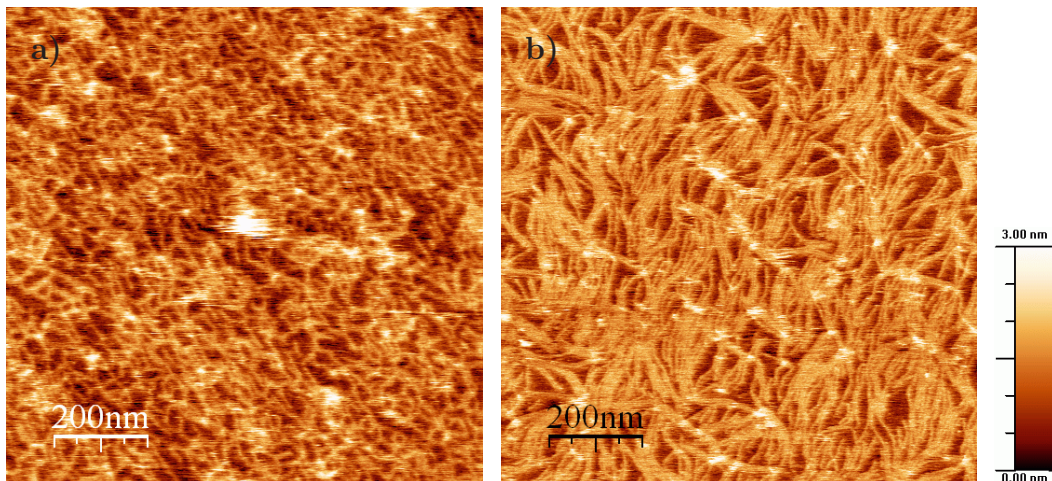


Abbildung 82: AFM-Abbildungen der verschiedenen Varianten für die Zusammenlagerung der DX-Elemente. (a) Verbindung mit einem langem Oligonukleotid. (b) Verbindung mit drei kurzen Oligonukleotiden. Die Höhenskalierung beträgt 3 nm.

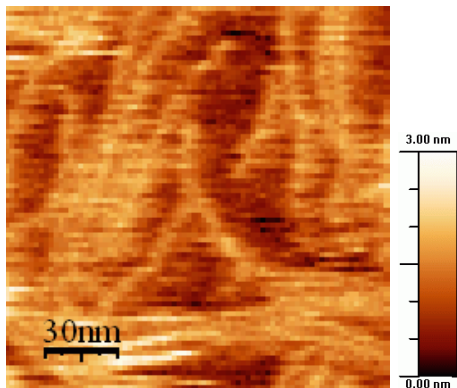


Abbildung 83: Ausschnitt aus Abbildung 82b mit einer Verzweigung.

Die in Abbildung 82 zu sehenden DNA-Netzwerke sind mit den Verknüpfungsmöglichkeiten mit einem durchgehenden Oligonukleotid nach Abbildung 63b und Oligonukleotiden mit biegenden Sequenzen nach Abbildung 76b hergestellt. Das für das Netzwerk in Abbildung 82b verwendete DX-Element ist in Abbildung 77 schematisch dargestellt. Für das Netzwerk in Abbildung 82a wurde das in Abbildung 77 grün dargestellte Oligonukleotid mit der dreifachen Länge synthetisiert. Die AFM-Abbildungen spiegeln die mittels Gelelektrophorese (Abbildung 78) gewonnenen Erkenntnisse wider. In Abbildung 82a sind nur verzweigte Strukturen vorhanden. Diese bilden ein unregelmäßiges zweidimensionales Netzwerk. In Abbildung 82b sind lineare Strukturen vorhanden. Die linearen Strukturen entstehen bei der Verknüpfung von zwei DX-Elementen. Das bedeutet, daß die Biegung der die DX-Elemente verbindenden Abschnitte niedrig ist. Die gebildeten DX-Ketten sind bis 300 nm lang, was 20 DX-Elementen entspricht. Der Abstand zwischen den Mittelpunkten der Ketten beträgt an einigen Stellen nur 6 nm. Der Abstand zwischen den Ketten beträgt 2 nm. Dies ist halb so viel, wie bei den bisher in dieser Arbeit untersuchten linearen Strukturen. Vereinzelt sind Verzweigungen wie im Bildausschnitt Abbildung 83 sichtbar. Das Vorhandensein von Verzweigungen zeigt übereinstimmend mit dem Gel, daß sich auch drei DX-Elemente verbinden können. Auch daraus läßt sich ableiten, daß die Biegung der die DX-Elemente verbindenden Abschnitte zwar niedrig, aber doch vorhanden ist.

In diesem Kapitel wurde die Idee verfolgt, biegende DNA-Sequenzen in der Bausteingestaltung zu nutzen. Es wurden die Möglichkeiten untersucht, wie beim Einbau von A- und G-Trakten mögliche Fehlpaarungen vermieden werden können. Mittels Gelelektrophorese wurde ersichtlich, daß Fehlpaarungen bei der Hybridisierung einzelner Oligonukleotide auftreten können. Die kompletten Bausteine konnten jedoch ohne Fehlpaarungen hybridisiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß sich solche Bausteine zu Netzwerken assemblieren lassen. Beim Einbau von A- und G-Trakten zur Erzeugung einer Biegung innerhalb des Bausteins wurde statt der erwarteten Biegung jedoch eine Versteifung des gebildeten Netzwerkes festgestellt.

Es wurden Versuche zur Nutzung der Biegung für die Zusammenlagerung einer definierten Anzahl von DX-Elementen durchgeführt. Eine durch die A- und G-Trakte verursachte Biegung war vorhanden, aber geringer als erwartet. Vermutlich beeinflussen die nebeneinander liegenden Doppelhelices die Basenstapelung, womit auch die Biegung beeinflusst wird. Einen denkbaren Ausweg bietet eine räumliche Trennung der biegenden Abschnitte vom Rest des Netzwerkes, z.B. mit der Verbindung von TX-Elementen über die beiden äußeren Doppelhelices. Die Stärke der Biegung kann über die in der Lösung vorhandenen Ionen beeinflusst werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß sich drei gleiche DX-Elemente mit einem langem Oligonukleotid zu einer Verzweigung zusammenlagern lassen.

6 Metallisierung

Eine denkbare Anwendung von metallisierter DNA sind Nanodrähte in mikroelektronischen Schaltkreisen. Damit dies wirtschaftlich sinnvoll ist, müssen die Eigenschaften des Drahtes zu den im Top-down-Verfahren hergestellten Leiterbahnen konkurrenzfähig sein. Die heute erreichten Strukturbreiten liegen bei einigen 10 nm. Daher sollte der Draht einen Durchmesser von 10 nm oder weniger aufweisen. Mit den bis jetzt bekannten Verfahren zur Metallisierung von DNA-Doppelsträngen können leitfähige Nanodrähte ab 7 nm Durchmesser erzeugt werden [88]. Um eine leitfähige Verbindung zu erzeugen, wird ein DNA-Doppelstrang zwischen zwei Kontaktpunkten gestreckt und kann dann metallisiert werden. Es sind nur lineare Verbindungen möglich. Der minimale Durchmesser für Nanodrähte, bei denen DNA-Netzwerke als Templat verwendet wurden, liegt bei ca. 40 nm [89]. Die Nutzung von steifen Strukturen ermöglicht den Aufbau von geraden Drähten ohne vorheriges Strecken der DNA. Es sind auch verzweigte Strukturen denkbar.

Vor diesem Hintergrund werden im folgenden Wege gesucht, Drähte mit Durchmessern unter 10 nm zu erzeugen, bei welchen der Verlauf durch ein Templat vorgegeben ist. Die vorgegebene Struktur darf durch die bei der Metallisierung entstehenden, starken Veränderungen an der DNA [91] nicht verändert werden.

Eine Möglichkeit ist, die Steifigkeit der DNA-Netzwerke auszunutzen. Der Durchmesser der Doppelhelix von B-DNA beträgt 2 nm. Um Template mit weniger als 10 nm Breite zu erzeugen, sind in einem DNA-Netzwerk maximal vier Helices nebeneinander möglich. Dadurch sind die Möglichkeiten für den Netzwerkaufbau jedoch stark eingeschränkt.

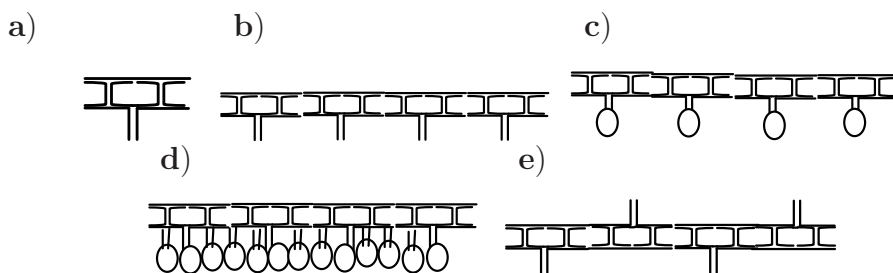


Abbildung 84: Schematischer Aufbau von Clusterketten mit dem DX-Element. (a) Einzelnes Element. (b) Kette, Anhang auf einer Seite angeordnet. (c) Kette mit einzelnen Metallclustern. (d) Bei einer dichten Anordnung der Cluster sind Drähte möglich. (e) In den Versuchen verwendete DX-Kette, die Anhänge sind abwechselnd nach oben und unten angeordnet.

Eine weitere Möglichkeit, Veränderungen an einem DNA-Netzwerk zu vermeiden, ist die Metallisierung selektiv "neben" dem Netzwerk stattfinden zu lassen. Das den Verlauf des Drahtes vorgebende Netzwerk soll während der Metallisierung nicht beeinflusst werden. Eine schematische Darstellung, wie ein solches Netzwerk aussehen kann, wird in Abbildung 84 gezeigt. In Abbildung 84a ist ein einzelner Baustein, ein DX-Element mit einem Fortsatz, dargestellt. Die DX-Elemente können sich zu Ketten zusammenlagern, welche dann in regelmäßigen Abständen Fortsätze aufweisen (Abbildung 84b). Die Idee ist nun, den Baustein so zu gestalten, daß nur die Fortsätze aktiviert und metallisiert werden. Nach der Metallisierung entsteht eine Clusterkette (Abbildung 84c). Bei einer dichten Abfolge von Fortsätzen sind sich berührende Cluster und somit leitfähige Drähte denkbar (Abbildung 84d).

Ein zum Aufbau solcher Netzwerke verwendbarer Baustein besteht aus zwei Teilen, an welche teilweise gegensätzliche Forderungen gestellt werden. Der strukturbildende Teil, in Abbildung 84 das DX-Element, legt den Zusammenbau der Bausteine fest und darf während der Metallisierung nicht beeinflusst werden. An dem anderen Teil, dem Fortsatz, soll ein Clusterwachstum bei der Metallisierung stattfinden.

Für eine Gestaltung des Fortsatzes sind verschiedene Möglichkeiten denkbar. Eine erste Strategie ist es, die Clusterbildung am Fortsatz ablaufen zu lassen. Eine derartige Gestaltung ist z.B. mit funktionellen Gruppen, welche Elektronen abgeben können, oder bereits aktivierter DNA erreichbar. Weiterhin ist denkbar, die DNA-Sequenz des Fortsatzes so zu gestalten, daß hier eine bevorzugte Aktivierung bzw. Clusterbildung stattfindet. Eine andere Strategie ist, direkt einen Keim, z.B. über metallische Partikel, an der Stelle der Fortsatzes zu platzieren. Wenn die Partikel zu einem durchgehenden Draht wachsen sollen, müssen diese kleiner als der angestrebte Durchmesser des Drahtes sein.

Die Möglichkeiten zur Gestaltung des strukturbildenden Teiles des Bausteins hängen im wesentlichen davon ab, wie gut sich der Fortsatz metallisieren läßt. An nicht aktivierter DNA findet fast keine Clusterbildung statt [19]. Ist eine Metallisierbarkeit des Fortsatzes ohne vorherige Aktivierung möglich, gibt es daher für die Gestaltung des Bausteins keine Einschränkungen. Ist hingegen eine Aktivierung des Fortsatzes erforderlich, muß eine solche im strukturbildenden Teil des Bausteins verhindert werden. Dieses Konzept erfordert eine gezielte Verhinderung der Metallisierung von DNA in bestimmten Bereichen. Eine gezielte Metallisierung von Bereichen der DNA wurde bisher von Keren et al. [92] durchgeführt. Ein weiterer

denkbarer Weg ist, über eine gezielte Gestaltung der DNA-Sequenz Stellen für eine bevorzugte Aktivierung bzw. Clusterbildung zu vermeiden.

Zusätzlich zur Gestaltung des Netzwerkes kann versucht werden, dieses durch Immobilisierung an einer Oberfläche zu stabilisieren.

6.1 DNA-Netzwerk für die Metallisierung

Ein Netzwerk, welches nur aus DNA besteht, hat den Vorteil einer einfachen Herstellung. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein Baustein gestaltet, bei dem nur über die Basensequenz Bereiche für eine bevorzugte bzw. weniger bevorzugte Aktivierung entstehen sollen. Dieser Baustein ist in Abbildung 85 dargestellt. Er besteht aus einem DX-Element, an dem an der Seite ein doppelsträngiger Fortsatz angebracht ist. Das DX-Element, ohne den Fortsatz, ist in [45] veröffentlicht und bildet den strukturbildenden Teil.

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur DNA-Metallisierung [84] ist in Kapitel 2 beschrieben und bietet zwei Ansatzpunkte für eine sequenzspezifische Metallisierung. Die erste Möglichkeit zur Gestaltung eröffnet sich über den GC-Gehalt. Während der Aktivierung findet die Anbindung von Pt-Komplexen zuerst an den Guaninbasen statt, wodurch die Anbindung der Komplexe an DNA mit hohem GC-Gehalt schneller verläuft [93]. Der Fortsatz wurde deshalb mit einem GC-Gehalt von 80% entworfen, während er beim DX-Element 50% beträgt. Günstig wäre ein deutlich geringerer GC-Gehalt im DX-Element. Dann sinkt allerdings die Schmelztemperatur der DNA und der Baustein wird thermisch weniger stabil.

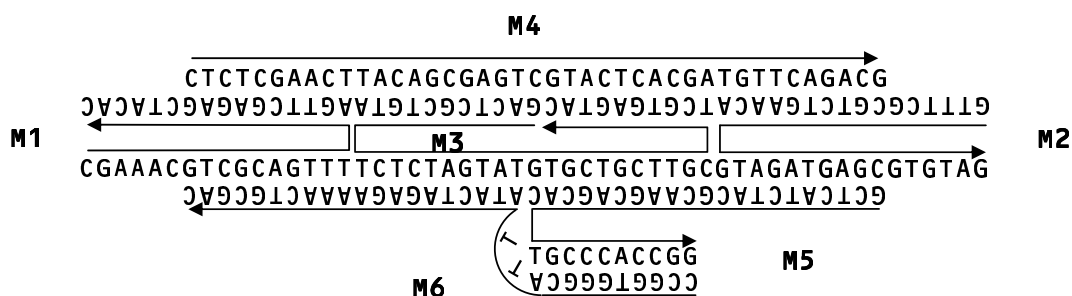


Abbildung 85: DX-Element mit einem an der Seite abstehendem Abschnitt. Der abstehende Abschnitt hat einen GC-Gehalt von 80% und weist einen hohen Anteil an GG-Schritten auf. Im restlichen DX-Element liegt der GC-Gehalt bei 50% und es sind keine GG-Schritte vorhanden.

Eine zweite Möglichkeit zur Gestaltung bieten benachbarte Guaninbasen. Ein

an zwei gestapelten Guaninbasen (GG-Schritt) angebundener Pt-Komplex hat eine höhere Elektronenaffinität als ein an nur einer Base angebundener Komplex [19]. Beim Start der Reduktion bilden die an GG-Schritte angebundene Pt-Komplexe daher eine zur Clusterbildung bevorzugte Stelle. Untersuchungen an *cis*-Diammin-dichloroplatin(II) zeigen, daß die Anbindung von Pt(II)-Komplexen an zwei hintereinander auf demselben Einzelstrang liegenden Guaninbasen gegenüber der Bildung von Interstrang-Verbindungen bevorzugt ist [102]. Für das Design des Bausteins wird ein solches Verhalten auch für die hier verwendeten und ähnlich aufgebauten $\text{Pt}(\text{Cl}_4)^{2-}$ -Komplexe angenommen. Der Fortsatz wurde daher mit einer hohen Anzahl von GG-Schritten gestaltet. Bei der Berechnung der Basenbelegung des strukturbildenden Teiles hingegen wurden zwei aufeinander folgende Guaninbasen in einem Oligonukleotid verboten. Die Basenbelegung wurde mit dem SEED Programm berechnet, welches mit den Criton-Regeln arbeitet. Durch das Verbot von GG-Schritten im DX-Element reduziert die Anzahl der in der Basensequenz zulässigen Critons. Um dies zu kompensieren, wurde die Critonlänge um eine Base erhöht.

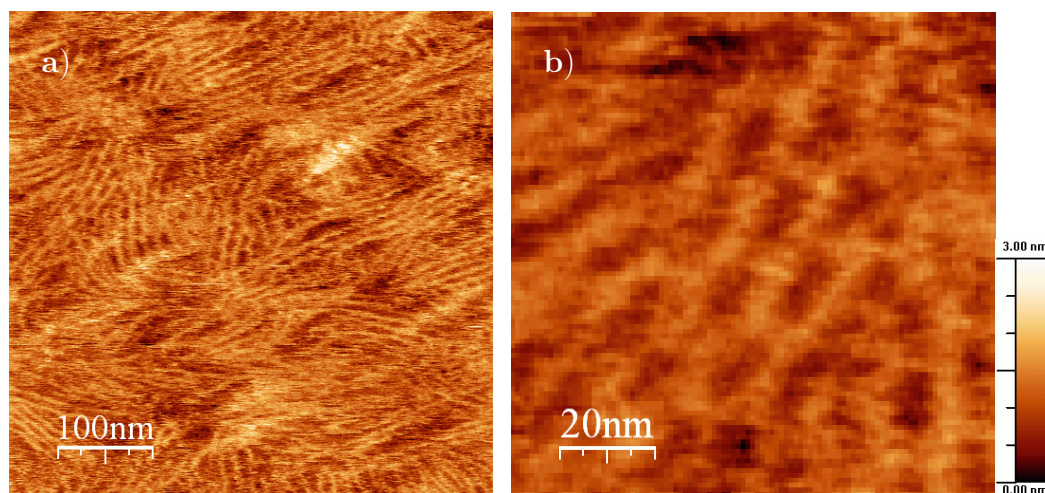


Abbildung 86: AFM-Abbildungen von dem zur Metallisierung verwendeten Netzwerk. (a) Die seitlichen Ansätze sind im Bild deutlich sichtbar. (b) Der Bildausschnitt zeigt einen Bereich mit regelmäßiger Anordnung der Ketten.

Der Fortsatz enthält am Übergang zum DX-Element zwei ungepaarte T-Basen, um eine durchgehende Basenstapelung im DX-Element zu ermöglichen. Bei der Zusammenlagerung mehrerer DX-Elemente entsteht das in Abbildung 84e schematisch dargestellte Netzwerk. Findet eine Clusterbildung nur am Fortsatz statt und

bleibt der Rest des Netzwerkes völlig unbeeinflusst, bilden sich einzelne Cluster links und rechts vom DX-Element. Eine selektive Metallisierung wäre an einer solchen Struktur sehr gut nachweisbar.

In Abbildung 86 ist das für die Metallisierung verwendete Netzwerk in der AFM-Abbildung zu sehen. Dieses Netzwerk besteht aus einer Kette von DX-Elementen, die seitliche Fortsätze aufweisen. In den AFM-Abbildungen sind lineare Strukturen zu sehen, von welchen abwechselnd nach beiden Seiten Fortsätze abstehen. Die seitlichen Fortsätze wirken als Abstandshalter zwischen den Ketten. Ähnlich wie bei den DX-Ketten ohne seitliche Fortsätze (Abbildung 56) haben sich auch hier geordnete Bereiche gebildet (Abbildung 86b). Durch die versetzte Anordnung der Fortsätze an der Kette haben diese Bereiche das Aussehen einer Ziegelsteinmauer. Der theoretische Wert für die Abstände der Fortsätze beträgt 16,2 nm. Durch ein Driften der Probe liegen die Abstände in der Abbildung bei 11 nm.

6.2 Aktivierung von DNA in Salzlösungen

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur DNA-Metallisierung [19] wurde bisher mit in Wasser gelöster λ -DNA durchgeführt. Die aus kurzen DNA-Oligonukleotiden aufgebauten Netzwerke sind in Wasser jedoch nicht stabil. Um sie zu stabilisieren, ist eine gewisse Salzkonzentration in der Lösung erforderlich. Eine Untersuchung, ob Salze in der Lösung die Aktivierung oder Reduktion beeinflussen, wurde in [91] durchgeführt. Damit die Aktivierung nicht beeinflusst wird, darf das Salz keine Reaktion mit den Pt-Komplexen zeigen. Bei fast allen untersuchten Salzen wurden eine Reaktion mit der K_2PtCl_4 -Lösung festgestellt. Allein bei Na_2SO_4 wurde keine Reaktion mit Pt-Komplexen während der Aktivierung festgestellt. Bei der anschließenden Reduktion kam es allerdings zur Bildung von Agglomeraten, was eine Zerstörung der durch die DNA vorgegebenen Struktur bedeutet.

Für die Metallisierung muß eine Salzlösung gefunden werden, bei der die DNA-Netzwerke bei Raumtemperatur stabil sind, eine Aktivierung der DNA möglich ist und die anschließende Reduktion Cluster erzeugt, die nicht agglomerieren. Eine Reaktion von Salzen mit den Pt-Komplexen der Lösung hingegen ist als weniger kritisch anzusehen. Es ist ein verändertes Anbindungsverhalten der Komplexe an die DNA während der Aktivierung zu erwarten, was eine Neubestimmung der Aktivierungszeit erforderlich macht.

Zur Bestimmung des Einflusses von Salzen auf die Metallisierung wurde in dieser

Arbeit λ -DNA in Natriumcitrat und Magnesiumacetat metallisiert. Für die DNA-Hybridisierung werden im allgemeinen zweiwertige Mg-Ionen verwendet. Bei der Verwendung von 10 mM MgCl_2 würden die Cl^- -Ionen das Hydrolysegleichgewicht der K_2PtCl_4 -Lösung während der Aktivierung so weit verschieben, daß für eine Aktivierung der DNA extrem lange Zeiten benötigt würden. Aus diesem Grund wird Magnesiumacetat verwendet. Um die Netzwerke während der Aktivierung zu stabilisieren, erscheint auch Natriumcitrat geeignet. Natriumcitrat wirkt als *capping agent*, was bei einer Zugabe direkt vor der Metallisierung zu einer Clusterstabilisierung führt [84]. Dadurch ist bei der Reduktion eine geringere Neigung zur Bildung von Agglomeraten vorhanden.

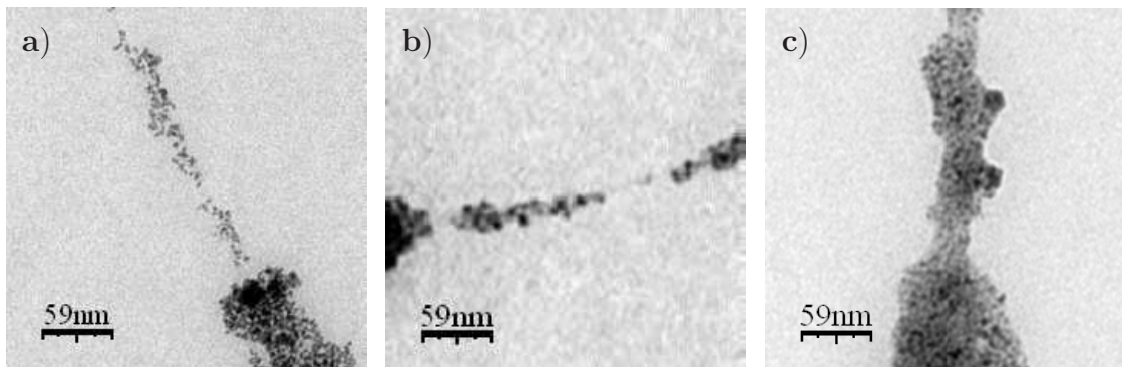


Abbildung 87: TEM-Abbildungen von in (a) H_2O , (b) 10 mM Natriumcitrat und (c) 5 mM Magnesiumacetat metallisierter λ -DNA.

Die DNA in Abbildung 87 wurde 20 Stunden aktiviert und dann reduziert. Bei der Betrachtung der metallisierten DNA im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) sind nur die Metallcluster sichtbar, da die DNA selbst zu wenig Kontrast liefert. Bei der in H_2O aktivierten und reduzierten λ -DNA findet eine heterogene Clusterbildung statt. Ein Teil der Cluster liegt als Clusterkette vor, der andere Teil agglomeriert. In Natriumcitrat findet auch eine heterogene Clusterbildung statt. Die Cluster bilden sich nicht entlang der gesamten DNA. Das läßt auf eine unvollständige Aktivierung der DNA schließen. Wie bei der Aktivierung in H_2O findet eine teilweise Agglomeration der Cluster statt. Die Metallisierung in Magnesiumacetat führt zu einer deutlich stärkeren Agglomeration. Für die folgenden Versuche wird deshalb Natriumcitrat zur Stabilisierung der Netzwerke verwendet.

6.3 Metallisierung der Netzwerke

Für eine Metallisierung von λ -DNA in Wasser optimale Bedingungen liegen bei einer Aktivierung von 20 Stunden mit 1 mM K_2PtCl_4 und 5 $\mu g/ml$ DNA vor [84]. Das K_2PtCl_4 wird aus einer 10 mM Stammlösung, welche 24 Stunden gealtert ist, verwendet. Die Reduktion erfolgt mit 1 mM DMAB. Für die Metallisierung des DNA-Netzwerkes müssen die optimalen Bedingungen neu bestimmt werden, da die Aktivierung in einer Salzlösung stattfindet und jeweils nur die Fortsätze an den DX-Elementen metallisiert werden sollen. Durch Wechselwirkungen der Ionen mit den Pt-Komplexen ist auf der einen Seite eine verlangsamte Anbindung der Pt-Komplexe an die DNA zu erwarten. Andererseits ist ein Ziel hier die Keimbildung an bestimmten Punkten (GG-Schritte am Fortsatz des DX-Elementes). Da bei einer langen Aktivierungszeit an der gesamten DNA Keimbildungszentren geschaffen werden, sollte die Aktivierungszeit entsprechend kurz sein. Um einen großen Zeitbereich zu erfassen, wurden Experimente mit einer Aktivierungszeit von 4,5 Stunden, 25 Stunden und einer Woche durchgeführt. Bei einer Aktivierungszeit von einer Woche sollten an der gesamten DNA Keimbildungszentren vorhanden sein.

Da jeweils nur die Fortsätze an den DX-Elementen metallisiert werden sollen, erscheint auch eine Verringerung der Pt-Komplexe in der Lösung sinnvoll. Dem zu metallisierenden, 10 bp langem Fortsatz stehen 94 bp des restlichen DX-Elementes gegenüber, welche nicht metallisiert werden sollen. Das entspricht einem Anteil von 10% aller Basen, die metallisiert werden sollen. Es wurden deshalb Experimente mit K_2PtCl_4 -Konzentrationen von 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM durchgeführt.

Das K_2PtCl_4 wurde aus einer 20 Stunden bei 4°C gealterten, 15 mM Stammlösung verwendet. Die DNA-Konzentration betrug bei allen Experimenten 5 $\mu g/ml$. Die Lösung enthält 10 mM Na-Citrat zur Stabilisierung des Netzwerkes. Die Reduktion der Platinkomplexe erfolgte durch Zugabe von DMAB auf 2 mM. Die DNA wurde in der Lösung metallisiert und anschließend im TEM betrachtet.

Bei den Versuchen, in denen die DNA mit 1 mM K_2PtCl_4 aktiviert wurde, erhält man hauptsächlich homogen gebildete Agglomerate. Bei einer Aktivierungszeit von einer Woche befinden sich neben den Agglomeraten einzelne Cluster auf der Probe.

Die mit 0,5 mM K_2PtCl_4 aktivierten Proben weisen deutliche Unterschiede bezüglich der Aktivierungszeit auf. Bei 4,5 Stunden Aktivierungszeit sind Agglomerate vorhanden. Bei 25 Stunden sind sowohl homogen gebildete Agglomerate als auch Clusterketten vorhanden (Abbildung 88a).

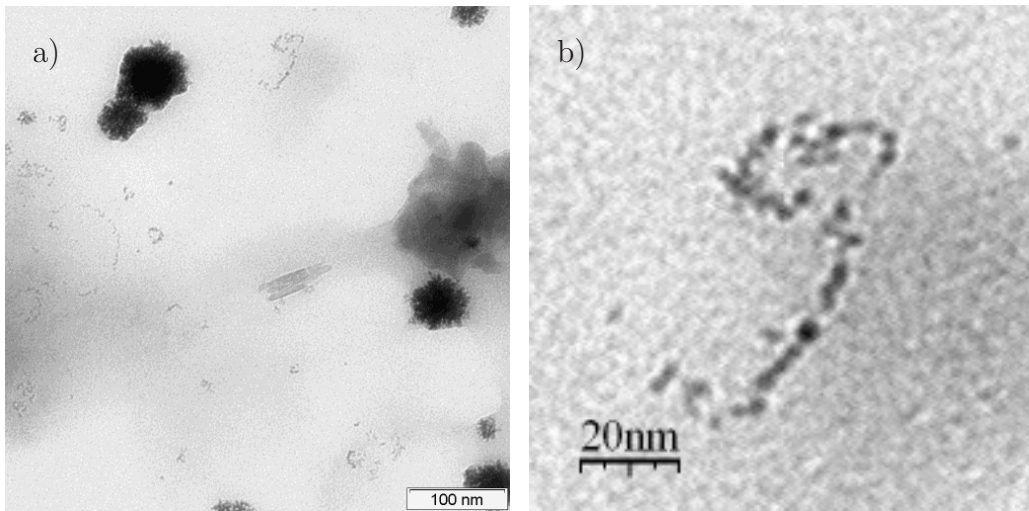


Abbildung 88: TEM-Abbildungen von metallisiertem DNA-Netzwerk. Es wurde 25 Stunden in 0,5 mM K_2PtCl_4 aktiviert. (b) Ausschnitt aus (a) mit einer Clusterkette. Die Cluster der Kette sind voneinander unterscheidbar und haben Durchmesser von 3 bis 5 nm.

Nach einer Woche Aktivierungszeit werden bei der Metallisierung Clusterketten gebildet (Abbildung 89a). Diese sind 3 bis 5 nm breit und häufig geknickt. Dieses Zusammenfallen ist teilweise so stark, daß Agglomerate gebildet werden. Andererseits gibt es einzelne, bis zu 20 nm lange, gerade Stränge. Die Cluster der Ketten stoßen teilweise zusammen und sind nicht wie in Abbildung 88b voneinander unterscheidbar.

Auch bei einer Aktivierung mit einer K_2PtCl_4 -Konzentration von 0,1 mM sind große Unterschiede bezüglich der Aktivierungszeit feststellbar. Bei 4,5 Stunden Aktivierungszeit sind Agglomerate vorhanden. Bei 25 Stunden Aktivierungszeit haben sich einzelne Cluster gebildet, welche an einigen Stellen agglomeriert sind (Abbildung 89b). Nach einer Woche Aktivierungszeit sind auf den TEM-Abbildungen dunklere Bereiche sowie vereinzelte Agglomerate zu finden.

Aus den Versuchen wird ersichtlich, daß eine K_2PtCl_4 -Konzentration von 1 mM so hoch ist, daß eine homogene Keimbildung stattfindet. Bei einer Aktivierungszeit von 4,5 Stunden werden nicht genügend Keimbildungszentren an der DNA gebildet, so daß bei den untersuchten K_2PtCl_4 -Konzentrationen ebenfalls eine homogene Keimbildung dominiert.

Bei einer 25 Stunden langen Aktivierung mit 0,5 mM K_2PtCl_4 bilden sich Clusterketten und Agglomerate. An der DNA wird während der Aktivierung eine

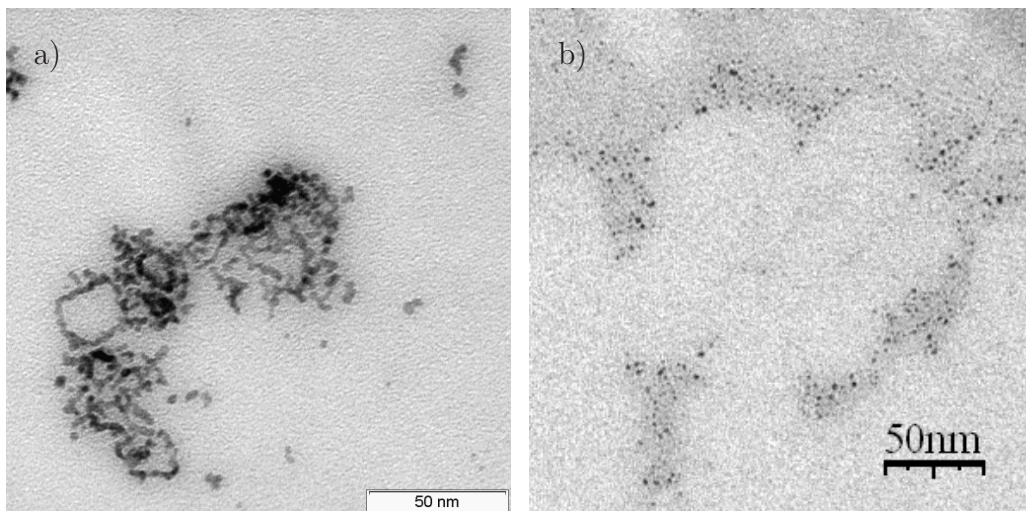


Abbildung 89: TEM-Abbildungen von metallisiertem DNA-Netzwerk. (a) Bei einer Aktivierung von 1 Woche in 0,5 mM K_2PtCl_4 werden Clusterketten gebildet. (b) Bei einer Aktivierung von 25 Stunden in 0,1 mM K_2PtCl_4 werden 2 bis 5 nm große Cluster gebildet.

ausreichende Anzahl von Keimbildungszentren geschaffen, um bei der Reduktion auch Clusterketten zu bilden. Die unterscheidbaren Cluster der Clusterketten bei 25 Stunden Aktivierungszeit sind ein Hinweis darauf, daß die Keimbildungszentren nicht an der gesamten DNA, sondern nur an bestimmten Stellen entstehen. Nach einer Aktivierung von Woche findet eine vollständig heterogene Clusterbildung statt. Die Cluster sind nicht mehr unterscheidbar, was auf Keimbildungszentren an der gesamten DNA schließen läßt. Eine Möglichkeit für das häufige Knicken ist, daß die Energie der beim Zusammenwachsen der Cluster entstehenden Korngrenzen minimiert wird. Dies wird vermutlich durch eine Verdrehung der Cluster gegeneinander erreicht, was zu den häufigen Knicken führt. Die K_2PtCl_4 -Konzentration von 0,5 mM für eine rein heterogene Metallisierung entspricht der Hälfte der bei λ -DNA verwendeten Konzentration. Dies ist erklärbar, wenn man Ketten von DX-Elementen als zwei nebeneinander liegende DNA-Doppelstränge auffaßt. Da an einer Stelle des Netzwerkes nur ein Cluster entstehen kann, bildet sich die halbe Cluster-Anzahl im Vergleich zu zwei einzelnen Strängen.

Bei 5 μ g/ml DNA und 0,1 mM Pt-Komplexe in der Lösung ergibt sich ein Komplex-zu-Basenpaar-Verhältnis von 12. Bei einer nach einer Woche vollständigen Aktivierung der DNA binden drei Pt-Komplexe an ein Basenpaar. Die verbleibende Pt-Menge verteilt sich auf viele Keimbildungszentren und ist zu gering, um Cluster

zu bilden. In TEM erzeugen die an der DNA angebundenen Pt-Komplexe einen schwachen Kontrast, welcher als dunkler Bereich erscheint. Bei einer Aktivierung von 25 Stunden werden weniger Keimbildungszentren an der DNA geschaffen. Dadurch können vor allem einzelne, separierte Cluster entstehen. Diese bilden jedoch keine regelmäßigen Strukturen.

6.4 Metallisierung eines immobilisierten DNA-Netzwerkes

Bei der Metallisierung in Lösung konnte ein Knicken der Ketten nicht verhindert werden. Daher wurde eine weitere Methode getestet, mit welcher die Metallisierung von λ -DNA mit Silber gezeigt wurde [20]. Bei dieser wird die DNA auf eine Glimmeroberfläche mit Mg^{2+} -Ionen immobilisiert und mit $AgNO_3$ aktiviert. Durch eine anschließende Bestrahlung mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm erfolgt eine Reduktion der Ag^+ -Ionen an der DNA. Es entstehen Clusterketten mit Clustergrößen von 1,5 bis 3 nm. In diesem Verfahren erfährt die DNA eine zusätzliche Stabilisierung durch die Immobilisierung auf dem Glimmer. Es ist denkbar, daß dadurch auch ein Knicken der aus den DX-Elementen gebildeten Ketten verhindert wird.

Die Methode kann auch zur Metallisierung mit $Pt(NO_3)_2$ verwendet werden [103]. In Abbildung 90a ist auf diese Weise metallisierte λ -DNA zu sehen. Es haben sich Clusterketten an der DNA gebildet. In Abbildung 90b wurden die Ketten aus DX-Elementen metallisiert. Im Ergebnis ist die Oberfläche fast vollständig mit Clustern belegt. Die ursprüngliche Struktur von nebeneinander liegenden Ketten, wie sie in Abbildung 86 auf Seite 104 zu sehen ist, ist allerdings nicht mehr erkennbar.

Um abzuklären, ob die Ketten aus DX-Elementen erhalten bleiben, wurde die Aktivierung in situ am AFM untersucht. In Abbildung 91 sind AFM-Abbildungen des Netzwerkes vor und nach Zugabe von 10 mM $Pt(NO_3)_2$ zu sehen. Vor der Zugabe der Platinsalzlösung sind lineare, ca. 2 nm hohe DNA-Strukturen vorhanden. Danach sind 3 bis 5 nm hohe, einzeln liegende Strukturen zu finden, was bedeutet, daß mehrere DNA-Stränge übereinander liegen oder Teile des Netzwerkes vom Boden abstehen. Die lineare Struktur ist nicht mehr erkennbar. Das Netzwerk wird vermutlich am Anfang der Aktivierung, bei der Zugabe von 10 mM $Pt(NO_3)_2$, aufgelöst.

Im Unterschied zu λ -DNA ist das DNA-Netzwerk aus kurzen Oligonukleotiden aufgebaut. Die Zugabe des $Pt(NO_3)_2$ führt offensichtlich zum teilweisen Aufbrechen

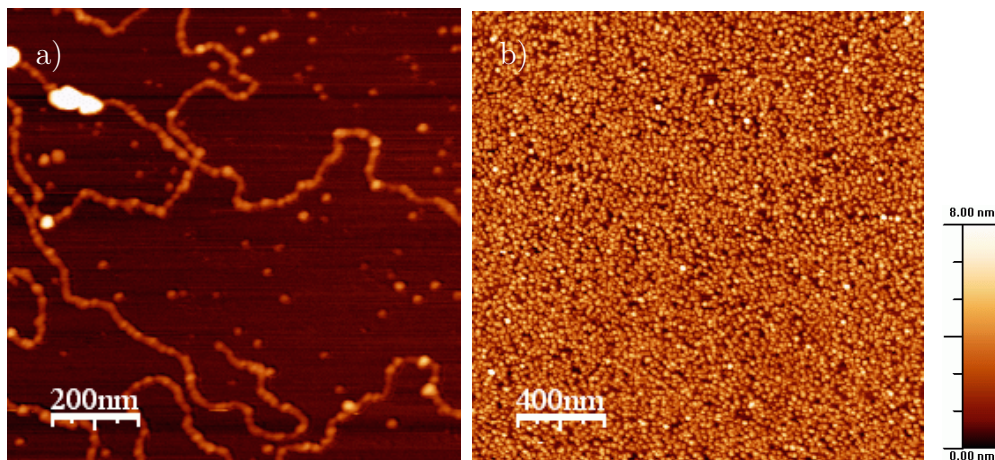


Abbildung 90: AFM-Abbildung an Luft von mit $\text{Pt}(\text{NO}_3)_2$ metallisierter DNA. Es wurde eine 10 mM $\text{Pt}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung für die Aktivierung verwendet. (a) An λ -DNA haben sich 1,5 bis 3 nm große Cluster gebildet. Vereinzelt sind größere Cluster oder nicht an der DNA gebildete Cluster entstanden. Abb. von Christiane Erler [103]. (b) Nach der Metallisierung des Netzwerkes ist die Oberfläche fast vollständig mit 3 bis 6 nm hohen Clustern belegt.

der Wasserstoffbrückenbindungen in der DNA. Bei der rund 48 kbp langen λ -DNA führt das Aufschmelzen einiger Basen zu keinen gravierenden Änderungen. Das Aufschmelzen der sechs Basen langen *sticky ends* hingegen führt zur Zerstörung des Netzwerkes. Die nun nicht mehr verbundenen DX-Elemente können schon durch geringe Kräfte verschoben werden, bleiben aber auf der Oberfläche. Dadurch wird die Oberfläche bei der Metallisierung gleichmäßig mit Clustern belegt, ohne daß die lineare Struktur noch vorhanden ist. Beim Scannen im AFM hingegen wirken höhere Kräfte, so daß einzelne DX-Elemente der aktivierten DNA abgelöst werden können. Gleichzeitig müssen noch andere Wechselwirkungen durch das $\text{Pt}(\text{NO}_3)_2$ stattfinden, welche die höheren DNA-Strukturen verursachen.

In diesem Kapitel wurden Untersuchungen mit der Fragestellung durchgeführt, ob dich Drähte mit Durchmessern kleiner als 10 nm mit vorgegebenem Verlauf erzeugen lassen. Es wurde ein Netzwerk entworfen und hergestellt, bei dem für eine unterschiedliche Metallisierbarkeit die bevorzugte Aktivierbarkeit von Guaninbasen und die Clusterbildung an GG-Schritten genutzt werden sollen. Die erfolgreiche Herstellung wurde mit AFM-Abbildungen nachgewiesen. Für die Metallisierung wurden zwei bisher mit λ -DNA durchgeführten Methoden getestet.

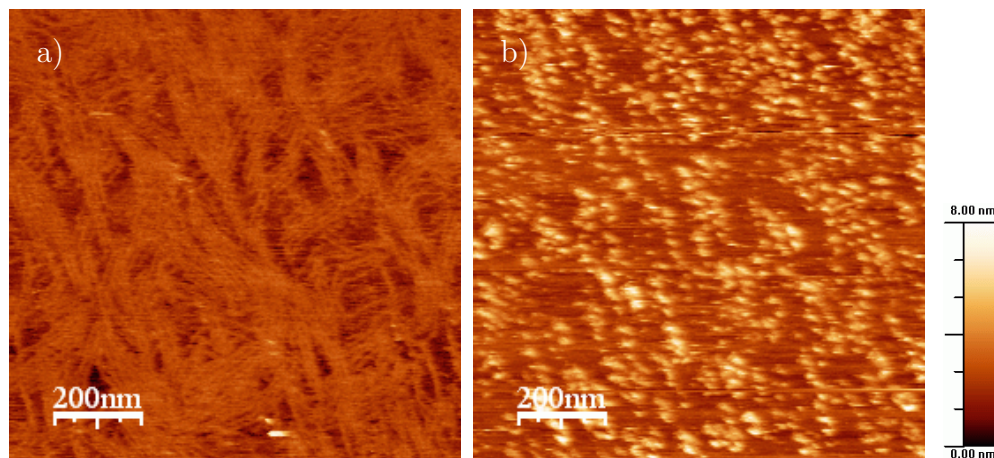


Abbildung 91: AFM-Abbildungen (a) DNA-Netzwerk vor der Aktivierung. (b) DNA-Netzwerk nach Zugabe von 10 mM $\text{Pt}(\text{NO}_3)_2$ bei der Aktivierung. Die lineare DNA-Struktur ist nicht mehr vorhanden.

Bei der ersten Methode wird die λ -DNA in H_2O mit K_2PtCl_4 aktiviert und anschließend mit DMAB reduziert. Die Übertragung des Verfahrens für Netzwerke ist möglich, wenn die Lösung Natriumcitrat für die Stabilisierung des Netzwerkes enthält. Bei den Versuchen mit verschiedenen K_2PtCl_4 -Konzentrationen und Aktivierungszeiten wurden bei drei Versuchsbedingungen Clusterketten bzw. einzelne Cluster mit Clustergrößen von 3 bis 5 nm gebildet. Bei einer Aktivierungszeit von einer Woche wird das gesamte Netzwerk aktiviert. Bei einer Aktivierung in 0,5 mM K_2PtCl_4 ist dabei eine vollständig heterogene Clusterbildung an der DNA möglich. Die durch die Kette aus DX-Elementen vorgegebene, lineare Struktur wird bei der Metallisierung jedoch häufig geknickt. Die Cluster sind offensichtlich teilweise verbunden. Im Vergleich zu metallisierter λ -DNA [19] sind die Veränderungen an der Struktur hier deutlich stärker. Bei einer Aktivierungszeit von 25 Stunden mit 0,5 mM K_2PtCl_4 entstehende Clusterketten weisen deutlich weniger Knicke auf als bei einer Woche Aktivierungszeit. Wahrscheinlich wurde hier nur ein Teil der DNA aktiviert. Es läßt sich allerdings weder bestätigen noch ausschließen, daß die Clusterbildung spezifisch am Fortsatz stattgefunden hat. Bei einer Aktivierungszeit von 25 Stunden bilden sich mit 0,1 mM K_2PtCl_4 einzelne Cluster. Ketten mit Clustern in regelmäßigen Abständen lassen sich nicht eindeutig identifizieren. Damit kann auch hier kein Nachweis erbracht werden, daß die Metallisierung spezifisch am Fortsatz stattfindet. Eine naheliegende Möglichkeit ist, daß regelmäßige Strukturen

durch ein häufiges Knicken der DX-Kette während der Metallisierung verlorengehen.

Die Versuche mit der zweiten Methode verdeutlichen das Problem der Veränderung der durch das Netzwerk vorgegebenen Struktur. Das immobilisierte Netzwerk wird offensichtlich bei der Zugabe von $\text{Pt}(\text{NO}_3)_2$ zerstört. Trotzdem läßt sich eine dichte Belegung der Oberfläche mit 3 bis 6 nm großen Clustern erreichen.

Eine Gemeinsamkeit bei den Versuchen ist, daß das Netzwerk bei der Metallisierung geknickt oder zerstört wird. Eine vorgegebene Struktur wird dadurch nicht erhalten. Das verhindert auch den Nachweis einer spezifischen Metallisierung am Fortsatz. Zur erfolgreichen Anwendung der Methode ist daher ein stabileres Netzwerk erforderlich. Das bei langer Aktivierungszeit festgestellte stärkere Knicken als bei λ -DNA wird möglicherweise durch die im Netzwerk häufig vorhandenen "Einzelstrangbrüche" begünstigt. Deren Anzahl kann über ein Design mit längeren Doppelstrangabschnitten oder über eine Ligation der Oligonukleotide verringert werden. Durch längere Doppelstrangabschnitte erhöht sich auch die Schmelztemperatur des Netzwerkes. Damit läßt sich zum einen eine Zerstörung des Netzwerkes verhindern, zum anderen eröffnet sich hier die Möglichkeit, den GC-Gehalt in dem die Struktur vorgebenden Teil des Bausteins weiter zu senken. Ein stabileres Netzwerk ist auch über größere Bausteine bzw. zweidimensionale Netzwerke denkbar. Eine weitere Ursache für ein Knicken kann darin bestehen, daß sich Metallcluster mit DNA umwickeln können [104]. Ein am Fortsatz gebildeter Cluster könnte somit das DX-Element beeinflussen. Verhindert werden könnte dies mit einem längeren Fortsatz, an dem die Cluster in einigem Abstand zum DX-Element entstehen.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedenartige Möglichkeiten für die Gestaltung von selbstassemblierenden DNA-Netzwerken untersucht. In diesem modernen Gebiet wird für die Selbstassemblierung der Strukturen die bei der DNA vorhandene Eigenschaft der Hybridisierung komplementärer DNA-Einzelstränge zu einem Doppelstrang genutzt. Für den Aufbau der Netzwerke werden synthetisch hergestellte DNA-Oligonukleotide verwendet. Deren Basensequenz ist so gestaltet, daß eine Selbstassemblierung zum vorher definierten Netzwerk stattfindet.

Für die Gestaltung eines Netzwerkes gibt es verschiedene Zielstellungen, wie z.B. der Aufbau einer geometrischen Struktur oder die Erzeugung eines Templates mit funktionellen Gruppen an bestimmten Positionen. Der erste Schritt bei der Entwicklung eines Netzwerkes ist es, einen geeigneten Entwurf zu erstellen. In dieser Arbeit wurde, ausgehend von einer konkreten Zielstruktur, eine Zerlegung dieser in einen oder mehrere Bausteine vorgenommen. Die einzelnen Bausteine sind über *sticky ends* verbunden und bilden sich teilweise wiederholende Einheiten im DNA-Netzwerk. Die Bausteine wiederum sind aus einzelnen Oligonukleotiden aufgebaut. Beim Entwurf werden die Längen der Oligonukleotide und die sich bei der Hybridisierung bildenden Doppelstrangabschnitte festgelegt. Meist sind verschiedene Lösungen zum Erreichen einer Zielstruktur möglich. Anschließend wird die Basensequenz der Oligonukleotide mit Hilfe von Computerprogrammen festgelegt.

Ein großer Vorteil beim Aufbau von DNA-Netzwerken ist die Möglichkeit, vorhandene Bausteine abzuändern und zum Aufbau von weiteren Netzwerken zu nutzen. In dieser Arbeit werden dazu einige grundlegende Methoden erläutert, wie die Zusammenlagerung von Bausteinen gestaltet werden kann.

Die praktische Realisierung eines entworfenen Netzwerkes erfolgt über die Hybridisierung der Oligonukleotide. Die wichtigsten Methoden zur Untersuchung eines Netzwerkes sind die Gelelektrophorese und die Atomkraftmikroskopie in der Flüssigkeit.

Ein bisher noch nicht gelöstes Problem ist die Fragestellung, wie sich kleine Strukturen wie DNA-Netzwerke in einem um Größenordnungen größeren Umfeld plazieren lassen. Ein denkbarer Weg dahin ist, die kleinen Strukturen zu vergrößern. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Anlagerung von DNA-Doppelsträngen bis 2,4 μm Länge an ca. 10 nm große, hybridisierte Strukturen möglich ist. Auf diese Weise aufgebaute DNA-Verzweigungen sind so groß, daß sie

im Fluoreszenzmikroskop beobachtbar werden. Damit können in Zukunft Anbindungsexperimente von verzweigten DNA-Strukturen an Oberflächen in situ beobachtet werden.

In der Arbeit wurden verschiedenen Netzwerke aufgebaut und untersucht. Als Bausteine für die Netzwerke wurden DX-Elemente und 4x4-Kacheln verwendet. Ein DX-Element, welches ein eindimensionales Netzwerk bildet, läßt sich so umgestalten, daß ein zweidimensionales Netzwerk entsteht. Dazu sind nur geringe Änderungen am Grundbaustein notwendig. In der Arbeit wird an einem Baustein gezeigt, wie über das Vertauschen zweier *sticky ends* ein solcher Übergang möglich ist.

An 4x4-Kacheln kann man die Bildung von 100 bis 150 nm breiten Röhren, welche sich mit der Zeit in bis zu 1 mal 2,5 μm große, zweidimensionale Netzwerke umlagern, beobachten. Dieses Verhalten kann man anhand eines Modells zu Keimbildung und Keimwachstum erklären. Die Schlußfolgerung daraus ist, daß auch über die Hybridisierungsbedingungen die Ausbildung unterschiedlicher Netzwerke beeinflußt werden kann.

Ein weiterer Untersuchungsgegenstand in dieser Arbeit ist die Fragestellung, wie sich gezielt eine bestimmte Anzahl von DX-Elementen zusammenlagern läßt. Zwei Varianten, die Anzahl zu bestimmen, sind die Steuerung über unterschiedliche Basensequenz und die Steuerung über die Länge eines Oligonukleotides. Die Steuerung über die Länge eines Oligonukleotides erlaubt auch die Verbindung von gleichen DX-Elementen, während eine reine Steuerung über die Basensequenz DX-Elemente mit verschiedener Basensequenz erfordert. In einer praktischen Realisierung wurden bei der Zusammenlagerung von drei DX-Elementen Unterschiede in der Steifigkeit zwischen den Varianten festgestellt. Die Steuerung über die Basensequenz, bei der die DX-Elemente über drei kurze Oligonukleotide verbunden werden, weist eine geringe Steifigkeit auf. Strukturen, bei denen die Verbindung über ein durchgehendes Oligonukleotid erreicht wird, weisen eine höhere Steifigkeit auf. Dies kann nachteilig sein, z.B. wenn die Struktur ungleichmäßige Winkel aufweist. Bei Netzwerken, wo alle Winkel gleich sein müssen, kann der Winkel nicht mehr korrigiert werden.

Die hohe Steifigkeit bei der Verbindung von DX-Elementen mit einem durchgehendem Oligonukleotid wurde genutzt, um eine Zickzack-Struktur aufzubauen. Diese Struktur weist eine Periodenlänge von 56 nm auf und ist 45 nm breit.

Als neue Möglichkeit in der Gestaltung der geometrischen Struktur von Netzwerken wurde in dieser Arbeit die Biegung durch einen gebogenen DNA-Abschnitt wie A- und G-Trakt untersucht. Motivation zur Erzeugung einer Richtungsände-

rung mit gebogenen Abschnitten ist die Möglichkeit, die Richtung der Biegung in einem begrenzten Rahmen festzulegen. Dies ist bei einer Richtungsänderung über ungepaarten Basen oder eines Verzweigungspunktes nur über die Geometrie des restlichen Bausteins möglich. A- und G-Trakt weisen für die Netzwerkgestaltung negative Eigenschaften auf, welche zu Fehlpaarungen führen können. Zur Vermeidung von Fehlpaarungen während der Selbstassemblierung wurden Kriterien zur Auswahl von geeigneten Basensequenzen getroffen. Das sind die Verwendung von unterschiedlichen Basensequenzen bei mehreren A-Trakten in einem Baustein und die Nutzung von mehreren kurzen, biegenden Abschnitten statt eines langen.

In ersten Versuchen wurden A- und G-Trakte in DX-Elemente eingebaut. Es konnte gezeigt werden, daß der Aufbau kompletter Bausteine durch mögliche Fehlpaarungen nicht behindert wird. In einem Versuch sollte mit einer DX-Kette ein gebogenes, eindimensionales Netzwerk gebildet werden. Statt einer Biegung wurde allerdings eine erhöhte Steifigkeit der DX-Ketten festgestellt. Beim Einbau von A- und G-Trakten in die Verbindung von DX-Elementen konnte eine Biegung festgestellt werden. Bei der Untersuchung der Netzwerke wurde festgestellt, daß die gebogenen Abschnitte eine deutlich niedrigere effektive Biegung aufweisen als aus den in der Literatur vorhandenen Werten zu erwarten war. Als Ursache hierfür ist eine Wechselwirkung mit dem restlichem Netzwerk zu vermuten. Um diese zu vermeiden, ist eine räumliche Trennung der biegenden Abschnitte vom Rest des Netzwerkes denkbar. Eine Verstärkung der Biegung ist über längere A- und G-Trakte denkbar, wobei allerdings Fehlpaarungen vermieden werden müssen. Die Versuche zeigen, daß durch die gebogenen Abschnitte die Struktur des Netzwerkes verändert wird. Daraus ergibt sich der grundlegende Gedanke, die Basenstapelung von DNA-Doppelsträngen zukünftig stärker in die Netzwerkgestaltung mit einzu beziehen. Mit einem besseren Verständnis der Basenstapelung kann es in Zukunft möglich sein, genauere Vorhersagen über die Struktur zu treffen. Das ist nicht nur für die Erzeugung einer Biegung, sondern auch für eine zukünftige, nm-genaue Positionierung von Molekülen mit Hilfe von DNA-Templaten interessant. Es ist zu erwarten, daß sich mit der Einbeziehung der Basenstapelung ein neues Feld für die Bausteingestaltung eröffnet.

Ausgangspunkt für die Untersuchungen zur Metallisierung in dieser Arbeit war das Ziel, für Nanodrähte mit weniger als 10 nm Durchmesser den Verlauf über ein Templat vorzugeben. Das wesentliche Problem hierbei sind die schon aus anderen Untersuchungen bekannten, starken Veränderungen an der DNA während der

Metallisierung. Um dies zu umgehen, wurde eine Strategie entwickelt, die Metallisierung neben dem den Verlauf vorgebenden Teil eines DNA-Netzwerkes stattfinden zu lassen. Die Metallclusterbildung soll an aus der Struktur herausstehenden Fortsätzen stattfinden.

Für eine praktische Untersuchung wurde ein Netzwerk hergestellt, bei dem eine unterschiedliche Metallisierbarkeit über die Basenbelegung erzeugt werden soll. Genutzt wurde dazu die in anderen Untersuchungen ermittelte, bevorzugte Aktivierung von Guaninbasen und bevorzugten Keimbildung an GG-Schritten. Der Baustein für das Netzwerk wurde so gestaltet, daß das den Verlauf vorgebende DX-Element keine GG-Schritte und einen niedrigen GC-Anteil, der Fortsatz hingegen einen hohen GC-Anteil mit GG-Schritten aufweist. Die Bildung eines eindimensionalen Netzwerkes mit diesem Baustein wurde mit Atomkraftmikroskopie nachgewiesen.

Zur Metallisierung des Netzwerkes wurden zwei an λ -DNA entwickelte Methoden verwendet. Bei der ersten Methode findet die Metallisierung in der Lösung, bei der zweiten am immobilisierten Netzwerk statt. Mit beiden Verfahren lassen sich Clustergrößen unter 10 nm mit einem DNA-Netzwerk als Templat erzeugen, was Voraussetzung für einen entsprechend dünnen Draht ist. Die Vorgabe eines Verlaufes wurde jedoch durch häufiges Knicken bzw. die Zerstörung des Netzwerkes verhindert. In einem weiterentwickeltem Netzwerk müssen solche Veränderungen verhindert werden. Dies ist über eine Erhöhung der Stabilität des Netzwerkes denkbar. Neben den Veränderungen des Templates bei der Aktivierung werden offensichtlich beim Zusammenwachsen von Teilchen durch Rotation gegeneinander zusätzliche Knicke erzeugt. Ein Ansatz, um solche Knicke zu vermeiden, ist, durch eine Metallisierung in mehreren Schritten mit unterschiedlichen Metallen inkohärente Grenzflächen zu erzeugen.

Auch in Zukunft wird sich der Trend zu immer größeren und komplexeren Strukturen mit DNA-Netzwerken fortsetzen. Dabei wird die heute vorherrschende ausschließliche Nutzung der Basensequenz zur Verhinderung von Fehlpaarungen um weitere Möglichkeiten ergänzt werden. Die ersten Ansätze dazu sind bei den molekularen Maschinen aus DNA sichtbar.

Die Verwendung von DNA-Netzwerken als Templat ist für viele Anwendungen denkbar. Die Möglichkeit der dichten Belegung von Oberflächen mit wenigen nm großen Clustern läßt eine Anwendung für Katalysatoren interessant erschei-

nen. Bei DNA-Netzwerken wird vor der Herstellung definiert, welche Sequenzen verwendet werden. Das ermöglicht den Aufbau von Strukturen, die nur aus bestimmten Sequenzen bestehen. Solche Netzwerke bieten neue Möglichkeiten für die Erforschung von Sequenzabhängigkeiten bei der DNA-Metallisierung. In der Mikroelektronik sind Forschungen in Richtung einer gezielten Oberflächenstrukturierung interessant. Es könnten z.B. komplette Leiterbahnstrukturen über Selbstassemblierung von DNA abgebildet werden. Aus diesen können Transistoren ortsspezifisch platziert werden. Über eine Metallisierung werden Leiterbahnen zwischen diesen hergestellt. Dafür sind weitere Forschungsarbeiten notwendig.

A Anhang

A.1 Gelelektrophorese

Die in der Arbeit hergestellten Gele enthalten 8% bzw. 6% Acrylamid (37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid). Der Laufpuffer bestand aus 1xTBE und 12,5 mM MgCl₂. Die Gele liefen eine Stunde bei 12 V/cm. Die Gele wurden mit SYBR Green I (Molecular Probes) gefärbt.

A.2 DNA-Oligonukleotide

DX-Element für das lineare Netzwerk in Kapitel 3 und 4

A1: CTCCTCGGTAGCGTGGACTAG
 A2: GAGGAGCGACTGGTGCTCACCGTAGTTGCTGG
 A3: GCAGTACGTGTGGCACAACGGCATGACATACACCGATAACGAT
 A4: GCTTGCCCTAGTCCTGTATGTCATGCCGTTGTGCCTGA-
 GCACCAGTCG
 A5: GCAAGCCCAGCAACTACGGACACGTACTGCATCGTAT-
 CGGACGCTACC

Die Basensequenz ist aus [95] übernommen. Die *sticky ends* wurden so abgeändert, daß bei einer Zusammenlagerung eine eindimensionale Struktur entsteht.

DX-Element für das zweidimensionale Netzwerk in Kapitel 4

A1N: GCTTGCCGGTAGCGTGGACTAG
 A2: GAGGAGCGACTGGTGCTCACCGTAGTTGCTGG
 A3: GCAGTACGTGTGGCACAACGGCATGACATACACCGATAACGAT
 A4N: CTCCTCCTAGTCCTGTATGTCATGCCGTTGTGCCTGA-
 GCACCAGTCG
 A5: GCAAGCCCAGCAACTACGGACACGTACTGCATCGTAT-
 CGGACGCTACC

Für das zweidimensionale Netzwerk wurden an dem DX-Element für das lineare Netzwerk zwei *sticky ends* vertauscht. Dazu müssen zwei Oligonukleotide abgeändert werden. Die restlichen drei bleiben gleich.

Linkerelement in Kapitel 4

S1-JYG-GCT: GCTGGAAGTGCTCCGTAGCGATGGTGCGTGATTGC
 S2-JYG-GCT: GCTGCAATCACGCACCATCCTGCTACGACTCAACG
 S3-JYG-GCT: GCTCGTTGAGTCGTAGCAGGCTACGGAGCACTTCC

Die Basensequenz ist aus [91] entnommen.

4x4-Kachel in Kapitel 4

Mitte: CAGGCACCATCGTAGGTTTTCGTTCCGATCACCAAC-
 GGAGTTTTTTCTGCCGTACACCAGTGAAGTTTTTCG-
 ATCCTAGCACCTCTGGAGTTTTTCTTGC
 EckeNO: ATGCAACCTGCCTGGCAAGACTCCAGAGGACTACTCATCCGT
 EckeSO: TCCGACTGAGCCCTGCTAGGATCGACTTCACTGGAC-
 CGTTCTACCGA
 EckeSW: ACCGGAGGCTTCCTGTACGGCAGAACTCCGTTGGACGAACAG
 EckeNW: ATAGCGCCTGATCGGAACGCCTACGATGGACACGCCG
 VerbN: GCGAGCGGCGTGTGGTTGCATCATGC
 VerbO: CTCTCACGGATGAGTAGTGGGCTCAGTCGGAGTCAG
 VerbS: CTCGCTCGGTAGAACGGTGGAAAGCCTCCGGTGCATG
 VerbW: GAGAGCTGTTCGTGGCGCTATCTGAC

Dieser Baustein wurde von Hao Yan zur Verfügung gestellt [15].

Verknüpfung von drei unterschiedlichen DX-Elementen und Zickzack-Struktur in Kapitel 4

DX-Elemente A, B und C:

3DXA1: CGTAACCGTTGAACGCAAGCGGACTGTGTGAGATCCGAGTAG
 3DXA2: CGCTTGCGTTGGAATCTGGAAGGCGATCTGCCTCACACAGTC
 3DXA3: GCGTGTGTCTTGCAGATCGCCTTCCAGATTCCTATCTACGGC
 3DXB1: GATAGCCGAAGTCACCAGAAGGTATGCGGTCTAGGTTACCCG
 3DXB2: CTTCTGGTGATCGTATTCTAGCGCCACTAGCAGACCGCATA
 3DXB3: CTGTGGAACCAGCTAGTGGCGCTAGAATACGAGAGACAGTAC
 3DXC1: CGAGCGTAGTACACTCTCATCGTCCGAACTACCGGATGACTG
 3DXC2: GATGAGAGTGAGTCTACAAGTCGCGTCCACTGTAGTTCGGAC
 3DXC3: CAATCACTGCGAGTGGACGCGACTTGTAGACTATTGGTGTTCG

Verbindung mit drei Oligonukleotiden:

3DXV1: CAACGGTTACGCGGTGAACCT
3DXV2: CGCAGTGATTGGCCGTAGATA
3DXV3: TGGTTCACAGCAGTCATCCG
3DXV4: CTTCGGCTATCCTACTCGGAT
3DXV5: AAGACACACGCCGACACCAAT
3DXV6: TACTACGCTCGGTACTGTCTC

Verbindung mit einem Oligonukleotid:

3DXVL1: GTTACGCGGTGAACCTTGGTTCACAGCAGTCATCC-
GCCGAGTGATTGGCCGTAGATAACAACG
3DXVL2: GCTATCCTACTCGGATAAGACACACGCCGACACCAAT-
TACTACGCTCGGTACTGTCTCCTTCG

Verbindung mit einem Oligonukleotid mit ungepaarten Basen:

3DXVL3: GTTACGTTTCGGTGAACCTTGGTTCACAGTTCAGT-
CATCCGCGCAGTGATTGTTGCCGTAGATAACAACG
3DXVL4: GCTATCTTCTACTCGGATAAGACACACGCTTCGACA-
CCAATTACTACGCTCGTTGTACTGTCTCCTTCG

Verbindung zur Zickzack-Struktur:

3DXA4: CTACTCGGATAAGACACACGC
3DXB4: CTTCGGCTATCGTACTGTCTCCTTCGGCTATCGTA-
CTGTCTC
3DXC4: TACTACGCTCGCGACACCAATTACTACGCTCGCGAC-
ACCAAT

DX-Element für das DXG-Netzwerk in Kapitel 5

DXG1: CTAGGTTGCTGTTAAGGCTCGG
DXG2: CATAGCGAGAGTTCGTACCG
DXG3: TTTAATCCAGATTAGCCGCAAAATAGGCCGTCGGTGGCCGAA
DXG4: CTTAACAGGACGGCCTATTTTGCGGCTAACGCTATGCCGAGC
DXG5: GAACTCTTCTGGATTAAATTCGGCCACCCAACCTAGCGGTAC

Verknüpfung von drei gleichen DX-Elementen in Kapitel 5

B1: GTATGCATACCATAGTGTCTGAATCGGTGGATCCA
 B2: CAAGGCAGTTGAGATGTGCGACGAAGCGTGACTCTTATCCGC
 B3: CCGATTCAGGTCACGCTTCGTCGCACATCTACGGC
 B4: AAAAAGGGGCCTAGTACAACCTGCCTTGGCGGATAAGAACAACACTATG
 VT: CCCTTTTTTGCCGTTACTAGGC
 VT2: CTTTTTGCCGTTACTAGGCC
 VT3: TACTAGGCCCTTTTTGCCGT
 VTx3: CCCTTTTTTGCCGTTACTAGGCCCTTTTTTGCCGTTACTAGGC-
 CCCTTTTTTGCCGTTACTAGGC

DX-Element des Netzwerkes für die Metallisierung in Kapitel 6

M1: CGAAACGTCGCAGTTTAGTTCGAGAGCTACAC
 M2: GTTTCGCGTCTGAACAGTAGATGAGCGTGTAG
 M3: GACTCGCTGTATCTCTAGTATGTGCTGCTTGCTCGTGAGTAC
 M4: CTCTCGAACTTACAGCGAGTCGTAACGATGTTTCAGACG
 M5: GCTCATCTACGCAAGCAGCACTGCCACCGG
 M6: CCGGTGGGCATTATACTAGAGAAAACCTGCGAC

A.3 Herstellung der Verzweigungen**PCR-Ansätze**

Die **Herstellung der 2 kbp und der 4 kbp PCR-Fragmente** unterscheidet sich nur in den verwendeten Vorwärts- und Rückwärtsprimern. Die Primer wurden bei MWG Biotech AG gekauft, mit H₂O auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ l gebracht und bei -20°C gelagert. Bei der 2 kbp-PCR wird mit den PCR-Primern 5'-AAACCATTTAACACACGTGC-3' (L26516for) und 5'-GCTCAATGGATACATAGACGAG-3' (L28502back) ein 1987 bp langes Stück der λ -DNA vervielfältigt. Bei der 4 kbp-PCR wird mit den PCR-Primern 5'-GATGTTCTTGAATACCTTGG-3' (L21197for) und 5'-AAACAAACCCGCTAGAAC-3' (L25133back) ein 3936 bp langes Stück der λ -DNA vervielfältigt. Der PCR-Ansatz wird auf Eis durchgeführt. Die einzelnen Reagenzien werden in folgender Reihenfolge in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben:

- 25 μl 2x PCR-Mastermix (Promega, PCR Master Mix, M7502)
- 22,6 μl nucleasefreies Wasser
- 1 μl Vorwärtsprimer (100pmol/ μl)
- 1 μl Rückwärtsprimer (100pmol/ μl)
- 0,4 μl λ -DNA (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Der Ansatz wird mit der Pipette kurz durchpipettiert. Im Cycler wurde folgender Temperaturzyklus verwendet:

- 95°C 4:00 min
- 30 Zyklen: 95°C 0:45 min
- 56°C 0:45 min
- 72°C 3:45 min
- 72°C 5:00 min

Das Aufreinigen der PCR-Produkte geschieht mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) entsprechend dem Herstellerprotokoll:

1. 150 μl PCR-Produkt (sechs 25 μl oder drei 50 μl Ansätze) und 650 μl Buffer PB mischen und auf den Filter geben
2. eine Minute bei 13.000rpm filtern (Hettich Zentrifugen, EBA12, Rotor: 1112)
3. Filtrat verwerfen und 750 μl PE-Puffer auf den Filter geben und eine Minute bei 13.000rpm filtern
4. Filtrat verwerfen und eine Minute bei 13.000rpm filtern
5. Filter in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß stecken
6. 50 μl EB-Puffer auf den Filter geben und eine Minute bei 13.000rpm filtern
7. die gereinigte DNA befindet sich nun im Filtrat

Die Konzentration der DNA nach dem Aufreinigen wird am UV-Vis-Spektrometer bestimmt. (Absorption von 1 bei 260 nm entspricht 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ds-DNA.) Nach der Filterung erhält man typischerweise 1,5 μg PCR-Fragmente.

Zur **Herstellung des 7 kbp PCR-Fragmentes** wird mit den PCR-Primern 5'-AGTGGGTGGCACACAAAG-3' (L27464for) und 5'-TCGATGCACATT-AATTGCTAG-3' (L34700back) ein 7237 bp langes Stück der λ -DNA vervielfältigt. Die Primer wurden bei MWG Biotech AG gekauft, mit H₂O auf eine Konzentration

von 100 pmol/ μ l gebracht und bei -20°C gelagert. Der PCR-Ansatz wird auf Eis zusammenpipettiert. Es wurde das "TripleMaster PCR System" (0032 008.232) von Eppendorf verwendet. Die einzelnen Reagenzien wurden in folgender Reihenfolge in die Reaktionsgefäße gegeben:

Ansatz 1 (Primer und Templat-DNA in 0,5 ml Reaktionsgefäß):

4,3 μ l autoklaviertes Wasser
0,03 μ l λ -DNA
0,33 μ l Primer L27464for 100pmol/ μ l
0,33 μ l Primer L34700back 100pmol/ μ l

Der Ansatz wird mit der Pipette kurz gemischt.

Ansatz 2 (Puffer, dNTP und Polymerasen in 0,2 ml PCR-Gefäß):

15,85 μ l autoklaviertes Wasser
2,5 μ l 10x Tuning Buffer
1,5 μ l dNTP-Mix (10mM von jedem)
0,15 μ l TripleMaster Polymerase Mix

Der Ansatz wird nach Zugabe des Tuning Buffer mit der Pipette kurz gemischt. Wenn der Cycler die Temperatur von 95°C erreicht hat, werden 5 μ l von Ansatz 1 in das 0,2 ml PCR-Gefäß zu Ansatz 2 gegeben und mit der Pipette gemischt. Danach sofort in den Cycler stellen. Im Cycler wird folgender Temperaturzyklus verwendet:

	93°C	3:00 min
10 Zyklen:	93°C	0:15 min
	68°C	0:30 min
	68°C	11:00 min
8 Zyklen:	93°C	0:15 min
	68°C	0:30 min
	68°C	11:00 min + 20s/Zyklus

Das Aufreinigen und die anschließende Konzentrationsbestimmung der PCR-Produkte geschieht wie bei der 2 kbp- bzw. 4 kbp-PCR.

HindIII- Schneiden

Der Ansatz wird auf Eis zusammenpipettiert. Die einzelnen Reagenzien werden in folgender Reihenfolge in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben:

- x μl dest. H_2O , so daß ein 50 μl -Ansatz entsteht
- 5 μl NEBuffer 2 (mit Enzym geliefert)
- max. 3 μg PCR-Produkt
- 1 μl HindIII Enzym (NEB, HindIII, #R0104S)

Der Ansatz wird mit der Pipette kurz gemischt. Das Schneiden wird in einer Stunde bei 37°C durchgeführt. Danach findet bei 65°C für 20 min eine Enzymdeaktivierung statt.

Nach dem Schneiden wird der Ansatz in einen PCR-Filter (Millipore, #UFC7PCR50) gegeben, mit TE-Puffer auf 500 μl aufgefüllt und 15 min bei 1000g gefiltert. Danach 20 μl TE-Puffer auffüllen, den Filter drehen und die DNA zwei Minuten bei 1000g herausfiltern. Die Konzentration der geschnittenen DNA nach dem Filtern wird am UV-Vis-Spektrometer bestimmt.

Klenow - Fragment

Am 5'-AGCT-3' Überhang wird die letzte Base mit dATP aufgefüllt. Es entsteht ein 5'-AGC-3' Überhang, der nicht mehr zu sich selbst komplementär ist. Außerdem wird dem Mix TTP zugesetzt, um eine Andauung der geraden Enden zu verhindern. Der Ansatz wird auf Eis zusammenpipettiert. Die einzelnen Reagenzien wurden in folgender Reihenfolge in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben:

- x μl destilliertes H_2O , so daß ein 50 μl -Ansatz entsteht
- 5 μl Reaktionspuffer (Ecopol - Puffer) (mit Enzym geliefert)
- ca. 3 μg DNA (HindIII geschnittene PCR- Fragmente)
- 0,5 μl TTP (10 mM Lösung)
- 1 μl dATP (10 mM Lösung)
- 1 μl Klenow - Fragment, 5U/ μl (NEB, #M0210S)

Der Ansatz wird mit der Pipette kurz gemischt. Die dATP-Anlagerung wird 25 Minuten bei 25°C durchgeführt. Danach findet bei 75°C für 10 Minuten eine Enzymdeaktivierung statt.

Nach der dATP-Anlagerung wird der Ansatz in einen PCR-Filter gegeben, mit

TE-Puffer auf 500 μl aufgefüllt und 15 min bei 1000g gefiltert. Danach 20 μl TE-Puffer auffüllen, den Filter drehen und die DNA zwei Minuten bei 1000g herausfiltern. Die Konzentration der fertigen DNA-Verlängerungen nach dem Filtern wird am UV-Vis-Spektrometer bestimmt.

Phosphorylierung der Linkerelemente

Die Phosphorylierung ist notwendig, da eine Ligation nur an phosphorylierten Enden stattfinden kann. Die einzelnen Reagenzien werden in folgender Reihenfolge in ein 0,5 ml Reagenzgefäß gegeben:

- 20 μl destilliertes H_2O
- 3 μl 10x T4 Polynucleotide Kinase Reaction Buffer (wird mit dem Enzym geliefert)
- 5 μl vom Y-Ansatz (μg)
- 1 μl ATP 0,5 mM (SIGMA, Adenosine 5'-triphosphate disodium salt, A7699)
- 1 μl T4-Kinase (10 U/ μl) (NEB, T4 Polynucleotide Kinase, #M0201S)

Zum Mischen wurde der Ansatz durchpipettiert. Die Phosphorylierung wurde im Cycler 30 min bei 37°C durchgeführt.

Zum Entfernen des Enzyms wird der Ansatz nach der Phosphorylierung im Enzymfilter mit TE-Puffer auf 250 μl aufgefüllt und eine Minute bei 14000g gefiltert. Zum Austausch des Puffers wird das Filtrat im 30 kDalton-Filter mit TE-Puffer auf 500 μl aufgefüllt und acht Minuten bei 12000g gefiltert. Zum herausfiltern der Linkerelemente 20 μl TE-Puffer auffüllen, den Filter drehen und die DNA drei Minuten bei 1000g herausfiltern.

Ligation

Der Ligationsansatz wird auf Eis durchgeführt. Die einzelnen Reagenzien wurden in folgender Reihenfolge in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben:

- x μ l destilliertes H₂O, so daß ein 30 μ l-Ansatz entsteht
- 3 μ l 10x Ligationspuffer (mit Enzym geliefert)
- 1 μ g DNA-Verlängerung (3 pmol)
- 0,034 μ g Linkerelement (1 pmol)
- 4 μ l T4-Ligase (NEB, T4 DNA Ligase, #M0202S), 1:200 in Diluent A (NEB, Diluent Buffer A, #B8001S) verdünnt

Zur Ligation ist der Ansatz 16 Stunden bei 16°C zu inkubieren.

A.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die DNA-Konzentration der Verzweigungen betrug ca. 0,005 μ g/ μ l. Zum Färben der DNA mit YoYo 1 werden 10 μ l DNA-Verzweigungen mit 0,1 μ l YoYo 1 (Invitrogen, Y3601) für 2 Stunden bei 50°C inkubiert. Die Lösung wird danach mit 40 μ l 0,1 M Tris verdünnt. Die Probe wird auf mit Aptes (Aminopropyltriethoxysilan) beschichtetes Glas aufgetropft. Um die Verzweigungen sehen zu können, müssen die Arme in verschiedene Richtungen gestreckt werden. Das "klassische" Strecken geschieht in einer Richtung und ist daher in diesem Fall nicht anwendbar.

Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

- [9] MERTIG, M.; CIACCHI, L. C.; BENKE, A.; HUHLE, A.; OPITZ, J.; SEIDEL, R.; SCHACKERT, H. K.; POMPE, W.: DNA-based fabrication of metallic wires and networks. In: REIF, J. (Hrsg.): Foundations of Nanoscience: Self-assembled architectures and devices, Science Technica, Inc., 2004, S. 132–145.

- [45] SEIFFERT, J.; HUHLE, A.: A full-automatic sequence design algorithm for branched DNA structures. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 25 (2008) 453-466.

Literatur

- [1] WU, B.; KUMAR, A.: Extreme ultraviolet lithography: a review. *Journal of Vacuum Science and Technology B* 25 (2007) 1743-1761.
- [2] CALLADINE, C. R.; DREW, H. R.; LUISI, B. F.; TRAVERS, A. A.: Understanding DNA. Third edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam et al., 2004.
- [3] HAYS, F. A.; WATSON, J.; HO, P. S.: Caution! DNA crossing: crystal structures of holliday junctions. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 49663-49666.
- [4] LUSHNIKOV, A. Y.; BOGDANOV, A.; LYUBCHENKO, Y. L.: Holliday junctions dynamics and branch migration. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 43130-43134.
- [5] SEEMAN, N. C.; KALLENBACH, N. R.: Design of immobile nucleic acid junctions. *Biophys. Journal* 44 (1983) 201-209.
- [6] MA, R.-I.; KALLENBACH, N. R.; SHEARDY, R. D.; PETRILLO, M. L.; SEEMAN, N. C.: Three-arm nucleic acid junctions are flexible. *Nucleic Acids Research* 14 (1986) 9745-9753.
- [7] KALLENBACH, N. R.; MA, R.-I.; SEEMAN, N. C.: An immobile nucleic acid junction constructed from oligonucleotides. *Nature* 305 (1983) 829-831.
- [8] WANG, Y.; MUELLER, J. E.; KEMPER, B.; SEEMAN, N. C.: Assembly and characterization of five-arm and six-arm DNA branched junctions. *Biochemistry* 30 (1991) 5667-5674.
- [9] MERTIG, M.; CIACCHI, L. C.; BENKE, A.; HUHLE, A.; OPITZ, J.; SEIDEL, R.; SCHACKERT, H. K.; POMPE, W.: DNA-based fabrication of metallic wires and networks. In: REIF, J. (Hrsg.): Foundations of Nanoscience: Self-assembled architectures and devices, Science Technica, Inc., 2004, S. 132-145.
- [10] FU, T. J.; SEEMAN, N. C.: DNA double-crossover molecules. *Biochemistry* 32 (1993) 3211-3220.
- [11] SA-ARDYEN, P.; VOLOGODSKII, A. V.; SEEMAN, N. C.: The flexibility of DNA double crossover molecules. *Biophysical Journal* 84 (2003) 3829-3837.
- [12] WINFREE, E.; LIU, F.; WENZLER, L. A.; SEEMAN, N. C.: Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature* 394 (1998) 539-544.

- [13] ROTHEMUND, P. W. K.; EKANI-NKODO, A.; PAPADAKIS, N.; KUMAR, A.; FYGENSON, D. K.; WINFREE, E.: Design and characterization of programmable DNA nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 16344-16352.
- [14] LABEAN, T. H.; YAN, H.; KOPATSCH, J.; LIU, F.; WINFREE, E.; REIF, J. H.; SEEMAN, N. C.: Construction, analysis, ligation, and self-assembly of DNA triple crossover complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 1848-1860.
- [15] YAN, H.; PARK, S. H.; FINKELSTEIN, G.; REIF, J. H.; LABEAN, T. H.: DNA-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires. *Science* 301 (2003) 1882-1884.
- [16] PARK, S. H.; BARISH, R.; LI, H.; REIF, J. H.; FINKELSTEIN, G.; YAN, H.; LABEAN, T. H.: Three-helix bundle DNA tiles self-assemble into 2D lattice or 1D templates for silver nanowires. *Nano Letters* 5 (2005) 693-696.
- [17] MATHIEU, F.; LIAO, S.; KOPATSCH, J.; WANG, T.; MAO, C.; SEEMAN, N. C.: Six-helix bundles designed from DNA. *Nano Letters* 5 (2005) 661-665.
- [18] LIN, C.; LIU, Y.; RINKER, S.; YAN, H.: DNA tile based self-assembly: building complex nanoarchitectures. *ChemPhysChem* 7 (2006) 1641-1647.
- [19] MERTIG, M.; CIACCHI, L. C.; SEIDEL, R.; POMPE, W.: DNA as a selective metallization template. *Nano Letters* 2 (2002) 841-844.
- [20] BERTI, L.; ALESSANDRINI, A.; FACCI, P.: DNA-templated photoinduced silver deposition. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 11216-11217.
- [21] KNIPPERS, R.: Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003.
- [22] KRATKY, O.; POROD, G.: Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 68 (1949) 1106-1123.
- [23] DICKERSON, R. E.; BANSAL, M.; CALLADINE, C. R.; DIEKMANN, S.; HUNTER, W. N.; KENNARD, O.; LAVERY, R.; NELSON, H. C. M.; OLSON, W. K.; SAENGER, W.; SHAKKED, Z.; SKLENAR, H.; SOUMPASIS, D. M.; TUNG, C.-S.; VON KITZING, E.; WANG, A. H.-J.; ZHURKIN, V. B.: Definitions and nomenclature of nucleic acid structure components. *Nucleic Acids Research* 17 (1989) 1797-1803.
- [24] BERMAN, H. M.; OLSON, W. K.; BEVERIDGE, D. L.; WESTBROOK, J.; GELBIN, A.; DEMENY, T.; HSIEH, S.-H.; SRINIVASAN, A. R.; SCHNEIDER, B.: Nucleic acid database: a comprehensive relational database of three-dimensional structures of nucleic acids. *Biophys. J.* 63 (1992) 751-759.

- [25] LU, X.-J.: 3DNA - a 3-dimensional nucleic acid structure analysis and rebuilding software package. New Jersey: Rutgers University, 2003.
- [26] SAYLE, R.; MILNER-WHITE, E. J.: RasMol: biomolecular graphics for all. *Trends in Biochemical Sciences* 20 (1995) 374.
- [27] UMEZAWA, Y.; NISHIO, M.: Thymine-methyl/pi interaction implicated in the sequence-dependent deformability of DNA. *Nucl. Acids Res.* 30 (2002) 2183-2192.
- [28] TCHERNAENKO, V.; HALVORSON, H. R.; LUTTER, L. C.: Topological measurement of an a-tract bend angle: effect of magnesium. *J. Mol. Biol.* 341 (2004) 55-63.
- [29] DIEKMANN, S.: Temperature and salt dependence of the gel migration anomaly of curved DNA fragments. *Nucl. Acids Res.* 15 (1987) 247-265.
- [30] RIVETTI, C.; WALKER, C.; BUSTAMANTE, C.: Polymer chain statistics and conformational analysis of DNA molecules with bends or sections of different flexibility. *J. Mol. Biol.* 280 (1998) 41-59.
- [31] BRUKNER, I.; SUSIC, S.; DLAKIC, M.; SAVIC, A.; PONGOR, S.: Physiological concentration of magnesium ions induces a strong macroscopic curvature in GGGCC-containing DNA. *J. Mol. Biol.* 236 (1994) 26-32.
- [32] DLAKIC, M.; HARRINGTON, R. E.: Bending and torsional flexibility of G/C-rich sequences as determined by cyclization assays. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 29945-29952.
- [33] WETMUR, J. G.; DAVIDSON, N.: Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* 31 (1968) 349-370.
- [34] BRESLAUER, K. J.; FRANK, R.; BLÖCKER, H.; MARKY, L. A.: Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 3746-3750.
- [35] BALDINO, F. J.; CHESSELET, M. F.; LEWIS, M. E.: High-resolution in situ hybridization histochemistry. *Methods Enzymol* 168 (1989) 761-777.
- [36] LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M.: Prinzipien der Biochemie. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994.
- [37] MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155 (1987) 335-350.

- [38] SHLYAKHTENKO, L. S.; POTAMAN, V. N.; SINDEN, R. R.; GALL, A. A.; LYUBCHENKO, Y. L.: Structure and dynamics of three-way DNA junctions: atomic force microscopy studies. *Nucleic Acids Research* 28 (2000) 3472-3477.
- [39] ASSENBERG, R.; WESTON, A.; CARDY, D. L. N.; FOX, K. R.: Sequence-dependent folding of DNA three-way junctions. *Nucleic Acids Research* 30 (2002) 5140-5150.
- [40] WELCH, J. B.; DUCKETT, D. R.; LILLEY, D. M. J.: Structures of bulged three-way DNA junctions. *Nucleic Acids Research* 21 (1993) 4548-4555.
- [41] MCKINNEY, S. A.; DÉCLAIS, A.-C.; LILLEY, D. M.; HA, T.: Structural dynamics of individual holliday junctions. *Nature Structural Biology* 10 (2003) 93-97.
- [42] MCKINNEY, S. A.; TAN, E.; WILSON, T. J.; NAHAS, M. K.; DÉCLAIS, A.-C.; CLEGG, R. M.; LILLEY, D. M. J.; HA, T.: Single-molecule studies of DNA and RNA four-way junctions. *Biochemical Society Transactions* 32 (2004) 41-45.
- [43] WATSON, J.; HAYS, F. A.; HO, P. S.: Definitions and analysis of DNA Holliday junction geometry. *Nucleic Acids Research* 32 (2004) 3017-3027.
- [44] SEEMAN, N.: De novo design of sequences for nucleic acid structural engineering. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 8 (1990) 573-581.
- [45] SEIFFERT, J.; HUHLE, A.: A full-automatic sequence design algorithm for branched DNA structures. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 25 (2008) 453-466.
- [46] MAO, C.; SUN, W.; SEEMAN, N. C.: Designed two-dimensional DNA holliday junction arrays visualized by atomic force microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 5437-5443.
- [47] CHELYAPOV, N.; BRUN, Y.; GOPALKRISHNAN, M.; REISHUS, D.; SHAW, B.; ADLEMAN, L.: DNA triangles and self-assembled hexagonal tilings. *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 13924-13925.
- [48] HE, Y.; CHEN, Y.; LIU, H.; RIBBE, A. E.; MAO, C.: Self-assembly of hexagonal DNA two-dimensional (2D) arrays. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 12202-12203.
- [49] LIU, D.; WANG, M.; DENG, Z.; WALULU, R.; MAO, C.: Tensegrity: construction of rigid DNA triangles with flexible four-arm DNA junctions. *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 2324-2325.

- [50] REISHUS, D.; SHAW, B.; BRUN, Y.; CHELYAPOV, N.; ADLEMAN, L.: Self-assembly of DNA double-double crossover complexes into high-density, doubly connected, planar structures. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 17590-17591.
- [51] DING, B.; SHA, R.; SEEMAN, N. C.: Pseudohexagonal 2D DNA crystals from double crossover cohesion. *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 10230-10231.
- [52] CHEN, J. H.; SEEMAN, N. C.: Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature* 350 (1991) 631-633.
- [53] ZHANG, Y.; SEEMAN, N. C.: Construction of a DNA-truncated octahedron. *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 1661-1669.
- [54] SHIH, W. M.; QUISPE, J. D.; JOYCE, G. F.: A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron. *Nature* 427 (2004) 618-621.
- [55] GOODMAN, R. P.; SCHAAP, I. A. T.; TARDIN, C. F.; ERBEN, C. M.; BERRY, R. M.; SCHMIDT, C. F.; TURBERFIELD, A. J.: Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks for molecular nanofabrication. *Science* 310 (2005) 1661-1665.
- [56] ERBEN, C. M.; GOODMAN, R. P.; TURBERFIELD, A. J.: A self-assembled DNA bipyramid. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 6992-6993.
- [57] EKANI-NKODO, A.; KUMAR, A.; FYGENSON, D. K.: Joining and scission in the self-assembly of nanotubes from DNA tiles. *Phys. Rev. Lett.* 93 (2004) 268301-1-268301-4.
- [58] LIU, H.; CHEN, Y.; HE, Y.; RIBBE, A. E.; MAO, C.: Approaching the limit: can one DNA oligonucleotide assemble into large nanostructures? *Angewandte Chemie* 118 (2006) 1976-1979.
- [59] ROTHEMUND, P. W. K.: Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* 440 (2006) 297-302.
- [60] WINFREE, E.; YANG, X.; SEEMAN, N. C.: Universal computation via self-assembly of DNA: some theory and experiments. In: LANDWEBER, L. F. (Hrsg.); BAUM, E. B. (Hrsg.): Proceedings of the Second Annual Meeting on DNA Based Computers, held at Princeton University, June 10-12, 1996 Bd. 44 American Mathematical Society, 1996, S. 191-213.
- [61] ROTHEMUND, P. W. K.; PAPADAKIS, N.; WINFREE, E.: Algorithmic self-assembly of DNA sierpinski triangles. *PLoS Biology* 2 (2004) 2041-2053.

- [62] WINFREE, E.; BEKBOLATOV, R.: Proofreading tile sets: error correction for algorithmic self-assembly. In: CHEN, J. (Hrsg.); REIF, J. (Hrsg.): DNA Computing Bd. 2943/2004, Springer Berlin / Heidelberg, 2004, S. 126–144.
- [63] BARISH, R. D.; ROTHEMUND, P. W. K.; WINFREE, E.: Two computational primitives for algorithmic self-assembly: copying and counting. *Nano Letters* 5 (2005) 2586 -2592.
- [64] YURKE, B.; TURBERFIELD, A. J.; JR, A. P. M.; SIMMEL, F. C.; NEUMANN, J. L.: A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. *Nature* 406 (2000) 605-608.
- [65] MAO, C.; SUN, W.; SHEN, Z.; SEEMAN, N. C.: A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA. *Nature* 397 (1999) 144-146.
- [66] LIU, D.; BALASUBRAMANIAN, S.: A proton-fuelled DNA nanomachine. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 5734 - 5736.
- [67] VIASNOFF, V.; MELLER, A.; ISAMBERT, H.: DNA nanomechanical switches under folding kinetics control. *Nano Letters* 6 (2006) 101 -104.
- [68] YAN, H.; ZHANG, X.; SHEN, Z.; SEEMAN, N. C.: A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology. *Nature* 415 (2002) 62-65.
- [69] CHHABRA, R.; SHARMA, J.; LIU, Y.; YAN, H.: Addressable molecular tweezers for DNA-templated coupling reactions. *Nano Letters* 6 (2006) 978 - 983.
- [70] FENG, L.; PARK, S. H.; REIF, J. H.; YAN, H.: A two-state DNA lattice switched by DNA nanoactuator. *Angewandte Chemie* 42 (2003) 4342-4346.
- [71] TURBERFIELD, A. J.; MITCHELL, J. C.; YURKE, B.; MILLS, JR., A. P.; BLAKEY, M. I.; SIMMEL, F. C.: DNA fuel for free-running nanomachines. *Phys. Rev. Lett.* 90 (2003) 118102-1-118102-4.
- [72] CHEN, Y.; WANG, M.; MAO, C.: An autonomous DNA nanomotor powered by a DNA enzyme. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 3554-3557.
- [73] YIN, P.; YAN, H.; DANIELL, X. G.; TURBERFIELD, A. J.; REIF, J. H.: A unidirectional DNA walker that moves autonomously along a track. *Angewandte Chemie* 116 (2004) 5014-5019.
- [74] HEINEMANN, S.: Aufbau einfach verzweigter, am Knotenpunkt funktionalisierter DNA-Template zur ortsspezifischen Integration in mikroelektronische Kontaktstrukturen. großer Beleg, TU-Dresden, 2003.

- [75] PARK, S. H.; YIN, P.; LIU, Y.; REIF, J. H.; LABEAN, T. H.; YAN, H.: Programmable DNA self-assemblies for nanoscale organization of ligands and proteins. *Nano Letters* 5 (2005) 729-733.
- [76] PINTO, Y. Y.; LE, J. D.; SEEMAN, N. C.; MUSIER-FORSYTH, K.; TATON, T. A.; KIEHL, R. A.: Sequence-encoded self-assembly of multiple-nanocomponent arrays by 2D DNA scaffolding. *Nano Letters* 5 (2005) 2399-2402.
- [77] ZHANG, J.; LIU, Y.; KE, Y.; YAN, H.: Periodic square-like gold nanoparticle arrays templated by self-assembled 2D DNA nanogrids on a surface. *Nano Letters* 6 (2006) 248-251.
- [78] ZHENG, J.; CONSTANTINO, P. E.; MICHEEL, C.; ALIVISATOS, A. P.; KIEHL, R. A.; SEEMAN, N. C.: Two-dimensional nanoparticle arrays show the organizational power of robust DNA motifs. *Nano Letters* 6 (2006) 1502-1504.
- [79] LIN, C.; KE, Y.; LIU, Y.; MERTIG, M.; GU, J.; YAN, H.: Functional DNA nanotube arrays: bottom-up meets top-down. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 6089-6092.
- [80] TORIMOTO, T.; YAMASHITA, M.; KUWABATA, S.; SAKATA, T.; MORI, H.; YONEYAMA, H.: Fabrication of CdS nanoparticle chains along DNA double strands. *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 8799-8803.
- [81] BRAUN, E.; EICHEN, Y.; SIVAN, U.; BEN-YOSEPH, G.: DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. *Nature* 391 (1998) 775-778.
- [82] RICHTER, J.; MERTIG, M.; POMPE, W.; MÖNCH, I.; SCHACKERT, H. K.: Construction of highly conductive nanowires on a DNA template. *Appl. Phys. Lett.* 78 (2001) 536-538.
- [83] MONSON, C. F.; WOOLLEY, A. T.: DNA-templated construction of copper nanowires. *Nano Letters* 3 (2003) 359-363.
- [84] SEIDEL, R.; CIACCHI, L. C.; WEIGEL, M.; POMPE, W.; MERTIG, M.: Synthesis of platinum cluster chains on DNA templates: conditions for a template-controlled cluster growth. *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 10801-10811.
- [85] FORD, W. E.; HARNACK, O.; YASUDA, A.; WESSELS, J. M.: Platinated DNA as precursors to templated chains of metal nanoparticles. *Advanced Materials* 13 (2001) 1793-1797.

- [86] ONGARO, A.; GRIFFIN, F.; BEECHER, P.; NAGLE, L.; IACOPINO, D.; QUINN, A.; REDMOND, G.; FITZMAURICE, D.: DNA-templated assembly of conducting gold nanowires between gold electrodes on a silicon oxide substrate. *Chem. Mater.* 17 (2005) 1959-1964.
- [87] GU, Q.; CHENG, C.; SURYANARAYANAN, S.; DAI, K.; HAYNIE, D. T.: DNA-templated fabrication of nickel nanocluster chains. *Physica E* 33 (2006) 92-98.
- [88] LUND, J.; DONG, J.; DENG, Z.; MAO, C.; PARVIZ, B. A.: Electrical conduction in 7 nm wires constructed on lambda-DNA. *Nanotechnology* 17 (2006) 2752-2757.
- [89] LIU, D.; PARK, S. H.; REIF, J. H.; LABEAN, T. H.: DNA nanotubes self-assembled from triple-crossover tiles as templates for conductive nanowires. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004) 717-722.
- [90] YAN, H.; LABEAN, T. H.; FENG, L.; REIF, J. H.: Directed nucleation assembly of DNA tile complexes for barcode-patterned lattices. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 8103-8108.
- [91] SEIDEL, R.: Methods for the development of a DNA based nanoelectronics. Dissertation, TU Dresden, 2003.
- [92] KEREN, K.; KRUEGER, M.; GILAD, R.; BEN-YOSEPH, G.; SIVAN, U.; BRAUN, E.: Sequence-specific molecular lithography on single DNA molecules. *Science* 297 (2002) 72-75.
- [93] MERTIG, M.; SEIDEL, R.; CIACCHI, L. C.; POMPE, W.: Nucleation and growth of metal clusters on a DNA template. *AIP Conference Proceedings* 633 (2002) 449-453.
- [94] BAYER, J.; RÄDLER, J. O.; BLOSSEY, R.: Chains, dimers, and sandwiches: melting behavior of DNA nanoassemblies. *Nano Letters* 5 (2005) 497-501.
- [95] LE, J. D.; PINTO, Y.; SEEMAN, N. C.; MUSIER-FORSYTH, K.; TATON, T. A.; KIEHL, R. A.: DNA-templated self-assembly of metallic nanocomponent arrays on a surface. *Nano Letters* 4 (2004) 2343 -2347.
- [96] BINNING, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C.: Atomic force microscope. *Physical Review Letters* 56 (1986) 930-933.
- [97] HORCAS, I.; FERNANDEZ, R.; GOMEZ-RODRIGUEZ, J.; COLCHERO, J.; GOMEZ-HERRERO, J.; BARO, A. M.: WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.* 78 (2007).

-
- [98] HUHLE, A.: Aufbau von verzweigten DNA-Templaten und deren Integration in mikroelektronische Kontaktstrukturen. großer Beleg, TU-Dresden, 2002.
- [99] LU, X.-J.; OLSON, W. K.: 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures. *Nucleic Acids Research* 31 (2003) 5108-5121.
- [100] AYMAMI, J.; COLL, M.; VAN DER MAREL, G. A.; VAN BOOM, J. H.; WANG, A. H.-J.; RICH, A.: Molecular structure of nicked DNA: a substrate for DNA repair enzymes. *Biochemistry* 87 (1990) 2526-2530.
- [101] EGLI, M.: DNA-cation interactions: quo vadis? *Chemistry and Biology* 9 (2002) 277-286.
- [102] FICHTINGER-SCHEPMAN, A. M. J.; VAN DER VEER, J. L.; DEN HARTOG, J. H. J.; LOHMAN, P. H. M.; REEDIJK, J.: Adducts of the antitumor drug cis-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification and quantitation. *Biochemistry* 24 (1985) 707-713.
- [103] ERLER, C.: persönliche Mitteilung.
- [104] SEIDEL, R.; MERTIG, M.; POMPE, W.: Scanning force microscopy of DNA metallization. *Surf. Interface Anal.* 33 (2002) 151-154.

Danksagung

Die vorliegende Dissertationsschrift entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Professur für Materialwissenschaft und Nanotechnik des Institutes für Werkstoffwissenschaft der Technischen Universität Dresden. Herrn Prof. Wolfgang Pompe möchte ich ganz herzlich dafür danken, daß er mir die Arbeit am Institut ermöglichte.

Herr Dr. Michael Mertig, mein wissenschaftlicher Betreuer und Leiter der Arbeitsgruppe BioNanotechnologie und Strukturbildung, hat mir bei der Ausgestaltung der Arbeit viel Freiheit gewährt. Ihm möchte ich für seine Unterstützung und die fachlichen Ratschläge danken.

Herrn Dipl.-Inf. Jan Seifert danke ich für die gute Zusammenarbeit. Ohne das SEED - Programm wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Herrn Dr. Sebastian Taeger danke ich für die TEM-Untersuchungen. Herrn Prof. Hao Yan für das Zur-Verfügung-Stellen der Proben mit Netzwerken aus 4x4-Kacheln. Frau Dipl.-Ing. Christiane Erler danke ich für die Unterstützung bei der Metallisierung von immobilisierter DNA.

Die Arbeit in der Arbeitsgruppe BioNanotechnologie und Strukturbildung hat mir viel Spaß gemacht. Einen ganz großen Dank an die Kollegen für die freundliche Atmosphäre und die vielfältigen Hilfestellungen. Insbesondere seien hier Frau Claudia Hürnich und Herrn Raja Gopal Rayavarapu für die Arbeit im Labor gedankt. Im Rahmen ihrer Belegarbeit bzw. Master Thesis unterstützten sie mich bei der Herstellung von DNA-Netzwerken.

Meinen Dank möchte ich denjenigen aussprechen, die an der Korrektur des Manuskripts beteiligt waren.

Zum Schluß danke ich meiner Familie für die Unterstützung.

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützung von folgenden Personen erhalten:

Dr. Michael Mertig
Prof. Wolfgang Pompe

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir keine geldwerten Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht worden. Die Promotionsordnung der Fakultät Maschinenwesen der Technischen Universität Dresden erkenne ich an.

Alexander Huhle